

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 314**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2008 E 14179247 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2818550**

54 Título: **Expresión génica y dolor**

30 Prioridad:

11.05.2007 US 917583 P

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

26.06.2017

73 Titular/es:

**ADYNXX, INC. (100.0%)
731 Market Street, Suite 420
San Francisco, CA 94103, US**

72 Inventor/es:

MAMET, JULIEN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 619 314 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

Expresión génica y dolor

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos bicatenarios, denominados oligonucleótidos señuelo, sus composiciones farmacéuticas, y el uso de dichos oligonucleótidos señuelo y sus composiciones farmacéuticas para modular la señalización nociceptiva y para prevenir y/o tratar el dolor.

10

Antecedentes de la invención

El dolor puede definirse como una sensación desagradable y una experiencia emocional asociada con el daño del tejido real o potencial, o describirse en términos de dicho daño. El dolor crónico afecta al 40 % de la población de los EE.UU. y está asociado con numerosas dolencias médicas perjudiciales. Debilitamiento persistente y muy elevado, el dolor crónico está generalmente acompañado por debilidad, insomnio, ausencia de apetito, irritabilidad y depresión. Con el tiempo, la calidad de vida se ve afectada profundamente y los pacientes son a menudo incapaces de realizar tareas sencillas de la vida del día a día.

15

20

Los tratamientos contra el dolor utilizados actualmente aplican una escala contra el dolor en tres etapas que recomienda la administración de fármacos como sigue: no opiáceos (por ejemplo, aspirina, acetaminofeno, etc.), a continuación, según sea necesario, opiáceos suaves (por ejemplo, codeína) y finalmente, opiáceos fuertes (por ejemplo, morfina). A pesar de este arsenal de fármacos, alrededor de un 50 % de pacientes con dolor crónico no se tratan eficazmente.

25

La ineficacia del tratamiento contra el dolor real es, *entre otras*, debida a características de toxicidad significativas con los tratamientos de fármacos existentes. La toxicidad leve a grave está inducida por todas las clases de fármacos contra el dolor: fármacos inflamatorios no esteroideos que producen daños gastrointestinales, los inhibidores de COX₂ (coxibs) están asociados con insuficiencia cardíaca, y los opiáceos son responsables de numerosos efectos secundarios que incluyen la depresión respiratoria, sedación, funcionamientos digestivos incorrectos y adicción.

30

Los factores de transcripción son importantes factores en las rutas de señalización múltiples y controlan frecuentemente la expresión concurrente de numerosos genes. Muchos factores de transcripción están implicados en la regulación de la expresión de los genes que están implicados en el dolor incluyendo, pero no de forma limitativa, factores POU, factores estimuladores corriente arriba (USF), EGR1, proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc / activación de los factores de transcripción (CREB/ATF), proteína de activación 1 (AP1), factor de respuesta sérico (SRF), factor de transcripción selectivo del promotor (SP1) y el factor de transcripción 1 relacionado con el retraso en el crecimiento (RUNX1).

35

40

De esta manera, existe un significativo potencial terapéutico en la inhibición de los factores de transcripción a fin de controlar la expresión de los genes implicados en el dolor. De acuerdo con ello, es necesario que sean inhibidores de los factores de transcripción selectivos, fácilmente disponibles y no tóxicos.

45 Sumario de la invención

La presente invención satisface esta y otras necesidades proporcionando oligonucleótidos señuelo, por ejemplo, oligonucleótidos bicatenarios, sus composiciones farmacéuticas, y el uso de dichos oligonucleótidos señuelo y sus composiciones farmacéuticas para modular la señalización nociceptiva y para prevenir y/o tratar el dolor. En general, los oligonucleótidos señuelo son inhibidores de los factores de transcripción.

50

En un aspecto, se proporcionan oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1.

En un aspecto relacionado, se proporcionan oligonucleótidos señuelo que comprenden dos o más sitios de unión a factores de transcripción de acuerdo con la reivindicación 7.

55

La posición relativa de los dos sitios de unión al factor de transcripción en las moléculas señuelo modula (por ejemplo, aumenta) la afinidad de unión entre un factor de transcripción y su sitio de unión al factor de transcripción, en comparación con la afinidad de unión entre el factor de transcripción y un señuelo que tiene un único sitio de unión al factor de transcripción. La posición relativa de los dos sitios de unión al factor de transcripción del señuelo promueve la dimerización de los factores de transcripción unidos a los sitios.

60

Los oligonucleótidos señuelo se pueden proporcionar como sales, hidratos, solvatos o derivados de N-óxidos.

65

En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden oligonucleótidos señuelo. Las composiciones farmacéuticas comprenden generalmente uno o más oligonucleótidos señuelo y un vehículo

farmacéuticamente aceptable.

Se divulgan en el presente documento métodos para tratar o evitar el dolor.

5 Los métodos implican generalmente administrar a un paciente que necesita dichos tratamiento o prevención una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido señuelo de la invención, o una composición farmacéutica del mismo.

10 Se divulgan en el presente documento métodos para modular la transcripción de un gen en una célula implicada en la señalización nociceptiva, tal como un ganglio de la raíz dorsal y/o una neurona de la médula espinal. los métodos comprenden generalmente administrar a la célula una cantidad eficaz de un oligonucleótido señuelo.

15 Se divulgan en el presente documento, y se proporcionan, métodos para modular la señalización nociceptiva en una célula implicada en la señalización nociceptiva, tal como un ganglio de la raíz dorsal y/o una neurona de la médula espinal. Los métodos comprenden generalmente administrar a la célula una cantidad eficaz de un oligonucleótido señuelo.

20 Se divulgan en el presente documento, y se proporcionan, métodos para controlar la degradación proteolítica de las proteínas implicadas en la señalización nociceptiva de una célula. los métodos comprenden generalmente administrar a la célula una cantidad eficaz de un oligonucleótido señuelo.

Breve descripción de los dibujos

25 **Fig. 1. A. Control de la hibridación de un duplete señuelo.** SEQ ID NO.: 40 (34 pb) y la SEQ ID NO.: 44 (20 pb) se usaron para controlar la hibridación de secuencias señuelos de tamaños diferentes en un gel de agarosa al 2,5 %. Una única hebra individual migra más rápidamente que las hebras dobles señuelos. **B. Sensibilidad ELISA al factor de transcripción.** Unión de hEGR1 a la SEQ ID NO.: 40 acoplada a biotina: se midió en presencia tanto de 5 µg, 10 µg o 15 µg de extractos nucleares de células K-562 (estimuladas por TPA). Se muestran los valores de la DO_{450nm} obtenidos de cada cantidad de proteínas. **C. Control de la especificidad.** Se controló la ausencia de unión no específica mediante secuencias señuelos en experimentos ELISA comparando la actividad de la unión de hEGR1 de la SEQ ID NO.: 40 a oligonucleótidos no emparejados y mutados formados por la hibridación de la secuencia de SEQ ID NO.: 43 con la secuencia de SEQ ID NO.:46 (denominados a partir de ahora en el presente documento SEQ ID NO.:43/46). Se biotinilaron la SEQ ID NO.:40 y la SEQ ID NO.:43/46. Se muestran los valores de DO_{450nm} obtenidos de cada secuencia.

35 **Fig. 2. A. Afinidad relativa.** Se llevaron a cabo los análisis ELISA de competición cuantitativos que implicaban hEGR1 utilizando una concentración constante de la SEQ ID NO.: 40 biotinilada: 40 (128 nM) como la sonda y 10 µg de extracto de proteínas. La mezcla sonda-proteína se incubó con concentraciones crecientes de la SEQ ID NO.: 40, SEQ ID NO.: 41 o la SEQ ID NO.: 42 competidoras. Se midió la inhibición de la unión de hEGR1 por la sonda para cada competidora a diversas concentraciones y se ajustaron las curvas de inhibición resultantes a un modelo de desintegración exponencial. Las CI₅₀ respectivas son 215 nM, 250 nM y 99 nM. Se proporcionan los promedios ± SEM como un porcentaje de la unión máxima de hEGR1 obtenida con la sonda en ausencia del competidor; n= 2-4. **B. Especificidad relativa.** Se midió la unión relativa de los oligonucleótidos EGR1 señuelos a los factores de transcripción hSP1 y hWT1 se midió usando ELISA cuantitativos. Gráfica de la parte superior: los valores de unión a DO representativos de la SEQ ID NO.: 40 (128 nM) a cualquier factor de transcripción hSP1 o hWT1, en comparación con la unión a hEGR1, se detectaron con anticuerpos específicos del factor de transcripción tanto en presencia como en ausencia de la SEQ ID NO.: 42 competidora (512 nM). Por comparación, se muestra SEQ ID NO.: 11 de unión a hSP1. Gráfica de la parte inferior: se presentan las curvas de inhibición de la unión de cada factor. Se proporcionan el promedio y SEM como porcentaje de la unión máxima de cada factor de transcripción observado en ausencia de competidor; Ab = anticuerpo, n=1-3.

45 **Fig. 3. A. Sensibilidad SqRT-PCR.** Se llevó a cabo la detección mediante la PCR del ARNm de *CDKSR1* y *ACTB* utilizando una cantidad constante de material de ADNc de partida y número creciente de ciclos de PCR. Los tamaños de las bandas *CDK5R1* y *ACTB* son respectivamente de 711 nt y 198 nt (panel izquierdo). Los resultados indicaron una relación lineal entre las intensidades de la señal y el número de ciclos de la PCR (derecha); línea negra: *ACTB*, línea gris: *CDK5R1*, DO = densidad óptica de la banda. **B. Regulación en exceso del ARNm de *CDK5R1*.** Se muestran imágenes de geles usuales de la detección del ADNc de *CDKSR1* antes y después del tratamiento con vitaminas. Se muestra también la presencia de ARNm de *EGR1* en el control y en células HL60 tratadas con vitaminas. **C. Transfección de señuelos en células HL60.** Campo brillante y fotografías fluorescentes correspondientes de células HL60 24 h después de la transfección de la SEQ ID NO.: 40 con fluoresceína (500 nM). El campo de transfección calculado es del 70 %; n = 3. **D. Toxicidad del señuelo.** Se midió el porcentaje de células HL60 muertas 48 horas después de la transfección tanto de la SEQ ID NO.: 40 o la SEQ ID NO.: 42 (500 y 1000 µM) utilizando la técnica de exclusión del azul de tripano; se proporcionan los valores como promedio ± SEM, n=2-4. **E. Control de la especificidad del señuelo.** La detección del ADNc desveló un aumento de tres veces en el nivel de expresión del ARNm de *CDK5R1* tras el tratamiento con 1,25-dihidroxivitamina D3. La especificidad del tratamiento con el señuelo se controló comparando el nivel de

inhibición de la expresión del ARNm de *CDK5R1* conferido por la SEQ ID NO.: 42 y la secuencia control SEQ ID NO.: 43/46 (gráfica izquierda). la especificidad se controla adicionalmente mostrando la ausencia de efecto de la SEQ ID NO.: 42 sobre la regulación del gen *BCL2* (gráfica derecha). se transfectaron las secuencias señuelo a 500 nM. Se proporcionan los valores como promedio \pm SEM, se normalizaron los niveles de expresión del ARNm frente al ARNm del *ACTB* (unidades arbitrarias); CTR = control, VIT = tratamiento con 1,25-Dihidroxivitamina D3. * = diferente del control, $p < 0,01$, $n = 2-4$.

Fig. 4. Respuestas a las dosis. Se midió el nivel de expresión del ARN de *CDK5R1* mediante la sqRT-PCR tras la transfección de concentraciones crecientes de oligonucleótidos EGR1 señuelos (250 nM, 500 nM, y 1000 nM). Se normalizó el nivel de expresión del ARNm de *CDK5R1* frente al ARNm de *ACTB* y se proporcionan los resultados como un porcentaje de inhibición del nivel de expresión máxima de *CDK5R1* 48 horas después de la aplicación de la 1,25-Dihidroxivitamina D3. Las concentraciones de la SEQ ID NO.: 40, SEQ ID NO.: 41 y la SEQ ID NO.: 42 necesarias para obtener el 50 % de inhibición de la expresión del ARNm de *CDK5R1* (CI_{50}) fueron de 443 nM, 502 nM, y 136 nM, respectivamente; se proporcionan los valores como promedio \pm SEM, * = diferente de la SEQ ID NO.: 41, $p < 0,05$, $n > 3$. **D. Ilustración de la eficacia de los señuelos.** Se presentan productos representativos de la sqRT-PCR de *CDK5R1* separados en un gel de agarosa al 1 % antes y después del tratamiento tanto con la SEQ ID NO.: 40 o la SEQ ID NO.: 42; CTR = control, VIT = tratamiento con 1,25-Dihidroxivitamina D3.

Fig. 5. A. Transfección de señuelos en células PC12. Campo brillante y fotografías fluorescentes correspondientes de células PC12 24 h después de la transfección de la SEQ ID NO.: 40 conjugada con fluoresceína. El campo de transfección calculado es del 80 %; $n = 3$. **B. Inhibición de la expresión basal de genes del dolor.** Se muestran los niveles de expresión de genes del dolor expresados en células PC12 antes (barras blancas) y 24 h después de la transfección de la SEQ ID NO.: 42 (barras punteadas); se proporcionan los valores como promedio \pm SEM, * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$, $n = 2-5$. **C. Inhibición de la regulación en exceso de los genes del dolor.** Se muestra el nivel de expresión de once genes del dolor 24 h después del tratamiento con NGF + forskolina, antes y después de la transfección de la SEQ ID NO.: 42; se proporcionan los valores como promedio \pm SEM, * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$ para diferentes del control, $n = 2-4$. **D. Ilustración de la inhibición de los señuelos.** Panel izquierdo: gel representativo que muestra las condiciones de control en la detección del ADNc de *Bdkrb2* (C) y después el tratamiento de la SEQ ID NO.: 42 (C+sec). Panel derecho: gel representativo que muestra la detección del ADNc de *Gch1* en el control (C), condiciones de NGF + forskolina (N) y NGF + forskolina + SEQ ID NO.: 42 (N+sec). **E. Control de la especificidad del señuelo.** Los genes *Gch1* y *Nos1* se regularon en exceso fuertemente por el tratamiento con NGF+ forskolina (control = barras blancas, NGF + forskolina = barras negras). Se comprobó la especificidad del tratamiento del señuelo en células PC12 que muestran la ausencia del efecto por la secuencia del control SEQ ID NO.: 43/46 (barras grises) sobre la regulación en exceso de los genes *Gch1* y *Nos1*, en comparación con la SEQ ID NO.: 42 (barras punteadas). Se transfectaron los señuelos a 500 nM. Se proporcionan los valores como promedio \pm SEM, se normalizaron los valores de expresión basándose en el nivel de expresión de *Gapdh* (unidades arbitrarias).

Fig. 6. A. Unión y especificidad de los señuelos. Se desarrollaron los ELISA tal como se ha descrito previamente con la SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12, y la SEQ ID NO.: 15 (128 nM) biotiniladas. Se utilizaron anticuerpos primarios CREB/ATF, SP1, RUNX1 y NFATC1, respectivamente, para detectar la unión al factor de transcripción a las secuencias (barras blancas). Se comprobó la especificidad de cada unión en presencia de los respectivos competidores (2 μ M, barras negras). **B. Inhibición de la regulación en exceso de los genes del dolor.** *Bdnf*, *Scn9a*, *Cdk5r1*, Los genes *Pnmt* y *Nos1* se regularon en exceso 24 h después del tratamiento con NGF + forskolina (control = barras blancas, NGF + forskolina = barras negras). la gráfica muestra el efecto de los tratamientos con señuelos con la SEQ ID NO.: 4 (barras discontinuas horizontales), SEQ ID NO.: 12 (barras punteadas pequeñas), y la SEQ ID NO.: 15 (barras punteadas grandes); se proporcionan los valores como promedio \pm SEM, se normalizaron los valores de expresión basándose en el nivel de expresión de *Gapdh* (unidades arbitrarias); ** $p < 0,1$, ** $p < 0,05$ para diferentes del control, $n = 2-5$.

Fig. 7. A. Unión de EGR1 señuelos compuesto. Se usó la SEQ ID NO.: 40 como una sonda (128 nM) en presencia de concentraciones crecientes de competidor, la SEQ ID NO.: 45 señuelo del oligonucleótido compuesto, 45, en ELISA. Se proporciona la curva de inhibición obtenida de la SEQ ID NO.: 41 competidora como una comparación. Se proporcionan los datos como un porcentaje de la unión máxima a hEGR1 obtenida con la sonda en ausencia de competidor; $n = 1-3$. **B. Unión a CREB/ATF y NFAT.** Se midió la unión de la SEQ ID NO.: 45 a los factores hCREB/hATF y hNFATC1 usando el ELISA de competición. Para la unión de hCREB/hATF, se usó la SEQ ID NO.: 4 como una sonda y la SEQ ID NO.: 45 como un competidor. para la unión de hNFATC1, se usó la SEQ ID NO.: 15 como una sonda y la SEQ ID NO.: 45 como un competidor. Las barras blancas representan la unión de cada sonda sola (128 nM), las barras negras representan la unión de cada sonda en presencia de un competidor (2 μ M). **C. Respuestas a las dosis.** Se midió la eficacia de la SEQ ID NO.: 45 en la inhibición de la actividad de hEGR1 en células HL60 tras la inhibición de la expresión de *CDK5R1*. Se muestran a efectos de comparación las curvas de inhibición del ARNm de *CDK5R1* de la SEQ ID NO.: 45 y la SEQ ID NO.: 41; se normalizó el nivel de expresión de *CDK5R1* frente a *ACTB*, se proporcionan los promedios \pm SEM como un porcentaje de inhibición del nivel de expresión máxima de *CDK5R1* 48 h después de la aplicación de 1,25-Dihidroxivitamina D3; $n=2-4$. **D. Inhibición de los genes del dolor.** Inhibición relativa de los genes *Bdkrb2*

y *Scn9a* en células PC12 mediante tratamientos independientes con cualquiera de la SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 15, SEQ ID NO.: 42, o la SEQ ID NO.: 45. Se transfectaron los señuelos a 500 nM; se proporciona los valores como promedios \pm SEM, se normalizaron los valores de expresión basándose en el nivel de expresión de *Gapdh* (unidades arbitrarias); *p < 0,1, **p < 0,05 para diferentes de cualquiera de la SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 15 o la SEQ ID NO.: 42.

Fig. 8. A. SEQ ID NO.: 42 en el día 1. Se evaluó la sensibilidad mecánica de las ratas en el día 1 posterior a la inyección CFA utilizando los filamentos de Von Frey de 2 fuerzas diferentes: 1 gramo y 6 gramos. Se evaluaron las condiciones de tratamiento del vehículo y la SEQ ID NO.: 42. **B. SEQ ID NO.: 42 en el día 4.** Se evaluó la sensibilidad mecánica de nuevo en el día 4 posterior a CFA. De nuevo, se evaluaron las condiciones de tratamiento del vehículo y la SEQ ID NO.: 42; se proporcionan los valores como promedios \pm SEM n = 7.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

"Unión", como se usa en el contexto de unión de los factores de transcripción a los oligonucleótidos señuelo, se refiere a una interacción directa (por ejemplo, una unión no covalente entre el factor de transcripción y el oligonucleótido señuelo, incluyendo enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, etc.) entre un factor de transcripción y un oligonucleótido señuelo. De acuerdo con ello, un oligonucleótido que no se une a un factor de transcripción no interactúa directamente con dicho factor de transcripción.

"Crónico", se refiere a un periodo de tiempo que comprende meses (por ejemplo, al menos dos meses) o años.

"Compuestos" se refiere a oligonucleótidos bicatenarios, denominados también en el presente documento oligonucleótidos señuelo. Los compuestos descritos en el presente documento pueden contener uno o más centros quirales y/o dobles enlaces y, por tanto, pueden existir como estereoisómeros, tales como isómeros de doble enlace (es decir, isómeros geométricos), enantiómeros o diastereómeros. De acuerdo con ello, las estructuras químicas representadas gráficamente en el presente documento abarcan todos los posibles enantiómeros y estereoisómeros de los compuestos ilustrados incluyendo las formas estereoisoméricamente puras (por ejemplo, geométricamente puras, enantioméricamente puras o diastereoméricamente puras) y las mezclas enantioméricas y estereoisoméricas. Las mezclas enantioméricas y estereoisoméricas se pueden resolver en sus enantiómeros o estereoisómeros componentes utilizando técnicas de separación o técnicas de síntesis quiral bien conocidas por los técnicos expertos. Los compuestos pueden existir también en varias formas tautómeras incluyendo la forma enol, la forma ceto y sus mezclas. De acuerdo con ello, las estructuras químicas representadas gráficamente en el presente documento abarcan todas las posibles formas tautómeras de los compuestos. Los compuestos descritos en el presente documento incluyen compuestos marcados isotópicamente en el que uno o más átomos tienen una masa atómica diferente de la masa atómica que se encuentra convencionalmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar a los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , etc. Los compuestos pueden existir en formas no solvatadas, así como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas y como N-óxidos. En general, los compuestos se pueden hidratar, solvatar como N-óxidos. Determinados compuestos pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. Todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados en el presente documento. Adicionalmente, deberá entenderse, cuando se ilustran las estructuras parciales de los compuestos, que los paréntesis indican el punto de unión de la estructura parcial al resto de la molécula.

"Modulación del nivel de expresión génica" se refiere a cualquier cambio en el nivel de expresión génica incluyendo una inducción o activación (por ejemplo, un aumento en la expresión génica), una inhibición o supresión (por ejemplo, una disminución en la expresión génica), o una citoquina (por ejemplo, prevención de la regulación en exceso o de la regulación en defecto de un gen que se produce ordinariamente en respuesta a un estímulo, tal como un estímulo inducido por dolor).

"Señalización nociceptiva" se refiere a mecanismos moleculares y celulares implicados en la detección de un estímulo nocivo o de un estímulo potencialmente perjudicial, que conduce a la percepción del dolor, incluyendo la síntesis y liberación de neurotransmisores, la señalización inducida por neurotransmisores, despolarización de la membrana, y episodios de señalización intracelulares e intercelulares relacionados.

"Oligonucleótido" se refiere a cualquier polímero que contiene ácido nucleico bicatenario generalmente aproximadamente menor de 200 nucleótidos (o 100 pares de bases) e incluyendo, pero no de forma limitativa, ADN, ARN y ARN-ADN híbridos. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases de ADN y ARN conocidos, pero no de forma limitativa, 2,6-diaminopurina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, ácido uracil-5-oxiacético, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, metiléster del ácido N-uracil-5-oxiacético, queosina, 2-tiocitosina, 5-bromouracilo, metilfosfonato, fosforoditioato, ormacetal, 3'-tioformacetal, estructura principal de nitroxido, sulfona, sulfamato, derivados de morfolino, derivados de "ácido nucleico bloqueado" (LNA), y/o derivados de ácido nucleico peptídico (PNA). En

algunas realizaciones, el oligonucleótido está compuesto por dos oligonucleótidos monocatenarios complementarios que se hibridan juntos. En otras realizaciones, el oligonucleótido está compuesto por un oligonucleótido monocatenario que forma pares de bases intramoleculares para crear una estructura sustancialmente bicatenaria.

5 "Dolor" se refiere a una sensación desagradable y una experiencia emocional que está asociada con daño al tejido real o potencial o que se describe en dichos términos. Todas las diferentes manifestaciones y calidades del dolor, incluyendo el dolor mecánico (por ejemplo, inducido por estímulo mecánico o por movimiento del cuerpo), dolor inducido por temperatura (por ejemplo, dolor inducido por calor, temperaturas calientes y/o frías), y dolor inducido químicamente (por ejemplo, dolor inducido por un agente químico). En determinadas realizaciones, el dolor es crónico, subcrónico, agudo, o subagudo. En determinadas realizaciones, el dolor caracteriza hiperalgesia (es decir, una sensibilidad aumentada a un estímulo doloroso) y/o alodinia (es decir, una respuesta dolorosa a un estímulo usualmente no doloroso). En determinadas realizaciones, el dolor es preexistente en un paciente. En otras realizaciones, el dolor es iatrogénico, inducido en un paciente (por ejemplo, dolor postoperatorio).

15 "Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de un compuesto, que posee la actividad farmacológica deseada del presente compuesto. Dichas sales incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidribenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxi-etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluensulfónico, ácido alcanforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido terc-butilacético, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico, y similares; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto progenitor se sustituye por un ion metálico, por ejemplo, un ion de metal alcalino, un ion alcalinotérreo, o un ion de aluminio; o coordinadas con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metil-glucamina y similares.

30 "Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra el compuesto de la invención.

"Paciente" incluye cualquier animal, incluyendo pájaros, mamíferos, primates, y seres humanos.

35 "Prevenir" o "prevención" se refiere a (1) una reducción en el riesgo de adquirir una enfermedad o trastorno (por ejemplo, producir que al menos uno de los síntomas clínicos de una enfermedad no se desarrollen en un paciente que puede estar expuesto a o predispuesto a la enfermedad pero que no experimenta o muestra aún los síntomas de la enfermedad), o (2) una reducción en la posible gravedad de un síntoma asociado con una enfermedad o trastorno (por ejemplo, reducir la posible gravedad de al menos los síntomas clínicos de una enfermedad en un paciente que puede estar expuesto a o predispuesto a la enfermedad pero que no experimenta o muestra aún los síntomas de la enfermedad).

"Sub agudo", se refiere a un periodo de tiempo que comprende horas (por ejemplo, 1 h-24 h).

45 "Subcrónico", se refiere a un periodo de tiempo que comprende días o meses (por ejemplo, menos de dos meses).

"Tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en algunas realizaciones, para mejorar la enfermedad o el trastorno (es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de sus síntomas clínicos). En otras realizaciones "tratar" o "tratamiento" se refiere a mejorar al menos un parámetro físico, que puede no ser discernible por el paciente. En otras realizaciones más adicionales, "tratar" o "tratamiento" se refiere a inhibir la enfermedad o el trastorno, tanto físicamente, (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico) o ambos. En otras realizaciones más adicionales, "tratar" o "tratamiento" se refiere a retrasar el inicio de la enfermedad o trastorno.

55 "Cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un paciente, es suficiente para efectuar dicho tratamiento de una enfermedad o dolencia concreta. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la enfermedad, la gravedad de la enfermedad, y la edad, peso, etc., del sujeto que se va a tratar.

60 Se hará referencia ahora en detalle a las realizaciones preferidas de la invención. Aunque la invención se describirá junto con las realizaciones preferidas, se entenderá que no está previsto que la invención se limite a las realizaciones preferidas.

Oligonucleótidos señuelo

65 La presente invención se refiere a oligonucleótidos señuelo, sus composiciones farmacéuticas, y el uso de dichos

oligonucleótidos señuelo y sus composiciones farmacéuticas para modular la señalización nociceptiva y para prevenir y/o tratar el dolor.

La invención proporciona un oligonucleótido señuelo de acuerdo con la reivindicación 1.

5 En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos señuelo comprenden dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.) sitios de unión al factor de transcripción.

10 La posición relativa de los dos o más sitios de unión al factor de transcripción en el señuelo puede modular (por ejemplo, aumenta o disminuye) la afinidad de unión entre un factor de transcripción diana (es decir, el factor de transcripción de un sitio de unión concreto se diseña para unirse a) y su sitio de unión al factor de transcripción, por ejemplo, en comparación con la afinidad de unión entre el factor de transcripción y un señuelo que tiene un único sitio de unión al factor de transcripción (por ejemplo, un sitio de unión consenso) específico del factor de transcripción. De esta manera, la posición relativa de los dos sitios de unión al factor de transcripción en un oligonucleótido señuelo de la invención puede aumentar la afinidad del oligonucleótido señuelo para un factor de transcripción diana (por ejemplo, para uno o más de los factores de transcripción dirigidos por el señuelo). El aumento en la afinidad del oligonucleótido señuelo para un factor de transcripción diana es de 1,2 veces o más (por ejemplo, aproximadamente 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0 veces, o más). La posición relativa de los dos sitios de unión al factor de transcripción en un oligonucleótido señuelo puede promover interacciones proteína-proteína entre los factores de transcripción unidos a los sitios, por ejemplo, homodimerización o heterodimerización de los factores de transcripción. Dichas interacciones proteína-proteína entre los factores de transcripción pueden estabilizar sus interacciones, por ejemplo, la unión, al oligonucleótido señuelo, aumentando por tanto la afinidad de unión del oligonucleótido señuelo para uno o más de los factores de transcripción diana.

25 El factor de transcripción que se une a un sitio de unión al factor de transcripción presente en un oligonucleótido señuelo puede ser un factor de transcripción humano. El factor de transcripción que se une a un sitio de unión al factor de transcripción en un oligonucleótido señuelo puede ser un factor de transcripción no humano, por ejemplo, un ave, mamífero (por ejemplo, ratón, rata, perro, gatos, caballo, vaca, etc.), o primate.

30 Los sitios de unión al factor de transcripción de un oligonucleótido señuelo se pueden unir, cada uno de ellos, al mismo factor de transcripción.

35 Los sitios de unión al factor de transcripción de un oligonucleótido señuelo se pueden unir a diferentes factores de transcripción, por ejemplo, diferentes miembros de una familia de factores de transcripción estrechamente relacionados (por ejemplo, diferentes miembros de la familia EGR1) o una combinación de factores de transcripción seleccionados entre el grupo que consiste en POU1F1, POU2F, POU3F, POU4F1, POU5F1, USF, EGR1, CREB/ATF, AP1, CEBP, SRF, ETS1, MEF2, SP1, RUNX, NFAT, ELK1, factores complejos ternarios, STAT, GATA1, ELF1, un factor nuclear de granulocitos/macrófagos, HNF1, ZFX3, IRF, TEAD1, TBP, NFY, factores de unión a la secuencia cacc, KLF4, KLF7, IKZF, MAF, REST, HSF, factores de transcripción KCNIP3 y PPAR.

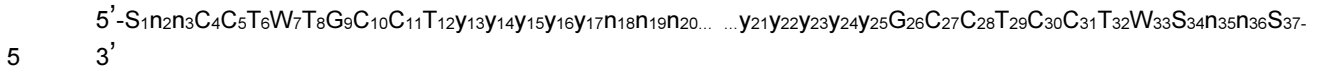
45 Los sitios de unión al factor de transcripción de un oligonucleótido señuelo pueden estar separados entre sí mediante una secuencia enlazadora. Las secuencias enlazadoras pueden ser de 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más pares de bases de longitud. Normalmente, las secuencias enlazadoras tendrán de dos a cinco pares de bases de longitud. Los sitios de unión al factor de transcripción pueden ser inmediatamente adyacentes entre sí (por ejemplo, no está presente secuencia enlazadora) o solapamiento. En los casos en los que los sitios de unión al factor de transcripción se solapan, los sitios de unión al factor de transcripción pueden compartir 1, 2, 3, 4, 5, o más pares de bases. Como alternativa, uno o ambos sitios de unión al factor de transcripción pueden carecer de pares de bases que de otra manera forman parte de una secuencia de unión consenso para el(los) facto(es) de transcripción que se une al sitio. En general, sin embargo, pares de bases que son críticos para la interacción de unión entre un sitio de unión al factor de transcripción y los factores de transcripción que se unen al sitio (por ejemplo, pares de bases que son esencialmente invariantes en una secuencia de unión consenso para un factor de transcripción concreto) no se comparten o desaparecen cuando se solapan las secuencias de unión de la transcripción.

55 Los oligonucleótidos señuelo pueden comprender secuencias flanqueantes localizadas en cada extremo de la secuencia señuelo. Las secuencias flanqueantes pueden ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más pares de bases de longitud. En general, las secuencias flanqueantes son de dos a cinco pares de bases de longitud. Las secuencias 5' flanqueantes pueden comenzar con un par de bases G/C y secuencias 3' flanqueantes que terminan en un par de bases G/C. Las secuencias flanqueantes pueden no formar parte de un sitio de unión a un factor de transcripción y/o no interactúan o unen a factores de transcripción. Las secuencias flanqueantes pueden formar interacciones débiles con los factores de transcripción unidos a un sitio de unión de un factor de transcripción adyacente.

65 Los oligonucleótidos señuelo tienen generalmente al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más pares de bases de longitud. Los oligonucleótidos señuelo tienen generalmente menos de 65, 60, 55, 50, o 45 pares de bases de longitud. Los oligonucleótidos señuelo pueden tener aproximadamente de 20 a 40 pares de bases de longitud. Los oligonucleótidos señuelo pueden tener aproximadamente de 20 a 35, 25 a 40, o 25 a 35 pares de bases de longitud.

El oligonucleótido señuelo comprende una secuencia bicatenaria representada por la fórmula (32):

(32)



10 en la que "A" es un nucleótido de adenina, "C" es un nucleótido citosina, "G" es un nucleótido guanina, "T" es un nucleótido timina, "S" puede ser un nucleótido G o C, "N" puede ser cualquier nucleótido, "Y" puede ser T o C, "W" puede ser A o T, se pueden eliminar opcionalmente letras minúsculas, y los números en subíndice representan la posición de un nucleótido en la secuencia. Aunque la fórmula muestra una única cadena, debe entenderse que se incluye una cadena complementaria como parte de la estructura. El oligonucleótido señuelo que tiene una secuencia representada por la fórmula (32) tiene al menos aproximadamente una identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO.: 32. Dichos oligonucleótidos señuelo se unen al factor de transcripción KLF4.

15 Dichos oligonucleótidos señuelo pueden unirse a uno o más factores de transcripción relacionados estrechamente con el factor de transcripción KLF4, tales como KLF-1, -5.

20 Un oligonucleótido señuelo representado por la fórmula (32) puede comprender una deleción de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13) nucleótidos seleccionados entre el grupo que consiste en y₁₃, y₁₄, y₁₅, y₁₆, y₁₇, n₁₈, n₁₉, n₂₀, y₂₁, y₂₂, y₂₃, y₂₄ e y₂₅. Los oligonucleótidos señuelo comprenden una deleción de uno o más nucleótidos seleccionados entre el grupo que consiste en y₁₃, y₁₄, y₁₅, y₁₆, y₁₇, n₁₈, n₁₉, n₂₀, y₂₁, y₂₂, y₂₃, y₂₄ y y₂₅ tienen al menos un 50 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO.: 32.

25 Un oligonucleótido bicatenario que tiene un porcentaje determinado (por ejemplo, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 %) de identidad de la secuencia con otra secuencia significa que, cuando se alinean, este porcentaje determina el nivel de correspondencia de la disposición de bases en comparación con las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad pueden determinarse utilizando cualquier programa de software conocido en la materia que permite la alineación local. El programa de software debe ser capaz de encontrar regiones de identidad local entre dos secuencias sin necesidad de incluir la longitud completa de las secuencias. En algunas realizaciones, dicho programa incluye, pero no se limita al Algoritmo EMBOS de Alineación por Parejas (disponible del European Bioinformatics Institute (EBI)), el programa ClustalW (disponible también del European Bioinformatics Institute (EBI)), o el programa BLAST (BLAST Manual, Altschul y col., Natl Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, Md., y Altschul et al., (1997) NAR 25:3389 3402).

35 Un experto en la materia reconocerá que las secuencias divulgadas en el presente documento incluyen aquellas que se hibridan en condiciones de hibridación restrictivas con una secuencia ejemplificada (por ejemplo, las SEQ ID NO.: 1-42, 45, y 47-53). Un ácido nucleico es hibridable con otro ácido nucleico cuando una forma monocatenaria del ácido nucleico puede hibridarse con otro ácido nucleico monocatenario en las condiciones adecuadas de temperatura y una solución de fuerza iónica. Las condiciones de hibridación son bien conocidas en la materia. En algunas realizaciones, se puede producir la hibridación durante una lenta disminución de la temperatura desde una temperatura de desnaturalización (por ejemplo, 100 °C) a temperatura ambiente en una sal que contiene un disolvente (por ejemplo, tampón Tris-EDTA).

45 En general, los oligonucleótidos señuelo descritos en el presente documento se pueden usar para unirse y, por ejemplo, inhibir, por tanto, los factores de transcripción que modulan la expresión de los genes implicados en la señalización nociceptiva y/o la percepción del dolor de un sujeto (por ejemplo, del paciente). Un oligonucleótido señuelo descrito en el presente documento diseñado para unirse a un factor de transcripción específico tiene una secuencia de ácido nucleico que imita la secuencia de ADN genómico endógeno unida normalmente mediante el factor de transcripción.

50 De acuerdo con ello, el oligonucleótido señuelo descrito en el presente documento inhibe una etapa necesaria para la expresión génica. Adicionalmente, los oligonucleótidos señuelo descritos en el presente documento pueden unirse a numerosos factores de transcripción diferentes.

55 Los oligonucleótidos señuelo descritos en el presente documento pueden modificarse químicamente mediante métodos bien conocidos por el técnico experto (por ejemplo, incorporación del fosforotionato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosfoamidatos, carbonatos, tioéter, siloxano, acetamidato o enlaces carboximetil éster entre nucleótidos) para prevenir la degradación por nucleasas en las células y los fluidos extracelulares (por ejemplo, suero, fluido cerebroespinal). Asimismo, los oligonucleótidos señuelo pueden diseñarse de tal manera que formen estructuras de horquillas y pesas que también pueden prevenir o impedir la degradación de la nucleasa. Adicionalmente, los oligonucleótidos señuelo pueden también insertarse como una porción de un plásmido más grande capaz de mantenimiento episómico o replicación constitutiva en la célula diana a fin de proporcionar una exposición intracelular potenciada a largo plazo a la secuencia señuelo y/o reducir su degradación. De acuerdo con ello, cualquier modificación química o alteración estructural conocida en la materia que potencie la estabilidad del oligonucleótido están comprendida en el alcance de la presente divulgación. En algunas realizaciones, los

oligonucleótidos señuelo descritos en el presente documento pueden unirse, por ejemplo, a polímeros de polietilenglicol, péptidos (por ejemplo, un dominio de translocación de la proteína) o proteínas que mejoran el efecto terapéutico de los oligonucleótidos señuelo. Dichos oligonucleótidos señuelo modificados pueden atravesar preferentemente la membrana celular.

5 Los oligonucleótidos señuelo se pueden proporcionar como sales, hidratos, solvatos, o derivados de N-óxidos. Los oligonucleótidos señuelo se pueden proporcionar en solución (por ejemplo, una solución salina que tiene un pH fisiológico) o en forma liofilizada. Los oligonucleótidos señuelo se pueden proporcionar en liposomas.

10 Uno o más oligonucleótidos señuelo se pueden proporcionar en un kit. El kit puede incluir una instrucción, por ejemplo, para usar dicho uno o más oligonucleótidos señuelo. Dicha instrucción puede describir uno o más de los métodos divulgados en el presente documento, por ejemplo, un método para prevenir o tratar el dolor, un método para modular la expresión génica en una célula, un método para modular la señalización nociceptiva en una célula, un método para modular la degradación de las proteínas en una célula, etc. Los oligonucleótidos señuelo proporcionados en un kit se pueden proporcionar en forma liofilizada. Un kit que comprende uno o más oligonucleótidos señuelo liofilizados puede comprender además una solución (por ejemplo, una solución salina farmacéuticamente aceptable) que se puede usar para resuspender dichos uno o más de los oligonucleótidos señuelo.

20 Los oligonucleótidos bicatenarios descritos en el presente documento pueden prepararse mediante métodos convencionales conocidos en la materia y de esta manera están también comprendidos en el ámbito del técnico experto.

Composiciones farmacéuticas

25 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más oligonucleótidos señuelo, preferiblemente, preferentemente, en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de un vehículo farmacéuticamente aceptable, de manera que se proporcione una forma de administración correcta a un paciente. Cuando se administra a un paciente, los oligonucleótidos señuelo y los portadores farmacéuticamente aceptables son preferiblemente estériles. El agua es un vehículo preferido cuando los oligonucleótidos señuelo se administran por vía intravenosa. Los sueros salinos y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden utilizar como vehículos líquidos, especialmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, cal, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las presentes composiciones farmacéuticas, si se desea, también pueden incluir cantidades poco importantes de agentes mojanteros o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Además, también se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes.

40 Las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar por medio de procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de forma convencional usando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares farmacéuticamente aceptables, que facilitan el procesamiento de los compuestos descritos en el presente documento para obtener preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

50 Las presentes composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, aglomerados, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación continua, supositorios, aerosoles, pulverizadores, suspensiones, o cualquier otra forma adecuada para su uso. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se han descrito en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Philadelphia College of Pharmacy and Science, 19ª Edición, 1995).

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en la forma de comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes, o elixires, por ejemplo. 55 Las composiciones administradas por vía oral pueden incluir uno o más agentes opcionales, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartame o sacarina, agentes aromatizantes tales como piperita, aceite de gaulteria, o agentes colorantes de cereza y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéuticamente sabrosa. Además, ya sea en forma de comprimido o de píldora, las composiciones se pueden revestir para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal, proporcionando de esta manera una acción sostenida durante un periodo de tiempo prolongado. Las composiciones orales pueden incluir vehículos convencionales tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Dichos vehículos son, preferiblemente, de calidad farmacéutica.

65 Para preparaciones líquidas orales tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, los portadores, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, solución salina, alquilenglicoles (por ejemplo, propilenglicol), polialquilenglicoles (por ejemplo, polietilenglicol), aceites, alcoholes, tampones ligeramente ácidos entre pH 4 y pH 6

(por ejemplo, acetato, citrato, o ascorbato entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM), etc. Adicionalmente, se pueden añadir agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes, sales biliares, acilcarnitinas y similares.

5 También se pueden tener en cuenta composiciones para su administración mediante otras vías. Para administración bucal, las composiciones pueden estar en la forma de comprimidos, pastillas para chupar, etc., formuladas de forma convencional. Las formulaciones de fármaco en estado líquido adecuadas para su uso con nebulizadores y dispositivos de pulverización de líquidos y dispositivos de aerosol de tipo EHD suelen incluir un compuesto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un líquido tal como alcohol, agua, polietilenglicol o un perfluorocarbono. Opcionalmente, se puede añadir otro material que altere las propiedades de aerosol de la solución o suspensión de compuestos. Preferentemente, este material es un líquido tal como un alcohol, glicol, poliglicol o un ácido graso. Otros métodos para formular soluciones o suspensiones de fármaco en medio líquido adecuadas para su uso en dispositivos de aerosol son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Biesalski, patente de Estados Unidos n.º 5.112.598; Biesalski, patente de Estados Unidos n.º 5.556.611). También se puede formular un compuesto en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos. Además de las formulaciones anteriormente descritas, un compuesto también se puede formular como preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante un implante (por ejemplo, de forma subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. De esta manera, por ejemplo, se puede formular un compuesto con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, en forma de emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados muy poco solubles, por ejemplo, una sal muy poco soluble.

25 Se puede incluir un oligonucleótido señuelo en cualquiera de las formulaciones anteriormente descritas, o en cualquier otra formulación adecuada, en forma de una sal, solvato o hidrato farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables retienen sustancialmente la actividad del compuesto precursor y se puede preparar mediante la reacción con las bases o ácido adecuados y tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que la forma precursora correspondiente.

30 Usos terapéuticos

Tal como se describe en el presente documento, un oligonucleótido señuelo y/o composición farmacéutica del mismo se administra a un paciente, tal como un animal (por ejemplo, un ave, mamífero, primate, o ser humano), que padece dolor que incluye, pero no de forma limitativa, dolor mecánico (por ejemplo, hiperalgesia mecánica y/o alodinia), dolor químico, dolor debido a temperatura, dolor crónico, dolor subcrónico, dolor agudo, dolor subagudo, dolor inflamatorio, dolor neuropático, dolor muscular, dolor esquelético, dolor postquirúrgico, dolor debido a artritis, y dolor debido a diabetes. Los oligonucleótidos señuelo y/o composiciones farmacéuticas del mismo se administran a un paciente, tal como un animal, como medida preventiva contra el dolor, que incluye, pero no de forma limitativa, dolor postquirúrgico, dolor crónico, dolor inflamatorio, dolor neuropático, dolor muscular, y dolor esquelético. Los oligonucleótidos señuelo y/o sus composiciones farmacéuticas se pueden utilizar en la prevención de una faceta del dolor, mientras que al mismo tiempo se trata otro síntoma del dolor.

45 Se divulgan en el presente documento métodos para tratar el dolor en un paciente que comprende administrar a un paciente que padece dolor una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido señuelo descrito en el presente documento. Se divulgan en el presente documento métodos para prevenir el dolor. Dichos métodos comprenden administrar a un paciente que lo necesita (por ejemplo, un paciente que puede desarrollar dolor, por ejemplo, dolor postquirúrgico) una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido señuelo descrito en el presente documento. Tal como se describe en el presente documento, el oligonucleótido señuelo se puede administrar por vía perineural, epidural/peridural, intratecal, o por vía intradérmica.

50 Se divulgan en el presente documento métodos para tratar o prevenir el dolor en un paciente que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido señuelo, en el que el oligonucleótido señuelo no se une a los factores de transcripción AP1, ETS1 y STAT.

55 Se divulgan en el presente documento métodos para tratar o prevenir el dolor en un paciente que comprende administrar al paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más oligonucleótidos señuelo, en el que los oligonucleótidos señuelo se unen a uno o más factores de transcripción seleccionados del grupo que consiste en los factores de transcripción AP1, ETS1, y STAT, siempre que el dolor no sea dolor lumbar debido a un trastorno del disco intervertebral.

60 Se divulgan en el presente documento métodos para modular la transcripción de un gen presente en una célula implicada en la señalización nociceptiva y/o la percepción del dolor en un paciente. La modulación puede comprender la supresión o la represión de la expresión génica. La modulación puede comprender la estabilización de la expresión génica. La modulación comprende la activación o la inducción de la expresión génica. El gen puede estar implicado en la señalización nociceptiva. Los genes implicados en la señalización nociceptiva incluyen, pero no se limitan a, genes que codifican proteínas de membrana (por ejemplo, canales de iones, receptores de membrana,

etc.), moléculas de señalización solubles (por ejemplo, moléculas de señalización intramolecular o neurotransmisores), enzimas sintéticas (por ejemplo, enzimas de síntesis de neurotransmisores), y factores de transcripción. Los ejemplos específicos de dichos genes incluyen, pero no se limitan a, *BDKRB2*, *HTR3A*, *SCN9A*, *BDNF*, *GRM5*, *NOS1*, *GCH1*, *CDK5R1*, *CACNA1B*, *P2XR3* y *PNMT*.

5 Se divulgan en el presente documento métodos para modular la señalización nociceptiva en una célula. La modulación puede comprender la supresión o la represión de la señalización nociceptiva. La modulación de la señalización nociceptiva en una célula puede comprender modular, por ejemplo, aumentar, la proteólisis de una proteína implicada en la señalización nociceptiva en dicha célula. Por ejemplo, una actividad de proteosoma anormalmente elevada se ha vinculado con importantes déficits de la plasticidad neuronal (es decir, un rasgo importante del dolor celular). Se sabe que EGR1 reprime la expresión de factores del proteosoma seleccionados, limitando de esta forma la actividad de señalización nociceptiva dependiente de EGR1. Adicionalmente, las neurofinas activan receptores específicos en neuronas del dolor que desencadenan la señalización nociceptiva. Los factores USF activan la expresión de CGRP y sustancia P, dos neurofinas importantes que pueden inducir dolor. La inhibición de los factores USF es una aproximación potencial a la inhibición de la señalización nociceptiva. La modulación puede comprender la activación de un inhibidor de la señalización nociceptiva.

20 Se divulgan en el presente documento métodos para modular, por ejemplo, aumentar, la degradación proteolítica de una proteína implicada en la señalización nociceptiva en una célula. Tal como se describe en el presente documento, la modulación de la degradación de proteínas puede comprender estimular la función del proteosoma. La proteína puede estar implicado en la señalización nociceptiva. Las proteínas implicadas en la señalización nociceptiva incluyen, pero no se limitan a proteínas de membrana (por ejemplo, canales de iones, receptores de membrana, etc.), moléculas de señalización solubles (por ejemplo, moléculas de señalización intramolecular o neurotransmisores), enzimas sintéticas (por ejemplo, enzimas de síntesis de neurotransmisores), y factores de transcripción. Los ejemplos específicos de dichas proteínas incluyen, pero no se limitan a, *BDKRB2*, *HTR3A*, *SCN9A*, *BDNF*, *GRM5*, *NOS1*, *GCH1*, *CDK5R1*, *CACNA1B*, *P2XR3* y *PNMT*.

30 La célula de los diferentes métodos se proporciona *in vivo* (por ejemplo, en un paciente que padece dolor o es probable que padezca dolor). Una célula proporcionada *in vivo* se puede ubicar en diferentes localizaciones que incluyen, pero no de forma limitativa, ganglios de la raíz dorsal y/o de la espina dorsal. La célula de los diferentes métodos se puede proporcionar *in vivo* (por ejemplo, en una placa Petri). La célula puede ser cualquier célula implicada en la señalización nociceptiva, incluidos, pero no de forma limitativa, una neurona (por ejemplo, una neurona de dolor de los ganglios de la raíz dorsal y/o la espina dorsal del sistema nervioso simpático), una célula glial, una célula de tejido de soporte (por ejemplo, fibroblasto), una célula inmune, o una célula de una línea celular (por ejemplo, una célula PC12).

Métodos de administración y dosificación

40 Los métodos divulgados para el tratamiento o prevención del dolor requieren la administración de un oligonucleótido señuelo, o sus composiciones farmacéuticas, a un paciente necesitado de dicho tratamiento o prevención. Los compuestos y/o sus composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal o intestinal, etc.), o por vía oral. La administración puede ser sistémica o local. Se conocen varios sistemas de administración, incluidos, por ejemplo, encapsulación de liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., que se pueden utilizar para administrar un compuesto y/o composición farmacéutica del mismo. Los métodos de administración incluyen, pero no se limitan a, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural/peridural, oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, rectal, por inhalación o tópica, especialmente en los oídos, nariz, ojos, o piel. Se pueden administrar a un paciente uno o más oligonucleótidos señuelo. El modo de administración preferido se deja al criterio del especialista médico, y dependerá, en parte, del sitio de la dolencia médica.

55 Puede ser deseable administrar uno o más oligonucleótidos señuelo localizados en el área que necesita tratamiento. Esto se puede conseguir, por ejemplo, pero no como limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica (por ejemplo, junto con un apósito para heridas quirúrgicas), mediante inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio, o mediante un implante, siendo dicho implante un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, como membranas sialásticas, o fibras. La administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (por ejemplo, el sitio anterior, actual, o esperado) del dolor.

60 Puede ser deseable introducir uno o más oligonucleótidos señuelo en el sistema nervioso mediante cualquier vía adecuada, incluyendo, pero sin restringirse a una inyección intraventricular, intratecal, perineural y/o epidural/peridural. La inyección intraventricular se puede ver facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, conectado a un depósito, tal como un depósito Ommaya.

65 También se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización, o mediante perfusión con un fluorocarbono o un tensioactivo pulmonar sintético.

La cantidad de oligonucleótido señuelo que será eficaz en el tratamiento o prevención del dolor en un paciente dependerá de la naturaleza específica de la dolencia, y se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales conocidas en la materia. Además, se pueden utilizar opcionalmente *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación adecuados. La cantidad de un oligonucleótido señuelo administrado dependerá por supuesto, entre otros factores, el sujeto que se está tratando, el peso del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la forma de administración, y el criterio del médico prescriptor. una sola dosis de oligonucleótido señuelo puede comprender de aproximadamente 5 µg a 5 mg, de 50 µg a 2,5 mg, de 100 µg a 1 mg, 250 µg a 750 µg, o aproximadamente 500 µg de oligonucleótido señuelo por kilogramo de peso corporal.

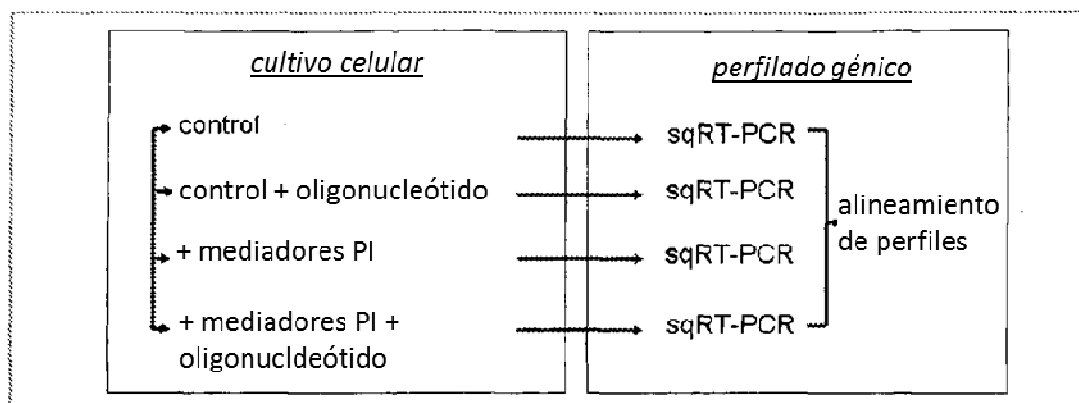
5
10 Las formas farmacéuticas se pueden adaptar para su administración a un paciente no más de dos veces al día, más preferentemente, solamente una vez al día. La dosificación se puede proporcionar en solitario o junto con otros fármacos y puede continuar durante el tiempo necesario para un tratamiento o prevención efectivos del dolor.

Tratamiento combinado

15 Los oligonucleótidos señuelo y/o sus composiciones farmacéuticas se pueden utilizar en un tratamiento combinado con al menos otro agente terapéutico que puede incluir, pero que no se limita a, un oligonucleótido señuelo. El oligonucleótido señuelo y/o su composición farmacéutica y el agente terapéutico pueden actuar de forma aditiva o, más preferentemente, de forma sinérgica. Un oligonucleótido señuelo y/o una composición farmacéutica del mismo se puede administrar en paralelo con la administración de otro agente terapéutico, incluyendo otro oligonucleótido señuelo. Un oligonucleótido señuelo y/o la composición farmacéutica del mismo se puede administrar antes o después de la administración de otro agente terapéutico, incluyendo otro oligonucleótido señuelo.

Protocolos experimentales

25 El modelo experimental consiste en imitar una situación de dolor aplicando a líneas de células neuronales, ganglios de la raíz dorsal (DRG) primaria, y/o neuronas de la espina dorsal una combinación de mediadores proinflamatorios (por ejemplo, factor de crecimiento de nervios, interleuquina-1β, bradiquinina, serotonina, sustancia P, etc.) conocidos por desencadenar la modulación de los genes del dolor. El perfilado de la expresión de los genes del dolor se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa semicuantitativa (sqRT-PCR) en varias situaciones experimentales, incluyendo, pero sin restringirse a, tras la estimulación con un mediador proinflamatorio, con o sin tratamiento con oligonucleótido bicatenario. Se muestra a continuación una revisión del experimento:



Oligonucleótido = oligonucleótido(s) señuelo, PI = mediador(es) proinflamatorio(s), sqRT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa semicuantitativa

35 Las células se cultivaron *in vitro* y se pueden someter a situaciones independientes entre las que se incluyen, pero sin limitación:

- 40
- sin tratamiento, como control de la expresión génica normal;
 - tratamiento con oligonucleótido(s) señuelo para medir el efecto de este último sobre la expresión génica inicial;
 - tratamiento con mediadores proinflamatorios para imitar una situación de dolor *in vivo* alterando la expresión del gen o genes del dolor; y
 - doble tratamiento con mediador(es) proinflamatorio(s) junto con oligonucleótido(s) señuelo para medir el nivel de modulación de este último en una situación análoga al dolor.
- 45

Después del tratamiento se recogieron las células y se extrajo el ARN. Los niveles de expresión de los genes del dolor se midieron posiblemente mediante RT-PCR semicuantitativa y los perfiles de expresión de cada situación se

compararon entre sí.

El tratamiento con oligonucleótido señuelo consiste en transfectar uno o más oligonucleótidos señuelo (en paralelo o en secuencia a un intervalo temporal aún por determinar) de las secuencias seleccionadas entre las SEQ ID NO.: 1-45 a líneas de células neuronales, DRG, y/o neuronas de la espina dorsal. Las líneas celulares incluyen, pero no se limitan a, células PC12 (diferenciadas según NGF o no diferenciadas), células SH-SY5Y, células Weri, HeLa, HEK293, F-11, NS20Y, y ND7/23, o cualquier otra línea celular que exprese uno o más genes que se puedan seleccionar (por ejemplo, *ACCN1-3*, *BDKPB1-2*, *BDNF*, *CACNA1G-H*, *CALCA*, *GRIN1*, *GRM1*, *GRM5*, *HTR1-3*, *NTRK1*, *P2RX3*, *PLC*, *PRKC*, etc.). Se aplica(n) una o más transfecciones al mismo conjunto de células, incluyendo o sin incluir los mismos (o conjunto de) oligonucleótidos señuelo. Las células, tanto las líneas celulares como las neuronas primarias, se recogieron un tiempo después del tratamiento con el oligonucleótido señuelo (por ejemplo, 24 o 48 horas después del tratamiento). La eficacia de la transfección se midió siguiendo la captación de un oligonucleótido señuelo marcado, posiblemente con un colorante tal como fluoresceína. La eficacia se proporciona en forma de porcentaje de células totales que contienen el oligonucleótido señuelo marcado.

Las células cultivadas se recogieron después del tratamiento con oligonucleótido señuelo y se extrajo su ARN. El ARN se transformó en ADNc mediante transcripción inversa. La cantidad de ADNc de cada gen seleccionado, que refleja la cantidad de ARNm endógeno, se midió mediante PCR. La misma cantidad de producto de reacción de la PCR se cargó en un gel de agarosa saturado con bromuro de etidio o cualquier otro agente adecuado para la detección del ADN. La detección del ADN se lleva a cabo bajo una lámpara UV o cualquier otro dispositivo adecuado, y las imágenes de los genes se analizaron mediante un programa informático de cuantificación. La cantidad de ADN producido en cada reacción de la PCR se normalizó con respecto a la cantidad de ADN producido en las reacciones de la PCR de control de los genes constitutivos (por ejemplo, *ACTB*, *GAPDH*) que reflejan la cantidad total de ARN presente inicialmente en las células. La comparación de la relación entre los valores de la señal frente al control para cada gen, con y sin tratamiento(s) con oligonucleótido señuelo proporcionará una medición relativa del impacto de cada oligonucleótido señuelo sobre el nivel de expresión de los genes.

Los experimentos de control con oligonucleótidos bicatenarios incorrectamente emparejados (por ejemplo, la SEQ ID NO.: 43 hibridada con la SEQ ID NO.:46, denominada a partir de ahora en el presente documento como la SEQ ID NO.: 43/46), mezclados, y/o mutados, se lleva a cabo en paralelo para garantizar que los efectos medidos son específicos de cada oligonucleótido señuelo. Se puede medir la viabilidad celular después del tratamiento con oligonucleótido señuelo.

Se puede utilizar la misma solución con los fármacos contra el dolor actuales, tales como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos o coxibs para compararlos con los oligonucleótidos señuelo.

En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos señuelo producen un efecto sobre el modelo o modelos de expresión, que incluye, pero sin limitación, una inhibición y/o una inducción de uno o más gen(es) que pueden estar implicados en la señalización nociceptiva y/o la percepción del dolor en un paciente. En determinadas realizaciones, el gen o genes inhibidos pueden codificar factores pro-dolor, como receptores de los mediadores proinflamatorios, y los genes activados pueden codificar factores anti-dolor, como receptores opioides.

Hibridación de la hebra

Para oligonucleótidos señuelo que consisten en un par de hebras complementarias, las hebras complementarias se hibridan, a concentración equimolar, en un tampón salino, por ejemplo, Tris-EDTA (TE). El procedimiento convencional incluye mantener la solución de ambas hebras a una temperatura de desnaturalización elevada (por ejemplo, 100 °C) durante un periodo de tiempo que puede variar dependiendo de las hebras complementarias, seguido por una disminución lenta de la temperatura (por ejemplo, 0,3-1 °C /min) hasta que la solución alcanza una temperatura de hibridación baja (por ejemplo, 20 °C). La hibridación correcta de las hebras complementarias se puede verificar mediante cualquier técnica convencional adecuada, incluyendo, pero sin restricción a analizar muestras de oligonucleótidos hibridados al lado de los no hibridados en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Para los oligonucleótidos señuelo que sean autohibridables, se sigue sustancialmente el mismo protocolo.

Cultivo celular

Células DRG y/o de la espina dorsal se pueden recoger de un animal (por ejemplo, un mamífero, tal como una rata o un ratón) y las neuronas se disocian en fresco, usando colagenasa (por ejemplo, colagenasa de tipo II) a 37 °C. Las células aisladas de esta forma se pueden sembrar en placas Petri adecuadas (por ejemplo, revestidas con colágeno). Las neuronas se mantuvieron en un medio de cultivo celular adecuado (por ejemplo, DMEM). Las líneas celulares se descongelaron y se mantuvieron en medio adecuado y placas Petri de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Las células se incubaron normalmente a 37 °C, CO₂ al 5 %. Las líneas celulares se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deberán tomarse como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

- 5 Los oligonucleótidos señuelo de la invención incluyen, pero no se limitan a, las secuencias presentadas en la Tabla 1. En general, el oligonucleótido señuelo se genera mediante hibridando la secuencia proporcionada en la tabla con una secuencia complementaria. Para generar un oligonucleótido bicatenario emparejado de forma incorrecta, la secuencia proporcionada en la tabla se puede hibridar con una secuencia que solamente sea parcialmente complementaria. Por ejemplo, la SEQ ID NO.:43 se puede hibridar con la SEQ ID NO.:46 para producir una
- 10 secuencia emparejada incorrectamente, SEQ ID NO.:43/46, descrita en los siguientes Ejemplos.

Tabla 1

Secuencias de oligonucleótidos (5'-3')	SEQ ID NO.:
GGCTTATGCAAATTCGAATGCAAATTTGTCTG	SEQ ID NO.: 1
CTAAGCCCACGTGACCATTGGCCAGGTGACCAGATC	SEQ ID NO.: 2
GTTATGCGTGGGCGATAATGCGGGGGCGTTATAG	SEQ ID NO.: 3
GCCTCCCTGAGCTCATTGACGTATCTCGG	SEQ ID NO.: 4
CGAATATGACTGAGAATGACTCAGATTTGC	SEQ ID NO.: 5
GGTTCTATGATTTTGAATCGGATTGTCAAAGAAGC	SEQ ID NO.: 6
GCTTCAGGATGTCCATATTAGGAGATCTTGTTCG	SEQ ID NO.: 7
GGCCACAGGATGTAGGATGTCCATATTAGGATGC	SEQ ID NO.: 8
GTTCTCTAAAAATAAAAGGCTAAAAATAAAAGTCG	SEQ ID NO.: 9
ATTAGGGGCGGGGTCCGGGGCGGGGTATTA	SEQ ID NO.: 10
GTTATGGCGGGGCGGGGCGGGGCCGGCGGTTTAC	SEQ ID NO.: 11
GGCAATGTGGTTTTAGTGTGGTTTTACGG	SEQ ID NO.: 12
GCCGTTTTGGGGTCATAGAACCACAGGAACCACACGG	SEQ ID NO.: 13
CATTGCCCGGAAATGGACCGGATGTAATTTCC	SEQ ID NO.: 14
GTTCTTGAAAAT AAAT GGAAAAT AGTGAAAAT AAG TCG	SEQ ID NO.: 15
CGTTCCACTTCTGCGACCACTTCTGCCGGG	SEQ ID NO.: 16
CTGCACCTATAAATGGCCTATAAATGGGGATGC	SEQ ID NO.: 17
GCTTATTTGCGGGAAGGTTTCCCGGAAGTGCGG	SEQ ID NO.: 18
GCTGTGCCTTATCTCTTTGGGATAACTGGCG	SEQ ID NO.: 19
GCTTAATGAATAAGAGGAAAAATG CATG CTGG	SEQ ID NO.: 20
GTTCTGAGATTGCACGATGAGATTTACAGTCG	SEQ ID NO.: 21
GTCCCGCATAAATAATGGCATCCTTAATCGCG	SEQ ID NO.: 22
GTGCAGGCAAGAGTAGAGACAGGCAAGAGTAGATGC	SEQ ID NO.: 23
CCGCCAATAATTAATTATTAAGGCC	SEQ ID NO.: 24
GCTTCGTTCCATTTCCGGTCTCGGTTTCCCATTCC	SEQ ID NO.: 25
GCTGCTGTGGAATATCGACCTGTGGAATATCGTG	SEQ ID NO.: 26
GCCGTATAAATGTGCTATAAAAGTTTTAAGACCGTGC	SEQ ID NO.: 27
GCCGTATAAATGTGCTATAAAAGCCGTGC	SEQ ID NO.: 28
ATGCTGCGCTTTTCTCCAATCTGCGG	SEQ ID NO.: 29
CGTTCTCCGATTGGTACAGGACTCTCCGATTGGTACGGC	SEQ ID NO.: 30
GCGCACCCAGCCTGGCTCACCCACGCG	SEQ ID NO.: 31
GATCCTTTGCCTCTTCGATCCTTTGCCTCCTTCAAG	SEQ ID NO.: 32
GGTGTTT G GGAGAGCTTTGGGAGGATACG	SEQ ID NO.: 33
GCTAAT CACTCAG CATTTCGGTGAG GGAAGTGAAAAG	SEQ ID NO.: 34
CCTTTCAGCACCCACGGACAGCGCCAGCTTACGACCCACGGACAGCGCCTCG	SEQ ID NO.: 35
GGATCGAACATGGAGTCAGTGAGAAATCAGGATCGG	SEQ ID NO.: 36
GGATCGAAGCCGGAGTCAAGGAGGCCCTGATCGG	SEQ ID NO.: 37
CCGAAAGGACAAAGGTCAAGTCAAAGGACAAAGGTGAG	SEQ ID NO.: 38
CGGGAGAAAATTCGGGAACGTTCAAGAATTGTCGG	SEQ ID NO.: 39
GTTATGCGTGGGCGTAGATGCGGGGGCGTTATAG	SEQ ID NO.: 40
GATGCGTGGGCGTAGG	SEQ ID NO.: 41
GTATGCGTGGGCGGTGGGCGTAG	SEQ ID NO.: 42
GTTATGCGTTTTGTAGATGCTTTTCGTTATAG	SEQ ID NO.: 43
GTTATGCGTGGGCGATATAG	SEQ ID NO.: 44
GATGCGTGGGCGTTGACGTGGAAAATGC	SEQ ID NO.: 45
CTATTTCAAACGATCTACATTGGCATAAC	SEQ ID NO.: 46
CGTTCCACTTCTGCGACCGG	SEQ ID NO.: 47
GGGTGAAGGCAAGAGTAGAGCGGCGG	SEQ ID NO.: 48
CGTTCTCCGATTGGTACAGCG	SEQ ID NO.: 49
GTACTCCCTTTGCCTCCTTCAACCGG	SEQ ID NO.: 50

Secuencias de oligonucleótidos (5'-3')	SEQ ID NO.:
CCTTATTTCAGCACCCACGGACAGCGCCATTTCG	SEQ ID NO.: 51
GCGAAAGGACAAAGGTCAGGCGG	SEQ ID NO.: 52
GGCTTGCTGTGGAATATCGATGGTG	SEQ ID NO.: 53

Ejemplo 2: Afinidad y especificidad de las secuencias de oligonucleótido señuelo EGR1

5 La SEQ ID NO.: 3, que está diseñada para unirse al factor de transcripción EGR1, tiene una estructura que es típica de la clase de oligonucleótidos señuelo de la invención. La estructura de la SEQ ID NO.: 3 incluye, en orden de 5' a 3', una secuencia flanqueante en 5', un primer sitio de unión al factor de transcripción, una secuencia ligadora, un segundo sitio de unión al factor de transcripción, y una secuencia flanqueante en 3'. La SEQ ID NO.: 40, que tiene un 94 % de identidad con la SEQ ID NO.: 3 y la misma estructura básica, se ha estudiado *in silico* para predecir que su unión con EGR1 es mejor que la de SEQ ID NO.: 3. El análisis farmacológico de la SEQ ID NO.: 40 se llevó a cabo usando un kit ELISA de factor de transcripción específico para detectar la unión a EGR1. La sensibilidad de la tecnología ELISA de factores de transcripción es diez veces más sensible que los experimentos EMSA clásicos, permitiendo estudios farmacológicos detallados de los factores de transcripción señuelo.

10 La hibridación adecuada de las hebras directa e inversa de la SEQ ID NO.: 40 se confirmó en un gel de agarosa al 2,5 %, tal como se muestra en la Fig. 1A. Los extractos de unión se realizaron con la forma humana de EGR1 (hEGR1) presente en extractos nucleares de células K-562 estimuladas con TPA. Véase, por ejemplo, Fig. 18.

15 El ELISA cuantitativo de competición usando la SEQ ID NO.: 40 y la SEQ ID NO.: 41 mostró que la SEQ ID NO.: 40 muestra una intensa actividad de unión a hEGR1, tal como se muestra en la Fig. 2A. En el contexto experimental de los inventores, un valor de la concentración de semiinhibición (CI_{50}) representa la concentración de competidor que proporciona un 50 % de inhibición de la unión de la sonda medida en ausencia del competidor y, por lo tanto, es una medida de las afinidades relativas de las secuencias entre sí. Los resultados indican que la SEQ ID NO.: 40, que incluye dos sitios de unión al factor de transcripción EGR1, soporta una afinidad relativa con hEGR1 similar a la SEQ ID NO.: 41 de consenso, que incluye un único sitio de unión al factor de transcripción EGR1, con valores de CI_{50} de 215 nM y 250 nM, respectivamente.

20 Los inventores han descubierto que la SEQ ID NO.: 42, que es homóloga en un 70 % de la SEQ ID NO.: 3 pero incluye una fusión específica de los dos sitios de unión al factor de transcripción EGR1 presentes en la SEQ ID NO.: 3, tiene una afinidad por EGR1 dos veces mayor que la única secuencia consenso, SEQ ID NO.: 41, con un valor de CI_{50} de 99 nM. Véase la Fig. 2A.

25 Los estudios con experimentos de estructura del cristal han mostrado que una única proteína EGR1 puede unir su secuencia de unión consenso a través de tres dominios de tipo 'dedo de cinc'. Se sabe que las interacciones proteína-proteína pueden alterar directamente las actividades de unión al ADN, tal como se demuestra por los factores AP1 c-jun y c-fos, donde el dímero c-jun:c-fos se une a los elementos sensibles a AP1 de cinco a treinta veces mejor que los dímeros c-jun:c-jun. Sin desear quedar vinculados, los inventores creen que la fusión de los dos sitios de unión al factor de transcripción EGR1 presentes en la SEQ ID NO.: 42 induce interacciones proteína-proteína entre los dos factores EGR1 y de esta forma aumentan mutuamente su afinidad de enlace con el ADN. En cualquier caso, la afinidad muy elevada de la SEQ ID NO.: 42 por EGR1, en comparación con las secuencias de unión conocidas, convierte la SEQ ID NO.: 42 en especialmente atractiva como inhibidor farmacológico de hEGR1.

30 La ausencia de efecto de unión de oligonucleótidos no específicos en los experimentos ELISA de los inventores se demostró por la falta de unión de EGR1 a la secuencia emparejada incorrectamente, SEQ ID NO.: 43/46, como se muestra en la Fig. 1C. Además, los factores de transcripción SP1 y WT1, que están estructuralmente relacionados con EGR1 y pueden unirse a las secuencias de ADN ricas en GC de forma similar a la secuencia de unión EGR1 consenso, se une muy poco a los oligonucleótidos señuelo EGR1. Los experimentos ELISA que detectan la unión a hSP1 demostraron que la SEQ ID NO.: 40 se une muy poco a SP1 en comparación con el oligonucleótido señuelo específico de SP1, SEQ ID NO.: 11, con un valor de DO un 80 % inferior. Véase la Fig. 28 (panel superior). Además, los experimentos de competición demostraron que la SEQ ID NO.: 42 no se une eficazmente a hSP1, incluso a concentraciones muy en exceso, como se muestra en la Fig. 28, paneles superior e inferior. Una falta de afinidad similar se observó para la unión del oligonucleótido EGR1 a hWT1. Véase la Fig. 28, paneles superior e inferior.

35 En su conjunto, los experimentos farmacológicos revelaron que la SEQ ID NO.: 42 es un potente compuesto inhibidor de hEGR1 ya que (i) tiene la mayor afinidad relativa por hEGR1 en comparación tanto con el señuelo simple del sitio de unión consenso (SEQ ID NO.: 41) como con el señuelo doble del sitio de unión consenso (SEQ ID NO.: 40) y, (ii) es fuertemente específico.

Ejemplo 3: Inhibición de la actividad transcripcional de hEGR1 en células

40 La capacidad de la SEQ ID NO.: 40 y la SEQ ID NO.: 42 para inhibir la actividad transcripcional de hEGR1 en células humanas se midió a través de su efecto sobre la expresión del gen *CDK5R1*. *CDK5R1* es un activador de la quinasa *CDK5*. Ambas están reguladas en exceso en las neuronas del dolor después de la inflamación periférica y regulan la

señalización nociceptiva, especialmente mediante la fosforilación del receptor de capsaicina, TRPV1. hEGR1 se une directamente al promotor *CDK5R1* en células HL60 humanas y controla su regulación en exceso tras la diferenciación celular mediante la 1,25-dihidroxitamina D3. El segmento del promotor *CDK5R1* natural utilizado como señuelo en células HL60 ya era conocido por inhibir la expresión de *CDK5R1*. Los inventores evaluaron la eficacia de sus secuencias señuelo para inhibir la actividad de hEGR1 midiendo el nivel de inhibición de *CDK5R1* que se confiere tras la diferenciación de las células HL60. El nivel de expresión del ARNm de *CDK5R1* se midió mediante RT-PCR sc (véase, por ejemplo, la Fig. 3A) y las concentraciones de semi-inhibición CI_{50} se refiere a la concentración de señuelo necesaria para producir un 50 % de inhibición del máximo nivel de expresión del ARNm de *CDK5R1* medido tras la diferenciación con 1,25-dihidroxitamina D3.

Los inventores confirmaron la regulación en exceso del nivel de expresión del ARNm de *CDK5R1* tras la diferenciación con 1,25-dihidroxitamina D3, así como la presencia de hEGR1 en las células HL60, tal como se muestra en la Fig. 3B. El elevado rendimiento de transfección (70 %) de las secuencias señuelo de los inventores en las células HL60 se ilustra en la Fig. 3C. La Figura 3D muestra que los inventores no midieron ninguna diferencia significativa en el número de células muertas entre el tratamiento con 1,25-dihidroxitamina D3 solo y el tratamiento combinado con las secuencias señuelo a concentraciones de hasta 1 μ M, lo que demuestra la falta de toxicidad del señuelo EGR1 en las células HL60.

En la Fig. 4A se muestran los experimentos dosis-respuesta desde 250 nM a 2 μ M realizados con las secuencias señuelo hEGR1 de los inventores. La SEQ ID NO.: 40 y SEQ ID NO.: 41 tienen un valor similar de la CI_{50} , con valores de 544 nM y 529 nM, respectivamente. Esto es coherente con el hecho de que ambas secuencias muestran aproximadamente la misma afinidad de unión por hEGR1. La SEQ ID NO.: 42 es más de tres veces más eficaz para inhibir la expresión del ARNm de *CDK5R1* que el resto de señuelos, con un valor de CI_{50} = 150 nM, lo que refleja su elevada afinidad por hEGR1. Las fotografías típicas de la detección de la expresión del ARNm de *CDK5R1* sobre geles de agarosa ilustran el valor diferencial de la CI_{50} de la SEQ ID NO.: 40 y la SEQ ID NO.: 42 se muestran en la Fig. 4B. Dichos datos revelan una relación directa entre las afinidades relativas de las secuencias señuelo de hEGR1 y su eficacia en un contexto celular y confirman adicionalmente el potencial terapéutico de la SEQ ID NO.: 42 como inhibidor de hEGR1 y para tratar el dolor.

La especificidad de la actividad de la SEQ ID NO.: 42 se verificó usando dos métodos. En primer lugar, los inventores comprobaron la ausencia de inhibición de la expresión de *CDK5R1* derivada de la secuencia SEQ ID NO.: 43/46 emparejada incorrectamente, que indica la falta de efectos no específicos de la exposición del nucleótido. Véase la Fig. 3E, panel izquierdo. En segundo lugar, los inventores confirmaron la especificidad de la actividad de la SEQ ID NO.: 42 mostrando su falta de efecto sobre la regulación de *BCL2*, un gen antiapoptótico que carece de elemento de respuesta a hEGR1 dentro de su promotor y no se sabe que esté regulado por hEGR1 en las células HL60. Consistente con observaciones anteriores, los inventores midieron una regulación en defecto de la expresión del ARNm de *BCL2* tras la diferenciación de las células HL60, y esta regulación en defecto no se vio alterada por el tratamiento con el oligonucleótido señuelo de la SEQ ID NO.: 42. Véase la Fig. 3E, panel derecho.

40 **Ejemplo 4: Inhibición de la expresión de los genes del dolor**

PC12 son células de feocromocitoma ampliamente utilizadas como modelo para investigar las rutas de señalización del dolor porque expresan y regulan numerosos genes del dolor de una forma similar a las neuronas del dolor endógenas en respuesta a mediadores proinflamatorios tales como NGF o los compuestos que elevan la concentración de AMPc. Los inventores midieron los efectos del tratamiento con el señuelo SEQ ID NO.: 42 sobre el perfil de expresión de los genes del dolor. Los inventores seleccionaron 11 genes del dolor basándose en (i) sus papeles fundamentales en variados síndromes del dolor, (ii) sus diferentes posiciones a lo largo de las rutas de señalización del dolor y (iii) el fuerte paralelismo entre la regulación de su expresión entre las neuronas del dolor endógenas y las células PC12. Pertenecen a cuatro clases de genes: canales de iones (*Scn9a*, *Cacnalb*), receptores de membrana (*Grm5*, *Bdkrb2*, *P2rx3*, *Htr3a*), enzimas de señalización y síntesis de neurotransmisores y proteínas relacionadas (*Cdk5r1*, *Gch1*, *Pnmt*, *Nos1*) y el neurotransmisor (*Bdnf*).

Los inventores obtuvieron un rendimiento de transfección similar en células PC12 (80 %) en comparación con células HL60, tal como se muestra en la Fig. 5A. La Fig. 5B muestra el nivel de expresión inicial de los genes del dolor seleccionados normalizados con respecto al nivel de expresión de *Gapdh*, con y sin el tratamiento con el señuelo de la SEQ ID NO.: 42. Los resultados indican que la expresión inicial de *Bdkrb2*, *Htr3a* y *Scn9a* está fuertemente inhibida por el tratamiento con la SEQ ID NO.: 42. De manera interesante, los tres genes codifican proteínas de membrana -dos receptores y un canal de iones-. La ausencia de impacto sobre el nivel de expresión del resto de genes resalta la especificidad del tratamiento con el señuelo EGR1 en las células PC12.

En experimentos posteriores, los inventores trataron las células PC12 con dos estímulos similares al dolor conocidos por movilizar EGR1 -NGF y forskolina. NGF induce la expresión de EGR1 y la forskolina actúa como factor permisivo de la actividad de EGR1 en las células PC12. Veinticuatro horas después del tratamiento con NGF/forskolina en las células PC12, los inventores observaron una regulación en exceso significativa en 7 de los 11 genes examinados, incluyendo *Bdnf*, *Grm5*, *Scn9a*, *Nos1*, *Gch1*, *Cdk5r1* y *Pnmt*. Los resultados de los inventores concuerdan con algunos estudios adicionales que muestran la regulación en exceso de dichos genes del dolor en células PC12 tras

su exposición a NGF. El tratamiento con la SEQ ID NO.: 42 evitó completamente la regulación en exceso endógena de cinco de los genes, incluyendo *Scn9a*, *Nos1*, *Gch1*, *Cdk5r1* y *Pnmt*. De manera interesante, todos estos genes salvo *Scn9a* codifican proteínas relacionadas con enzimas. En la Fig. 5D. se muestran fotografías típicas de la detección del ADNc de los genes del dolor en geles de agarosa que ilustran los dos efectos complementarios del tratamiento con la SEQ ID NO.: 42, inhibición de la expresión inicial y bloqueo de la regulación en exceso. Los inventores verificaron la falta de efectos no específicos de la exposición a los oligonucleótidos en las células PC12 mostrando la ausencia de inhibición derivada de la secuencia emparejada incorrectamente SEQ ID NO.: 43/46 sobre dos genes del dolor, como se muestra en la Fig. 5E.

La SEQ ID NO.: 42 inhibe el nivel de expresión de siete de los once genes del dolor en dos niveles diferentes, transcripción inicial y regulación en exceso inducida por dolor. Es posible que ambos efectos funcionen sobre diferentes tipos de genes, como en nuestros experimentos a pequeña escala, los niveles de transcripción inicial se inhibieron esencialmente solamente entre las proteínas de membrana mientras que, en condiciones análogas al dolor, la regulación en exceso normal de los genes asociados al dolor quedó inhibida de forma esencial solamente entre genes que codificaban enzimas. La elevada proporción de genes regulados y sus calidades complementarias reflejan la importancia de EGR1 en el dolor y su concordancia con los estudios realizados con animales inactivados genéticamente y con secuencias de sentido contrario, que demuestran que en ausencia de EGR1, no se mantienen los síndromes principales del dolor. Desde una perspectiva terapéutica, el interés de inhibir la actividad de EGR1 usando la SEQ ID NO.: 42 es la capacidad de modular en paralelo la expresión de un número elevado de genes del dolor que están activos en múltiples etapas de las rutas de señalización del dolor. Por ejemplo, un único tratamiento con la SEQ ID NO.: 42 sería suficiente para inhibir en paralelo un receptor como el BDRKD2 que percibe señales de dolor, un canal de iones como SCN9A que transmite señales de dolor en el interior de las neuronas, y una enzima de síntesis del neurotransmisor como GCH1 que participa de su transmisión sináptica entre neuronas, mientras que normalmente sería necesario una solución polifarmacológica compleja para alterar simultáneamente dichas dianas diferentes. En su conjunto, los datos experimentales que muestran el fuerte efecto inhibitorio de la SEQ ID NO.: 42 sobre la expresión génica del dolor dependiente de EGR1 revelan su potencial terapéutico para el tratamiento del dolor.

Ejemplo 5: Estudios complementarios con señuelos

Los inventores analizaron otras secuencias de oligonucleótidos señuelo adicionales que se dirigen a factores de transcripción que tienen diferentes papeles, incluyendo (i) CREB/ATF y NFAT, que son genes tempranos inmediatos que son fundamentales en la plasticidad de la expresión génica del dolor y complementan el papel de EGR1, y (ii) los factores AML1 y SP1, que son fundamentales en el mantenimiento de la expresión inicial y en la expresión específica del tejido de numerosos genes del dolor.

La Fig. 6A muestra experimentos ELISA para la SEQ ID NO.: 4, que se dirige a CREB/ATF, SEQ ID NO.: 11, que se dirige a SP1, SEQ ID NO.: 12, que se dirige a RUNX1, y la SEQ ID NO.: 15, que se dirige a NFAT. Los gráficos muestran los valores de DO de unión obtenidos para cada secuencia tanto con la versión biotinilada usada como sonda solamente o en presente del competidor respectivo. Todas las secuencias se unieron a sus factores diana, tal como se muestra por los valores de la DO de unión superiores al fondo. Las diferencias entre los valores de DO de unión entre una y otra secuencia reflejan, probablemente, además de las calidades individuales de los anticuerpos utilizados para la detección mediante ELISA, diferencias en la cantidad de cada factor de transcripción en los extractos nucleares, y en sus niveles de activación relativos. La inhibición de la unión observada en presencia de los competidos, para cada secuencia, indica su especificidad por sus dianas respectivas.

El potencial terapéutico de tres de las secuencias se evaluó en células PC12, tal como se ha descrito para la SEQ ID NO.: 42. La presencia de los factores CREB/ATF, NFAT y RUNX se había descrito anteriormente en las células PC12. Los niveles de expresión de los genes del dolor antes y después del tratamiento con los señuelos de SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 12, y SEQ ID NO.: 15 se muestran en la Tabla 2A. La Fig. 6B ilustra el efecto del tratamiento con el oligonucleótido señuelo medido en condiciones análogas al dolor. Cada secuencia inhibió la expresión de múltiples genes en condiciones tanto iniciales como análogas al dolor. Véanse las Tablas 2A y 2B, Fig. 6B. Por ejemplo, la SEQ ID NO.: 4, que tiene como diana los factores de transcripción CREB/ATF, inhibieron el nivel de expresión inicial de *Bdkrb2*, *Grm5*, *Htr3a*, *Pnmt* y *Nos1* y evita la regulación en exceso de *Scn9a*, *Cdk5r1*, *Pnmt* y *Nos1*. Los inventores observaron cierto solapamiento en los perfiles de inhibición de las secuencias señuelo en la regulación de la expresión de los genes del dolor. Dicha redundancia no es sorprendente teniendo en cuenta que la expresión génica se controla por las estructuras principales de los factores de transcripción en lugar de por uno solo, y todos los factores de transcripción investigados están implicados en la señalización del dolor. *In vivo*, la implicación respectiva de cada factor de transcripción en la regulación de la expresión génica puede depender del tipo de neurona del dolor en donde se expresa y de su actividad global resultante de la integración de rutas de señalización del dolor complejas. Por tanto, la relevancia terapéutica de un señuelo concreto puede depender del síndrome del dolor, su intensidad y su estadio.

Algunos genes del dolor importantes como *Scn9a*, que es fundamental en la génesis del potencial de acción en las neuronas del dolor (por ejemplo, mutaciones sin sentido en *Scn9a* generan insensibilidad al dolor), son muy sensibles a la regulación de la transcripción. La regulación en exceso de *Scn9a* después del tratamiento con NGF y

forskolina parecen implicar una red transcripcional que incluye los tres genes tempranos inmediatos *Egr1*, *Creb/Atf* y *Nfat*. Si la actividad de uno solo de estos factores se inhibe mediante una de las secuencias señuelo de los inventores, se pierde la regulación. Esto representa una ventaja terapéutica potencial importante del enfoque de señuelos, ya que la expresión de un gen dado puede quedar inhibida sin necesidad de tener como diana todos los factores de transcripción implicados en su regulación.

En su conjunto, estos experimentos demuestran que las secuencias señuelo de los inventores tienen el potencial de inhibir en paralelo un gran número de genes del dolor, una propiedad única para la terapia del dolor.

10 **Ejemplo 6: Oligonucleótidos señuelo compuestos**

Teniendo en cuenta que se aplica determinado nivel de redundancia entre las actividades de los factores de transcripción, los inventores desarrollaron una secuencia señuelo compuesta, SEQ ID NO.: 45, para la inhibición en paralelo de EGR1, CREB/ATF y NFAT. El interés de dicha secuencia es la inhibición simultánea de los tres principales genes tempranos inmediatos implicados en la plasticidad neuronal y que integran rutas de señalización complementarias fundamentales para la sensación de dolor. Las quinasas de señalización como las rutas MAPK/ERK, que se activan mediante numerosos receptores metabotrópicos del dolor (por ejemplo, los receptores de NGF NTRK1/NGFR), movilizan EGR1, mientras que las rutas de señalización del calcio movilizadas mediante los canales del calcio -y catiónicos- activan CREB y NFAT. La secuencia de la SEQ ID NO.: 45 incluye, en orden, de 5' a 3', sitios de unión al factor de transcripción para EGR1, CREB/ATF y NFAT, seleccionado cada uno de ellos de los elementos de respuesta individual de la SEQ ID NO.: 3 (EGR1), SEQ ID NO.: 4 (CREB/ATF), y la SEQ ID NO.: 15 (NFAT).

Las propiedades de unión de la SEQ ID NO.: 45 para cada factor se muestran en la figura 7A, B. Los experimentos de competición ELISA en paralelo con la SEQ ID NO.: 41 y la SEQ ID NO.: 45 muestran que la afinidad de enlace relativa de esta secuencia compuesta para EGR1 es tan alta como el oligonucleótido señuelo SEQ ID NO.: 41. Además, la inhibición de la actividad de hEGR1 en células HL60 inducida por el tratamiento con la SEQ ID NO.: 45 concuerda con la inhibición inducida por la SEQ ID NO.: 41 (Fig. 7C), teniendo ambas curvas dosis-respuestas solapantes. Estos resultados son consistentes con las observaciones anteriores de los inventores de que la eficacia celular estaba directamente vinculada con la afinidad relativa medida en los experimentos ELISA. Finalmente, otros experimentos de competición ELISA muestran que, además de unirse a hEGR1, la SEQ ID NO.: 45 también se une específicamente a los factores hCREB/hATF y hNFAT (Fig. 7B).

Los inventores investigaron el impacto de la SEQ ID NO.: 45 sobre la expresión de los genes del dolor en células PC12 (tabla 2). El uso de una secuencia compuesta proporciona dos ventajas: (i) un efecto potencialmente aditivo sobre el número y tipo de genes inhibidos; y (ii) potencialmente mayor inhibición de genes concretos que solamente quedan parcialmente inhibidos por oligonucleótidos señuelo específicos de factores de transcripción únicos. El efecto aditivo se ilustró para la SEQ ID NO.: 45 mediante la inhibición diferencial entre el señuelo compuesto, NFAT, y el señuelo EGR1. Por ejemplo, La SEQ ID NO.: 42 no inhibe la expresión inicial de *Grm5*, mientras que tanto la SEQ ID NO.: 15 (NFAT) como la SEQ ID NO.: 45 (señuelo compuesto) lo hacen. Análogamente, en dolencias de tipo dolor, la SEQ ID NO.: 15 (NFAT) no evita la regulación exceso de *Scn9a* tras el tratamiento con NGF y forskolina, mientras que la SEQ ID NO.: 42 (EGR1) y la SEQ ID NO.: 45 (señuelo compuesto) lo hacen.

El efecto de intensidad aparece fuertemente en la regulación de la expresión de los genes *Bdrkb2* y *Scn9a*, como se muestra en la Fig. 7D. Cuando un gen queda inhibido por al menos dos factores de transcripción que son diana de la secuencia compuesta, la intensidad de la inhibición es más fuerte que la inhibición transmitida por las secuencias individuales. Por ejemplo, la expresión inicial de *Bdrkb2* queda individualmente inhibida mediante un factor de 5 mediante la SEQ ID NO.: 4 y la SEQ ID NO.: 15, mientras queda inhibida por un factor de 10 mediante el oligonucleótido señuelo compuesto, SEQ ID NO.: 45.

Tabla 2A - Expresión inicial de los genes del dolor

	<i>BDNF</i>		<i>NOS1</i>		<i>BDKRB2</i>		<i>P2RX3</i>		<i>Gpm5</i>		<i>HTR3A</i>		<i>CACNA1b</i>		<i>SCN9Q</i>		<i>GCH1</i>		<i>CDKR1</i>		<i>PNMT</i>	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
control	0,7	0,29	0,13	0,02	1,16	0,09	0,94	0,32	0,15	0,05	0,6	0,1	1,08	0,21	0,33	0,06	0,76	0,10	0,68	0,11	0,51	0,10
+ ID N°: 4	0,54	0,14	0,06	0,01	0,28	0,02	0,72	0,39	0,04	0,01	0,01	0,00	1,02	0,15	0,17	0,15	1,07	0,30	0,98	0,12	0,05	0,01
+ ID N°: 12	0,92	0,05	0,04	0,003	0,38	0,07	0,66	0,18	0,15	0,11	0,06	0,04	0,84	0,19	0,04	0,01	0,98	0,22	0,29	0,02	0,06	0,02
+ ID N°: 15	0,63	0,04	0,12	0,05	0,22	0,03	0,59	0,20	0,03	0,01	0,02	0,01	0,30	0,13	0,11	0,002	1,03	0,05	0,98	0,40	0,08	0,01
+ ID N°: 42	0,89	0,26	0,08	0,03	0,51	0,24	0,80	0,27	0,20	0,19	0,04	0,01	1,03	0,29	0,11	0,01	1,04	0,08	0,86	0,23	0,41	0,17
+ ID N°: 45	0,626	0,08	0,021	0,005	0,05	0,002	1,038	0,21	0,048	0,01	0,06	0,02	0,826	0,06	0,045	0,02	1,025	0,14	0,578	0,06	0,07	0,02

Tabla 2B - Estimulo con NGF y forskolina

	BDNF		NOS1		BDKRB2		P2RX3		Gm5		HTR3A		CACNA1b		SCN9A		GCH1		CDKR1		PNMT	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
+ NGF + FSK	1,52	0,33	0,38	0,06	1,22	0,17	1,00	0,23	1,07	0,18	0,83	0,09	0,91	0,14	0,87	0,11	1,81	0,35	1,25	0,26	1,34	0,18
+ ID Nº: 4	1,22	0,20	0,19	0,03	0,80	0,22	0,89	0,34	0,98	0,11	0,53	0,13	0,80	0,13	0,19	0,06	2,18	0,69	0,65	0,27	0,09	0,05
+ ID Nº: 12	0,79	0,06	0,35	0,15	0,67	0,25	0,92	0,51	1,13	0,23	0,46	0,04	1,49	0,40	0,38	0,16	1,59	0,25	0,84	0,18	0,26	0,09
+ ID Nº: 15	1,55	0,52	0,10	0,01	1,10	0,19	1,32	0,31	0,81	0,17	0,28	0,09	1,04	0,14	1,00	0,28	1,95	0,21	0,80	0,05	0,17	0,06
+ ID Nº: 42	1,33	0,03	0,11	0,06	1,49	0,13	0,79	0,42	0,83	0,34	0,37	0,18	1,36	0,46	0,28	0,09	0,99	0,12	0,66	0,20	0,58	0,18
+ ID Nº: 45			0,04	0,01	1,27	0,38	0,83	0,21	0,63	0,32	0,87	0,18	1,63	0,40	0,10	0,01	0,68	0,32			0,19	0,09

Los valores se proporcionan como media y SEM, y representan el nivel de la expresión en células PC12 de cada gen, normalizado para el nivel de expresión de *Gapdh*. Las unidades son arbitrarias. Las casillas negras representan experimentos no realizados. n = 2-4.

5 **Ejemplo 7: Tratamiento del dolor in vivo**

La inflamación es una fuente de dolor principal. Es un rasgo común de numerosos síndromes del dolor, tal como el dolor artrítico y el dolor postquirúrgico. El modelo del adyuvante completo de Freund (CFA) es un modelo de dolor inflamatorio bien caracterizado que se utiliza frecuentemente para reproducir los rasgos del dolor inflamatorio humano. Por ejemplo, tras la inflamación de la extremidad trasera, los animales desarrollan una alodinia mecánica sólida y duradera (*es decir*, un dolor en respuesta a un estímulo mecánico normalmente no doloroso), un fenómeno que es una fuente importante de dolor y limitaciones en la ambulación, respiración y alimentación de los pacientes en un contexto postquirúrgico.

En los experimentos de los inventores y de acuerdo con la bibliografía, la alodinia mecánica era mensurable sobre la extremidad trasera inflamada el día 1 después del tratamiento con CFA y alcanza su máximo en un plazo de 4 días, como se muestra en la Fig. 8. El tratamiento con la SEQ ID NO.: 42 dio como resultado una tendencia antialodínica el día 1 después del tratamiento con CFA (Fig. 8A) y una reversión sólida de la alodinia en el día 4 después del tratamiento con CFA para cada fuerza de estímulo ensayada (Fig. 8B). Esto concuerda con que EGR1 está implicado en el mantenimiento de los eventos de plasticidad neuronal, como la sensibilización neuronal y la potenciación a largo plazo, en lugar de su inicio.

En su conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con la SEQ ID NO.: 42 tiene un efecto antialodínico sólido, lo que demuestra su potencial terapéutico para tratar el dolor *in vivo*. En particular, el tratamiento con la SEQ ID NO.: 42 es relevante para prevenir el mantenimiento de síndromes del dolor duraderos, por ejemplo, dolor postquirúrgico crónico.

Ejemplo 8: Materiales y métodos

Cultivo celular y reactivos biológicos

Las líneas celulares HL60 (sangre periférica humana, leucemia promielocítica aguda) y PC12 (glándula suprarrenal de rata, células feocromocitómicas) se adquirieron de la instalación de cultivos UCSF Cell (CA, EE.UU.). Las células HL-60 se hicieron crecer en medio RPMI 1640 + L-Glutamina (Invitrogen, CA, EE.UU.) suplementado con suero de feto de ternera al 10 % inactivado térmicamente y penicilina-estreptomicina al 1 % (Invitrogen, CA, EE.UU.). Las células se dividieron en placas de 6 pocillos (BD Biosciences, EE.UU.) a aproximadamente 200×10^4 células/pocillo 24 h antes del tratamiento con 1,25-dihidroxitamina D3 1 μM con o sin transfección del señuelo como se ha descrito anteriormente. Las células PC12 se hicieron crecer en medio DMEM que contenía 1.000 mg/l de D-glucosa, L-glutamina, tampón HEPES 25 mM, y 110 mg/l de piruvato de sodio (Invitrogen, CA, EE.UU.) suplementado con suero de feto de ternera al 10 % inactivado térmicamente, suero de caballo al 5 % inactivado térmicamente y penicilina-estreptomicina al 1 % (Invitrogen, CA, EE.UU.). Las células PC12 se dividieron en placas CellBind de 6 pocillos (Coming, USA) 24 h antes del tratamiento con NGF 100 nM (Invitrogen, CA, EE.UU.) y forskolina 5 μM (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) con o sin transfección del señuelo. Todas las células se hicieron crecer a 37 °C con CO₂ al 5 %. El recuento de células muertas se realizó con la técnica de exclusión del azul tripán (Invitrogen, CA, EE.UU.) en una cámara de recuento Malassez.

Hibridación de las secuencias señuelo

Las hebras directa e inversa de cada secuencia señuelo fueron sintetizadas por Integrated DNA Technology (IA, EE.UU.) y se resuspendieron 1 x tampón TE a pH 7,4 o pH 8. Cada par de hebras se hibridó en presencia de NaCl 50 mM con una etapa de desnaturalización a 95 °C de 7 min y un enfriamiento lento hasta 25 °C de 0,5 °C / min. El éxito de la hibridación se comprobó en un gel de agarosa al 2,5 % con bromuro de etidio observando las velocidades de migración más lentas de los dupletes, en comparación con los monocatenarios correspondientes.

Transfección de las secuencias señuelo

Las transfecciones de las secuencias señuelo se realizó usando Oligofectamina (Invitrogen, CA, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para los experimentos con HL60, las transfecciones de las secuencias señuelo (250 nM, 500 nM, 1000 nM y 2000 nM) fueron seguidas inmediatamente por tratamiento con 1,25-dihidroxitamina D3 (1 μM). Las células se recogieron 48 h después y se prepararon para la extracción del ARN. Para las células PC12, se aplicaron inmediatamente NGF (100 ng/ml) y forskolina (5 μM) tras las transfecciones de las secuencias señuelo (500 nM). Las células se recogieron 24 h después para la extracción del ARN.

Para ambas líneas celulares, el rendimiento de la transfección se midió usando la SEQ ID NO.: 40 acoplada a fluoresceína (Integrated DNA Technology, IA, EE.UU.) 24 h después de la transfección. El rendimiento de la transfección se calculó en función del recuento de células fluorescentes comparadas con las células no

fluorescentes observadas con un microscopio de fluorescencia.

Reacciones de transcripción inversa semicuantitativa y en cadena de la polimerasa (sqRT-PCR)

- 5 El ARN total se extrajo de las células usando el kit RNeasy Plus (Qiagen, EE.UU.) que garantiza la eliminación del ADN genómico durante la extracción del ARN. Cantidades equivalentes de ARN se sometieron a transcripción inversa para obtener ADNc para cada condición, usando tanto el kit de síntesis First-strand cDNA (GE healthcare, NJ, EE.UU.) o el sistema Superscript 1st strand (Invitrogen, CA, EE.UU.) y un dieciseisavo de cada RT se utilizó en la reacción de la PCR. La PCR se realizó con 20 µl totales usando la mezcla maestra de Promega (Promega, WI, EE.UU.) con los siguientes ciclos: 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min (25 ciclos para los genes constitutivos *ACTB* y *Gapdh*, 35 ciclos para el resto de genes para la detección de material en el intervalo de detección lineal y antes de la saturación de la señal). Todos los cebadores utilizados (véase la Tabla 3) se han descrito anteriormente.

Tabla 3

Cebador	Secuencia 5'·3'	SEQ ID NO.:
h <i>ACTB</i> S	AAGAGAGGCATCCTCACCCCT	SEQ ID NO.: 54
h <i>ACTB</i> AS	TACATGGCTGGGGTGTGAA	SEQ ID NO.: 55
h <i>BCL2</i> S	GGAAGTGAACATTTCCGGTGAC	SEQ ID NO.: 56
h <i>BCL2</i> AS	GCCTCTCCTCACGTTCCC	SEQ ID NO.: 57
h <i>CDK5R1</i> S	GCCGTACAGAACAGCAAGAA	SEQ ID NO.: 58
h <i>CDK5R1</i> AS	GTCGGCATTATCTGCAGCA	SEQ ID NO.: 59
r <i>Bdkrb2</i> S	GAACATCTTTGTCCTCAGC	SEQ ID NO.: 60
r <i>Bdkrb2</i> AS	CCGTCTGGACCTCCTTGAAC	SEQ ID NO.: 61
r <i>Bdnf</i> S	GGCTTTGATGAGACCGGGTCCCT	SEQ ID NO.: 62
r <i>Bdnf</i> AS	GTAGGCCAAGTTGCCTTGCCGT	SEQ ID NO.: 63
r <i>Cacnalb</i> S	ATGCTGTTCTTCATCTACGC	SEQ ID NO.: 64
r <i>Cacnalb</i> AS	TTGTCCATGATCACAGCAAC	SEQ ID NO.: 65
r <i>Egr1</i> S	AGATGATGCTGCTGAGCAAC	SEQ ID NO.: 66
r <i>Egr1</i> AS	AGTAAATGGGACTGCTGTCTG	SEQ ID NO.: 67
r <i>Gapdh</i> S	CCGCTGATGCCCCCATGTTTGTGAT	SEQ ID NO.: 68
r <i>Gapdh</i> AS	GGCATGTCAGATCCACAACGGATAC	SEQ ID NO.: 69
r <i>Gch1</i> S	CCACGCCATGCAGTTCTTACCA	SEQ ID NO.: 70
r <i>Gch1</i> AS	AGGCTGCAAGGCTTCTGTGATGGC	SEQ ID NO.: 71
r <i>Gm5</i> S	GTGGCGGAGCAGAGGAGAGC	SEQ ID NO.: 72
r <i>Gm5</i> AS	GTGGCCGCGGTGGACAACAT	SEQ ID NO.: 73
r <i>Htr3a</i> S	AATCAGGGCGAGTGGGAGC	SEQ ID NO.: 74
r <i>Htr3a</i> AS	GAGGACAGCTCTTGCAAGAGGC	SEQ ID NO.: 75
r <i>Nos1</i> S	GAATACCAGCCTGATCCATGGAAC	SEQ ID NO.: 76
r <i>Nos1</i> AS	TCCTCCAGGAGGGTGTCCACCGCA	SEQ ID NO.: 77
r <i>P2rx3</i> S	TGGCGTTCTGGGTATTAAGATCGG	SEQ ID NO.: 78
r <i>P2rx3</i> AS	CAGTGGCCTGGTCACTGGCGA	SEQ ID NO.: 79
r <i>Cdk5rl</i> S	GCTCTGCAGGGATGTTATCTCC	SEQ ID NO.: 80
r <i>Cdk5rl</i> AS	CTTCTGTCTCCTGACCACTC	SEQ ID NO.: 81
r <i>Pnmt</i> S	CAGACTTCTTGGAGGTCAACCTG	SEQ ID NO.: 82
r <i>Pnmt</i> AS	TTATTAGGTGCCACTTCCGGGTG	SEQ ID NO.: 83
r <i>Scn9a</i> S	TTCATGACCTTGAGCAACCC	SEQ ID NO.: 84
r <i>Scn9a</i> AS	TCTCTTCGAGTTCCTTCCTG	SEQ ID NO.: 85

S= sentido directo, AS = sentido contrario, h = ser humano, r = rata.

- 15 12,5 µl de cada reacción de la PCR se detectó en gel de agarosa al 1 % (Invitrogen, CA, EE.UU.) con bromuro de etidio (Fisher Scientific, PA, EE.UU.). Las imágenes de las bandas del gel se capturaron con un sistema de obtención de imágenes de gel FluorChem SP (Alpha Innotech, CA, EE.UU.) y se analizaron usando el programa informático Image J (NIH, MD, EE.UU.). Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a los niveles de *ACTB* para los experimentos con HL60 y con respecto a los niveles de *Gapdh* para los experimentos con PC12. La significación estadística se midió con el test de la t de Student bilateral. Las curvas dosis-respuesta se ajustaron a la ecuación de descomposición exponencial.

Experimentos ELISA con factor de transcripción

- 25 La afinidad y la especificidad de las secuencias señuelo por sus factores de transcripción diana se midió con los kits colorimétrico de ELISA (inmunoensayo enzimático) para factor de transcripción (Panomics, CA, EE.UU.). En resumen, las secuencias señuelo diseñadas acopladas a biotina se incubaron durante 30 minutos con extractos de proteínas nucleares procedentes de células K-562 estimuladas con TPA que expresaban los factores de transcripción diana (Activemotif, CA, EE.UU.). Las mezclas de proteínas y secuencias señuelo se cargaron en placas

de 96 pocillos revestidas con la estreptavidina proporcionada en el kit. La cantidad de factor de transcripción capturado por cada secuencia señuelo se reveló de acuerdo con el protocolo del proveedor usando anticuerpos primarios específicos y anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). Las densidades ópticas (DO) de las reacciones se leyeron a 450 nM con un lector de microplacas Thermomax (Molecular Device, CA, EE.UU.).

Los experimentos se realizaron en 50 µl con 6,4 pmoles de secuencia señuelo acoplada a biotina (sonda) mezclada con 10 µg de extracto de proteínas nucleares en el tampón de unión del kit. Cuando la sonda se incubó sola con los extractos de proteínas, la OD resultante representa la actividad de unión de la sonda con su diana. Al aumentar la concentración del competidor, las versiones no biotiniladas de la sonda se añadieron a la reacción de unión, una reducción en el valor de la DO demuestra especificidad de unión. El uso de variantes de secuencia como competidores permite medir sus afinidades relativas por el factor diana en comparación con la sonda. El uso de anticuerpos primarios dirigidos contra varios factores de transcripción (CREB/ATF, WT1, NFATC1 de Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, SP1 de emd biosciences, WI, EE.UU. y EGR1 de Panomics, CA, EE.UU.) permite detectar la especificidad relativa de las secuencias señuelo para múltiples factores. Las curvas de competición se ajustaron a la ecuación de descomposición exponencial.

Experimentos conductuales

La superficie plantar de la extremidad trasera izquierda de ratas Sprague-Dawley (macho, 250-300 g) recibió una inyección (aguja 30G) con 150 µl de adyuvante completo de Freund (CFA). Se usaron filamentos de Von Frey de 1 g y 6 g para ensayar la sensibilidad mecánica (*es decir*, la alodinia) de la extremidad trasera. En resumen, cada filamento de Von Frey se aplicó 5 veces, y se contó el número de retiradas de la extremidad. Los animales se habituaron a un suelo de malla 1 hora antes del ensayo. La sensibilidad mecánica inicial de los animales se ensayó antes de los tratamientos con la SEQ ID NO.: 42 y CFA. Todos los experimentos se realizaron de forma enmascarada.

La SEQ ID NO.: 42 fue sintetizada y purificada mediante HPLC por Integrated DNA Technology (IA, EE.UU.). Los dupletes señuelo se hibridaron como se ha descrito anteriormente, en TE pH 8 a una concentración final 2 mM y se inyectaron intratecalmente a las ratas con 13 nmoles / inyección (20 µl total, diluido 1:3, TE pH 8). El calendario de inyección/ensayo fue el siguiente:

- día 0: ensayo de sensibilidad Von Frey inicial seguido por la inyección 1 de SEQ ID NO.: 42
- día 1: inyección 2 de SEQ ID NO.: 42, 1 h antes del tratamiento con CFA
- día 2: inyección 3 de SEQ ID NO.: 42, 1 h antes del ensayo de Von Frey
- día 5: inyección 4 de SEQ ID NO.: 42, 1 h antes del ensayo de Von Frey

Los animales de control recibieron una inyección que contenía solamente TE como vehículo con el mismo calendario. Para las inyecciones intratecales, las ratas se anestesiaron con isoflurano al 2 %, sus lomos se rasuraron y se prepararon con Betadine. Después, las ratas se colocaron sobre una botella para mantener la espalda arqueada. Una aguja 17G 1/2 se deslizó rostralmente a lo largo del costado izquierdo del proceso L6 transversal hasta que alcanzó L5. A continuación, la aguja se insertó entre L5 y L6 hasta que se alcanzó el espacio intratecal como se indicó por la sacudida de la cola.

Será obvio para los expertos en la materia que se pueden llevar a cabo muchas modificaciones, en los materiales y métodos, sin apartarse del alcance de la presente divulgación. Por consiguiente, las realizaciones descritas se deben considerar como ilustrativas y no como restrictivas, y la invención no queda limitada a los detalles proporcionados en el presente documento, sino que se pueden modificar dentro del alcance y equivalentes de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ADYNXX, INC.
- <120> Expresión Génica y Dolor
- <130> EAH/FP6993851
- <140>
- <141> 12-05-2008
- <150> EP08755344.2
- <151> 12-05-2008
- <150> PCT/US2008/063471
- <151> 12-05-2008

<150> US 60/917.583
 <151> 11-05-2007

5 <160> 85
 <170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo

<400> 1
 ggcttatgca aattcgaatg caaattgtc g 31

20 <210> 2
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo

30 <400> 2
 ctaagcccac gtgaccattg gccaggtgac cagatc 36

35 <210> 3
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido señuelo

40 <400> 3
 gttatgctgt ggcgataatg cgggggcgtt atag 34

45 <210> 4
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido señuelo

50 <400> 4
 gcctccctga gctcattgac gtatctcgg 29

55 <210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido señuelo

60 <400> 5
 cgaatgac tgagaatgac tcagattgc 30

65 <210> 6
 <211> 37
 <212> ADN

ES 2 619 314 T3

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 5
 <400> 6
 ggttctatga ttttgaatc ggattgtgca aagaagc 37
 <210> 7
 10 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 7
 gcttcaggat gtccatatta ggagatcttg ttcg 34
 <210> 8
 20 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 8
 30 ggccacagga tgtaggatgt ccatattagg atgc 34
 <210> 9
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 9
 40 gttctctaaa aataaaaggc taaaataaa agtcg 35
 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 50 <400> 10
 attagggcg gggccgggg cggggtatta 30
 <210> 11
 <211> 35
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 60 <400> 11
 gttatggcgg ggcggggcgg ggccgggcg tttac 35
 <210> 12
 65 <211> 29
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 5
 <400> 12
 ggcaatgtgg ttttagtggt gttttacgg 29
 <210> 13
 10 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 13
 gccgtttggg gtcacatagaac cacaggaacc acacgg 36
 20 <210> 14
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 14
 30 cattgcccgg aatgaccg gatgtaatt cc 32
 <210> 15
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 15
 40 gttcttgaa aataaatgga aatagtga aaataagtcg 40
 <210> 16
 <211> 33
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 50 <400> 16
 cgttccact tctgacgacc acttctgcc ggg 33
 <210> 17
 <211> 33
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 60 <400> 17
 ctgcacatat aatggccta taaatggga tgc 33
 <210> 18
 65 <211> 33
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 5
 <400> 18
 gcttattcg cggaaggtt cccggaagtg gcg 33
 <210> 19
 10 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 19
 gctgtgcctt atctcttgg gataactggc g 31
 20 <210> 20
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 20
 30 gcttaatgaa taagaggaaa aatgcatgct gg 32
 <210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 21
 40 gttctgagat tgcacgatga gatttcacag tcg 33
 <210> 22
 <211> 32
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 50 <400> 22
 gtcccgcata aataatggca tccttaatcg cg 32
 <210> 23
 <211> 36
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 60 <400> 23
 gtgcaggcaa gagtagagac aggcaagagt agatgc 36
 <210> 24
 65 <211> 25
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 5
 <400> 24
 ccgccaataa ttaattatta aggcc 25
 <210> 25
 10 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 25
 gcttcgtcc atttccggtc tcggttccc cattc 35
 20 <210> 26
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 26
 30 gctgctgtgg aatatcgacc tgtggaatat cggtg 34
 <210> 27
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 27
 40 gccgtataaa tgtgctataa aagtttaag accgtgc 37
 <210> 28
 <211> 29
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 50 <400> 28
 gccgtataaa tgtgctataa aagccgtgc 29
 <210> 29
 <211> 26
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 60 <400> 29
 atgctgcgct ttctccaat ctgcgg 26
 <210> 30
 65 <211> 40
 <212> ADN

ES 2 619 314 T3

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 5
 <400> 30
 cgttctccga ttggtcacgg actctccgat tggtcacggc 40
 <210> 31
 10 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 31
 ggcacaccca gcctggctca cccacgcg 28
 20 <210> 32
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 32
 30 gatcctttgc ctcttcgat cctttgcctc ctcaag 37
 <210> 33
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 33
 40 ggtgtttggg agagctttgg gaggatacg 29
 <210> 34
 <211> 36
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 50 <400> 34
 gctaatacact cagcatttcg gtgaggaag taaaag 36
 <210> 35
 <211> 51
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 60 <400> 35
 cctttcagca ccacggacag cgccagcttc agcaccacgg acagcgcctc g 51
 <210> 36
 65 <211> 36
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 5
 <400> 36
 ggatcgaaca tggagtcagt gagaatcag gatcgg 36
 <210> 37
 10 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 37
 ggatcgaagc cggagtcaag gaggcccctg atcgg 35
 20 <210> 38
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 38
 30 ccgaaaggac aaaggtcaag tcgaaaggac aaaggtcag 39
 <210> 39
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 <400> 39
 40 cgggagaaaa ttcggaacg tcaagaatt gtcgg 35
 <210> 40
 <211> 34
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 50 <400> 40
 gttatgctgt ggcgtagatg cggggcggtt atag 34
 <210> 41
 <211> 16
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido señuelo
 60 <400> 41
 gatgctggg cgtagg 16
 <210> 42
 65 <211> 23
 <212> ADN

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido señuelo	
5	<400> 42 gtatgcgtgg gcggtggcg tag	23
	<210> 43	
10	<211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido señuelo	
	<400> 43 gttatgcgtt tgtagatgct ttcgatatag	30
20	<210> 44 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido señuelo	
	<400> 44 gttatgcgtg ggcgatatag	20
30	<210> 45 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido señuelo	
40	<400> 45 gatgcgtggg cggtgacgtg gaaaatgc	28
	<210> 46 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Oligonucleótido señuelo	
50	<400> 46 ctattcgaa acgatctaca ttgcataac	30
	<210> 47 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Oligonucleótido señuelo	
60	<400> 47 cgttccact tctgacgacc gg	22
	<210> 48 <211> 26 <212> ADN	
65		

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido señuelo	
	<400> 48	
	gggtgaaggc aagagtagag cggcgg	26
10	<210> 49	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido señuelo	
	<400> 49	
	cgttctccga ttggtcacgc g	21
20	<210> 50	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido señuelo	
	<400> 50	
30	gtactccctt tgcctcctc aaccgg	26
	<210> 51	
	<211> 31	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido señuelo	
40	<400> 51	
	ccttattcag caccacggac agcgccattc g	31
	<210> 52	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido señuelo	
50	<400> 52	
	gcgaaaggac aaaggtcagg cgg	23
	<210> 53	
55	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido señuelo	
60	<400> 53	
	ggcttgctgt ggaatatcga tgggtg	25
65	<210> 54	
	<211> 20	
	<212> ADN	

ES 2 619 314 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
5	<400> 54 aagagaggca tctcacct	20
	<210> 55	
10	<211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador de PCR	
	<400> 55 tacatggctg ggggttgaa	20
20	<210> 56 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador de PCR	
	<400> 56 ggaagtgaac atttcggtga c	21
30	<210> 57 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 57 gcctctcctc acgttccc	18
40	<210> 58 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
50	<400> 58 gccgtacaga acagcaagaa	20
	<210> 59	
55	<211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador de PCR	
	<400> 59 gtcggcattt atctgcagca	20
65	<210> 60 <211> 19 <212> ADN	

ES 2 619 314 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
5	<400> 60 gaacatcttt gtcctcagc	19
	<210> 61	
10	<211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador de PCR	
	<400> 61 ccgtctggac ctcttgaac	20
20	<210> 62 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador de PCR	
	<400> 62 ggctttgatg agaccgggtt ccct	24
30	<210> 63 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 63 gtaggccaag tgccttgtc cgt	23
40	<210> 64 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
50	<400> 64 atgctgttct tcatctacgc	20
	<210> 65 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
60	<400> 65 ttgtccatga tcacagcaac	20
	<210> 66 <211> 20 <212> ADN	
65		

ES 2 619 314 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
5	<400> 66 agatgatgct gctgagcaac	20
	<210> 67	
10	<211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador de PCR	
	<400> 67 agtaaatggg actgctgctg	20
20	<210> 68 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador de PCR	
	<400> 68 ccgctgatgc ccccatgttt gtgat	25
30	<210> 69 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 69 ggcatgtcag atccacaacg gatac	25
40	<210> 70 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
50	<400> 70 ccacgcatg cagttcttca cca	23
	<210> 71 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
60	<400> 71 aggctgcaag gcttctgtga tggc	24
	<210> 72 <211> 21 <212> ADN	
65		

ES 2 619 314 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
5	<400> 72	
	gtggcggagg cagaggagag c	21
	<210> 73	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador de PCR	
	<400> 73	
	gtggccgcgg tggacaacat	20
20	<210> 74	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 74	
30	aatcagggcg agtgggagc	19
	<210> 75	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 75	
40	gaggacagct cttgcaagag gc	22
	<210> 76	
	<211> 24	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
50	<400> 76	
	gaataccagc ctgatccatg gaac	24
	<210> 77	
55	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
60	<400> 77	
	tctccagga ggggtccac cgca	24
	<210> 78	
65	<211> 24	
	<212> ADN	

ES 2 619 314 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
5	<400> 78	
	tggcgttctg ggtattaaga tcgg	24
	<210> 79	
10	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador de PCR	
	<400> 79	
	cagtggcctg gtcactggcg a	21
20	<210> 80	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 80	
30	gctctgcagg gatgttatct cc	22
	<210> 81	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
40	<400> 81	
	cttctgtcc tcctgaccac tc	22
	<210> 82	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
50	<400> 82	
	cagacttctt ggaggtcaac ctg	23
	<210> 83	
55	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
60	<400> 83	
	ttattagtg ccaactcggg tg	22
	<210> 84	
65	<211> 20	
	<212> ADN	

ES 2 619 314 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

5

<400> 84
ttcatgacct tgagcaacc 20

10

<210> 85
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Cebador de PCR

<400> 85
tctctcgag tccttctg 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido señuelo que comprende una secuencia que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID NO:32, en donde el oligonucleótido señuelo comprende al menos un sitio de unión al factor de transcripción que se une a un factor de transcripción KLF4.
2. El oligonucleótido señuelo de la reivindicación 1, que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO:32.
- 10 3. El oligonucleótido señuelo de la reivindicación 2, que comprende la SEQ ID NO:32.
4. El oligonucleótido señuelo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene una longitud menor de 65 pares de bases.
- 15 5. El oligonucleótido señuelo de la reivindicación 4, que tiene una longitud menor de 50 pares de bases.
6. El oligonucleótido señuelo de la reivindicación 5, que tiene una longitud menor de 45 pares de bases.
- 20 7. El oligonucleótido señuelo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un segundo sitio de unión al factor de transcripción, en donde dicho segundo sitio de unión al factor de transcripción se une a un factor de transcripción seleccionado del grupo que consiste en los factores de transcripción POU1F1, POU2F, POU3F, POU5F1, USF, EGR1, CREB/ATF, AP1, CEBP, SRF, ETS1, MEF2, SP1, RUNX, NFAT, ELK1, factores complejos ternarios, STAT, GATA1, ELF1, factor nuclear de granulocitos/macrófagos, POU4F1, HNF1, ZFH3, IRF, TEA01, TBP, NFY, factores de unión a la secuencia cacc, KLF4, KLF7, IKZF, MAF, REST, HSF, KCNIP3 y PPAR.
- 25 8. El oligonucleótido señuelo de la reivindicación 7, que comprende además un tercer sitio de unión al factor de transcripción, en donde dicho tercer sitio de unión al factor de transcripción se une a un factor de transcripción seleccionado del grupo que consiste en los factores de transcripción POU1F1, POU2F, POU3F, POU5F1, USF, EGR1, CREB/ATF, AP1, CEBP, SRF, ETS1, MEF2, SP1, RUNX, NFAT, ELK1, factores complejos ternarios, STAT, GATA1, ELF1, factor nuclear de granulocitos/macrófagos, POU4F1, HNF1, ZFH3, IRF, TEAD1, TBP, NFY, factores de unión a la secuencia cacc, KLF4, KLF7, IKZF, MAF, REST, HSF, KCNIP3 y PPAR.
- 30 9. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido señuelo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 10. Un kit que comprende un oligonucleótido señuelo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y, opcionalmente, una instrucción para utilizar dicho oligonucleótido señuelo.
- 40 11. El oligonucleótido señuelo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento o la prevención del dolor en un paciente.
12. El oligonucleótido señuelo o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el dolor es dolor postquirúrgico.

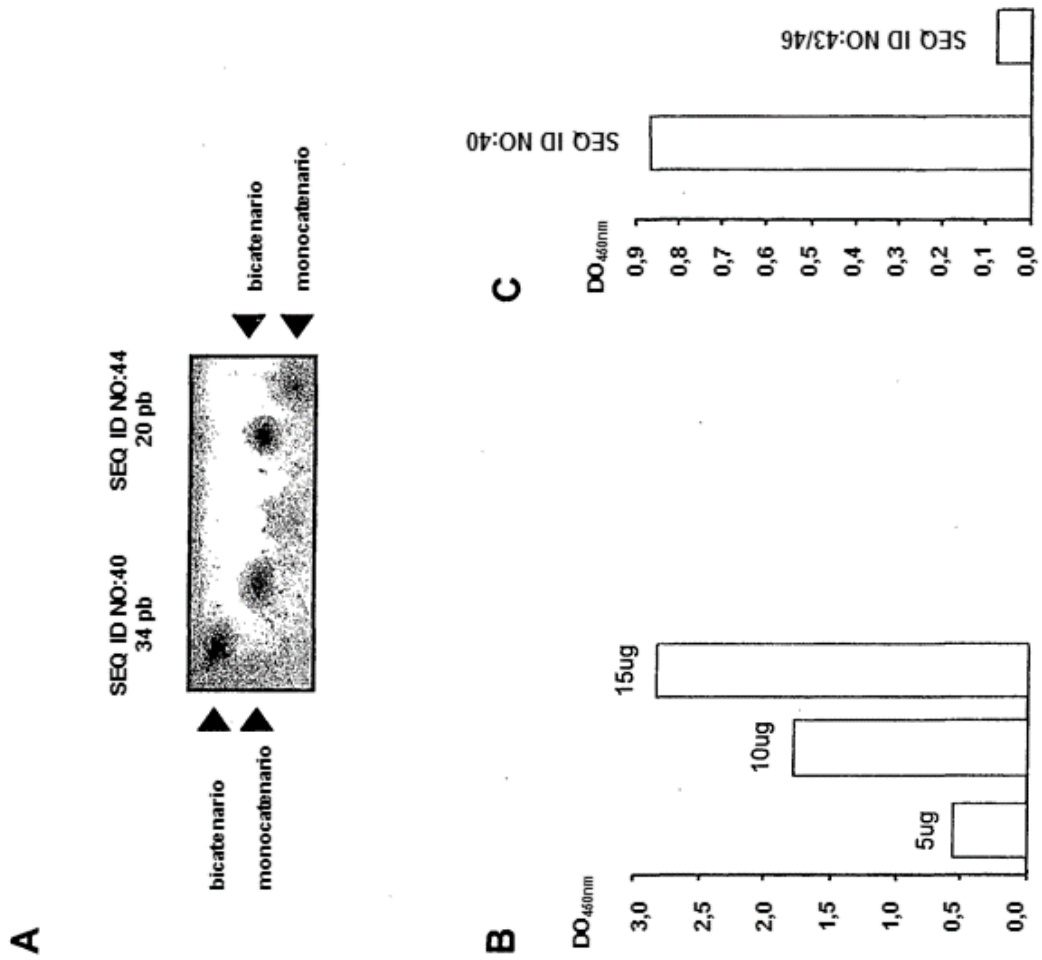


Fig. 1

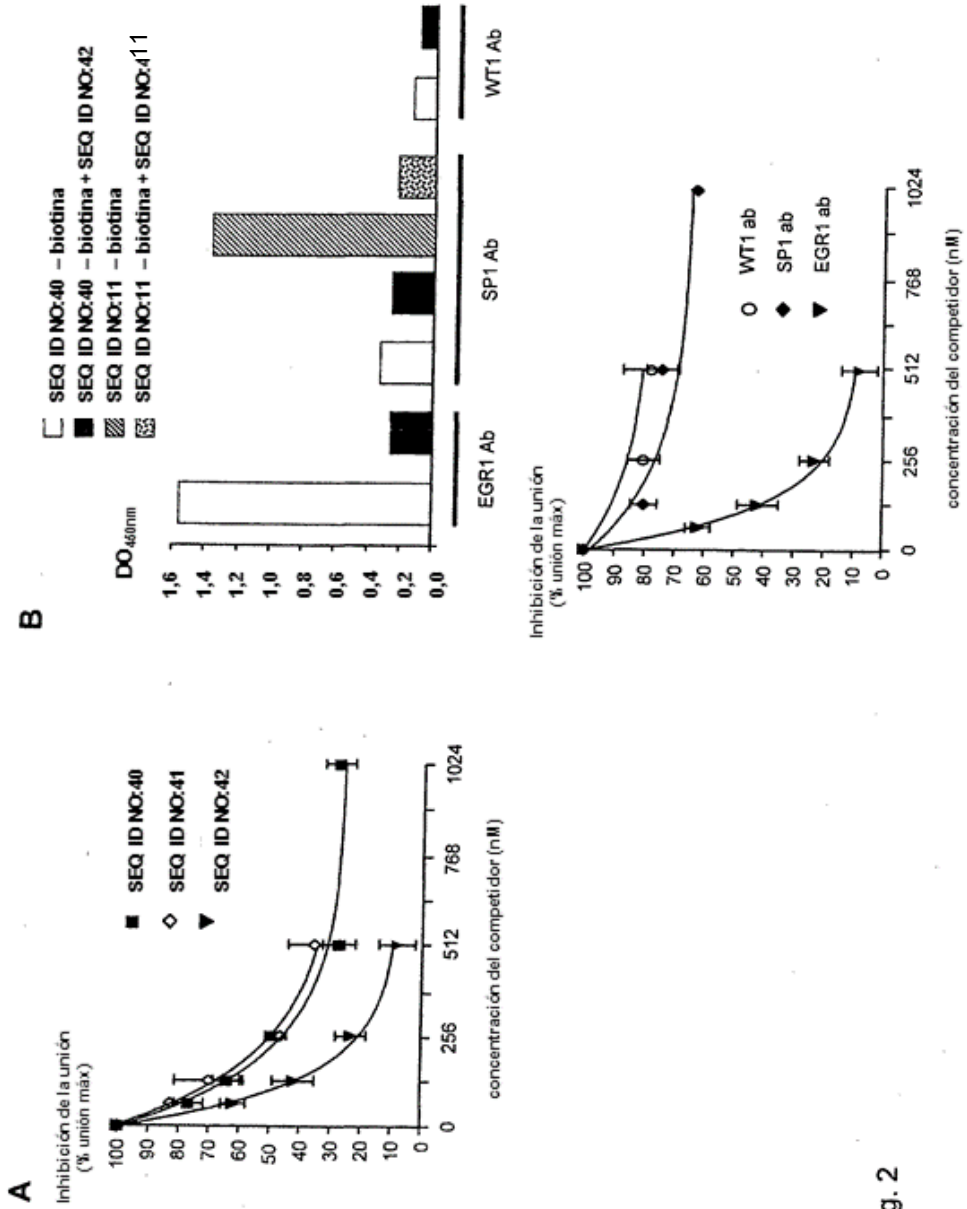


Fig.2

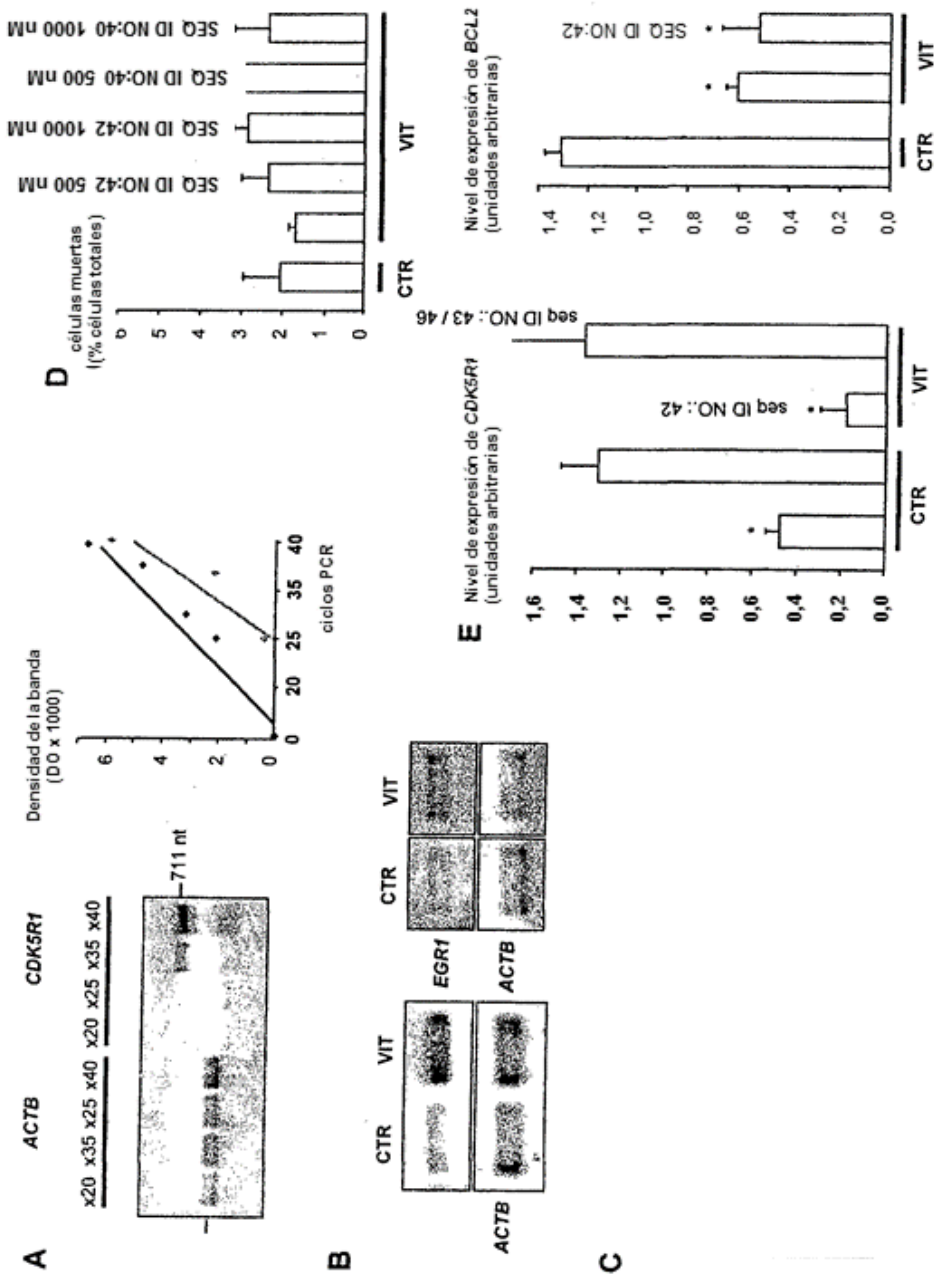


Fig. 3

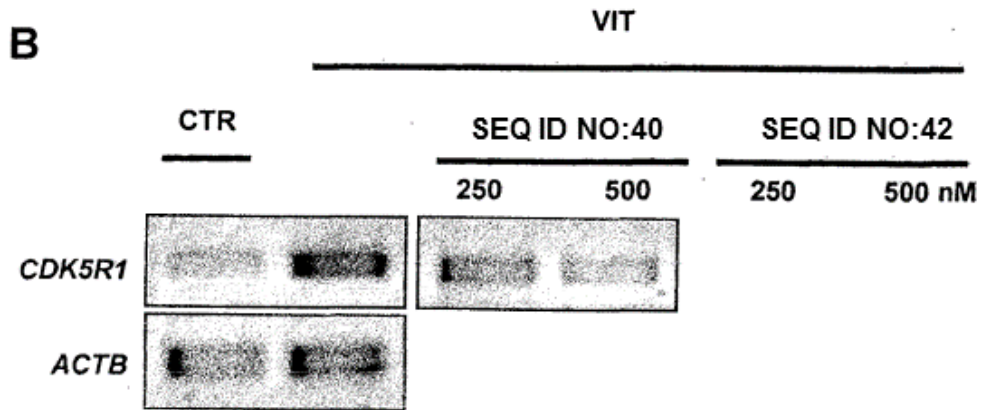
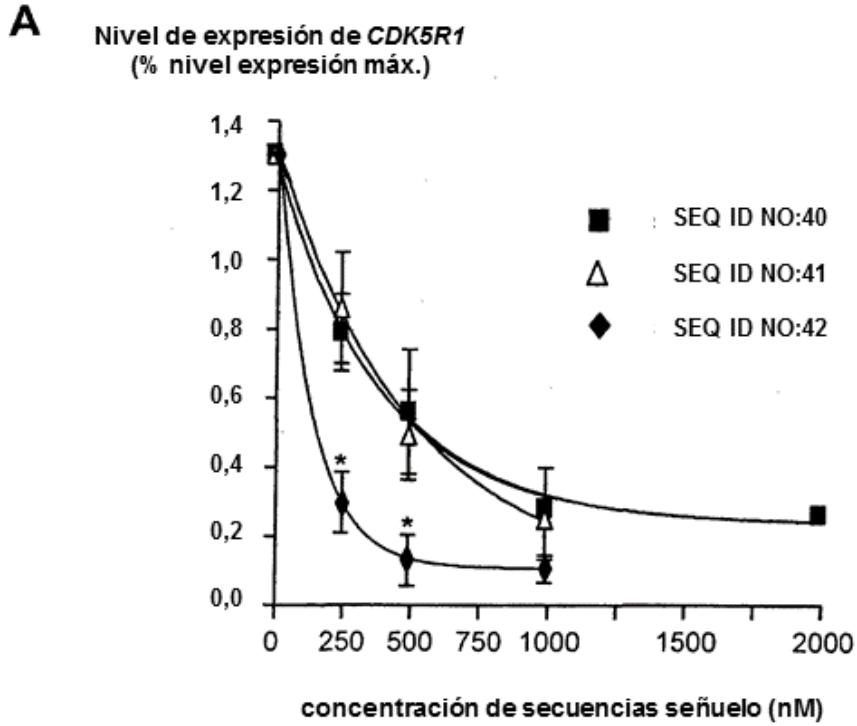


Fig. 4

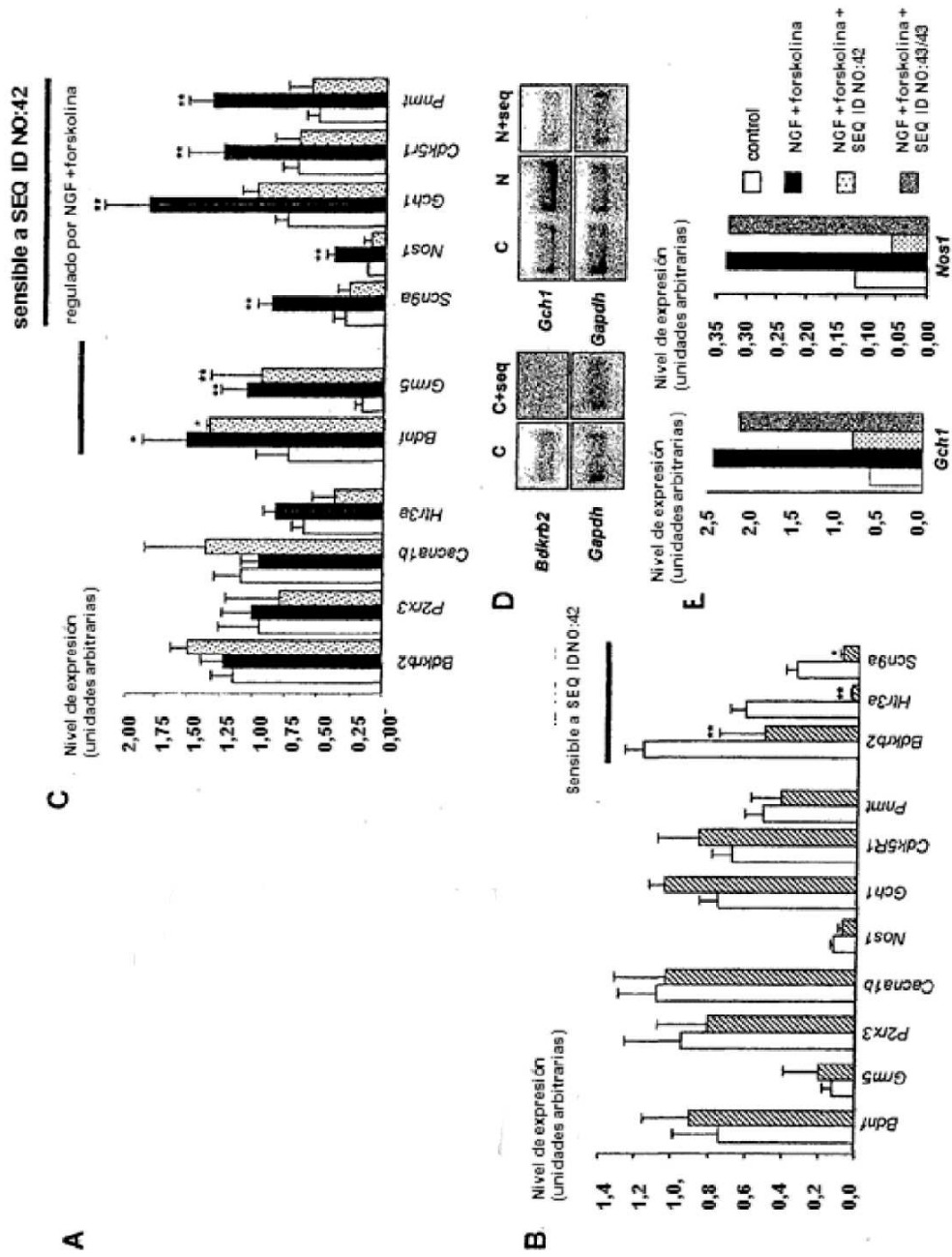


Fig. 5

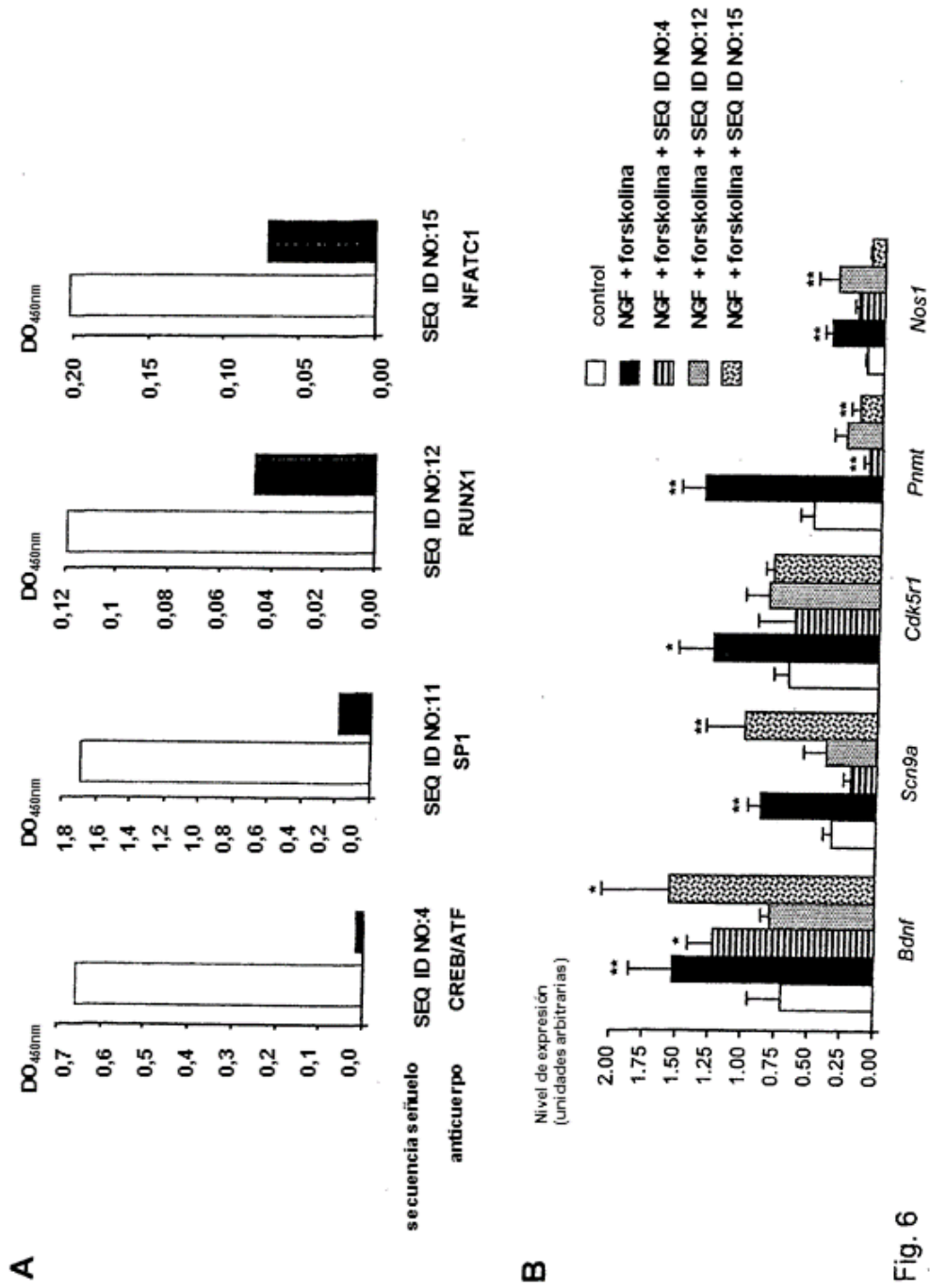


Fig. 6

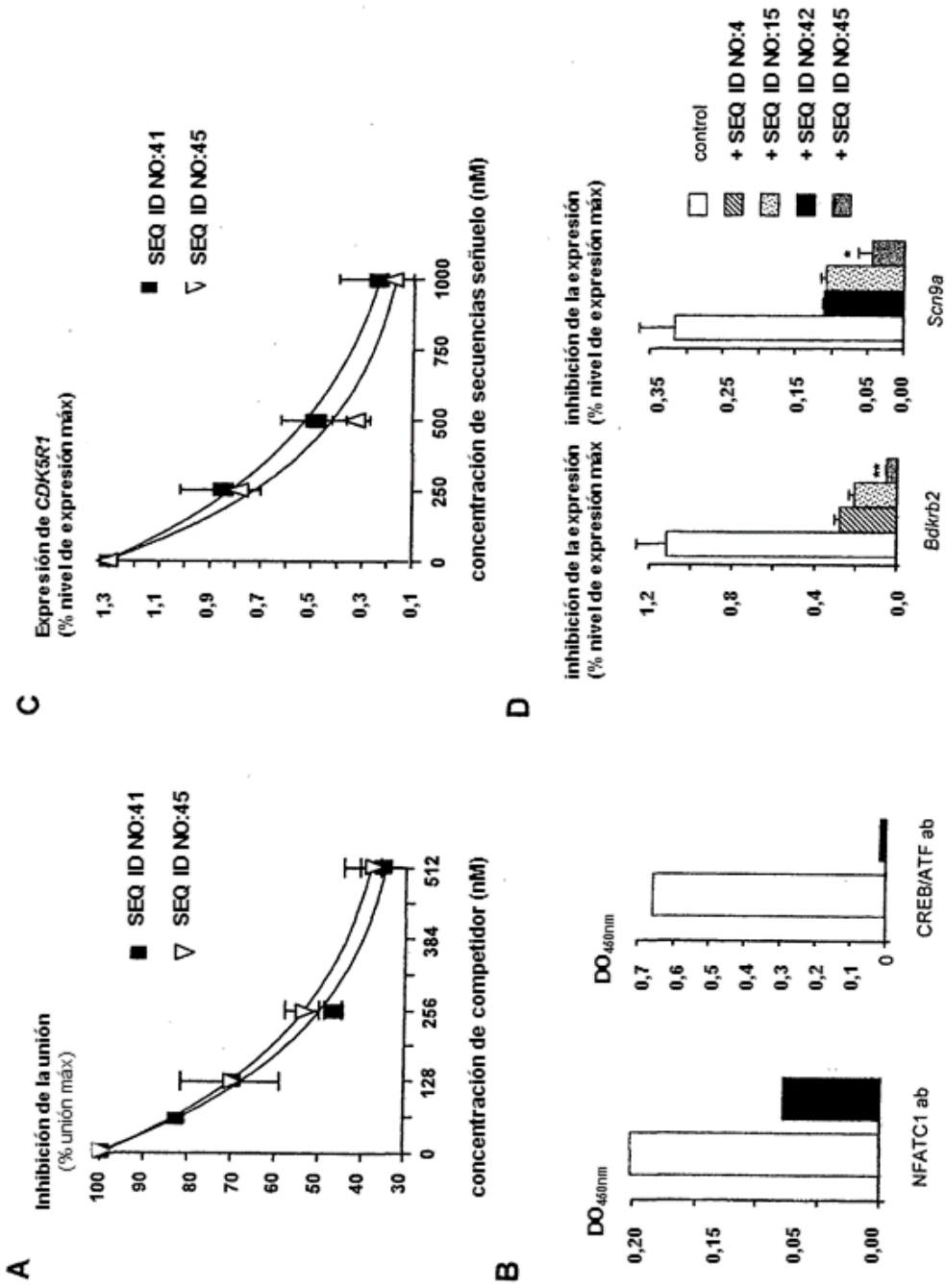


Fig. 7

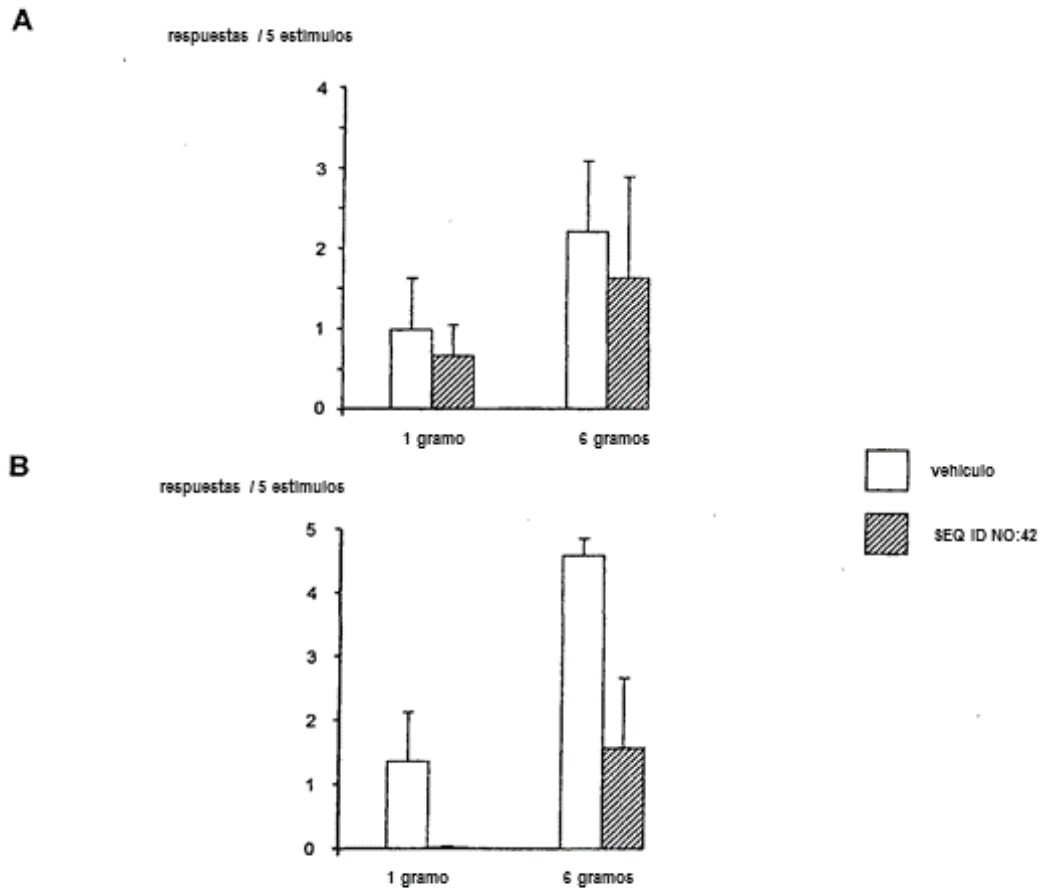


Fig. 8