

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 270**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2012 PCT/BE2012/000023**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12149614**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2012 E 12745763 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2705364**

54 Título: **Método de selección para agentes analgésicos**

30 Prioridad:

05.05.2011 GB 201107467

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

03.12.2018

73 Titular/es:

**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (100.0%)
K.U. Leuven R&D Waaistraat 6 Bus 5105
3000 Leuven, BE**

72 Inventor/es:

**VOETS, THOMAS y
VRIENS, JORIS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 692 270 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

Método de selección para agentes analgésicos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para Identificación de compuestos novedosos para el tratamiento del dolor, como TRPM3-antagonistas y compuestos que modulan la actividad o expresión de TRPM3.

10 La presente divulgación se refiere además al uso de los antagonistas de TRPM3 como analgésicos y el uso de los compuestos de esta invención para el tratamiento del dolor tales como pero no limitado a la hiperalgesia inflamatoria.

Antecedentes de la invención

15 La detección y rápida evitación de estímulos térmicos nocivos es crucial para la supervivencia (Basbaum et al., 2009). Tanto los estímulos térmicos dolorosos como los inocuos son transmitidos por neuronas sensoriales aferentes primarias que inervan la piel y la boca y tienen sus cuerpos celulares en los ganglios trigeminal (TG) y de la raíz dorsal (DRG) (Basbaum et al., 2009; Caterina, 2007). La evidencia acumulada indica que la detección de estímulos térmicos en mamíferos depende en gran medida de la activación de los canales de catión no selectivos sensibles a la temperatura de la superfamilia TRP (Bandell et al., 2007; Basbaum et al., 2009; Caterina, 2007; Talavera et al., 2008). TRPM8 y TRPA1 se mostraron activados por enfriamiento (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a; Story et al., 2003) y mediar respuestas frías en las neuronas TG y DRG (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007; Karashima et al., 2009). En consecuencia, los ratones knockout que carecen de TRPM8 o TRPA1 exhiben déficits de comportamiento específicos en respuesta a los estímulos fríos (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007; Kwan et al., 2006; Nilius y Voets., 2007), aunque la participación de TRPA1 en la detección de frío in vivo sigue siendo un tema de debate (Bautista et al., 2006; Karashima et al., 2009; Knowlton et al., 2010; Kwan et al., 2006). Por el contrario, cuatro miembros de la subfamilia TRPV, TRPV1-4, se activan al calentarse (Caterina et al., 1999; Caterina et al., 1997; Chung et al., 2003; Guler et al., 2002; Peier et al., 2002b; Smith et al., 2002; Watanabe et al., 2002; Xu et al., 2002). TRPV1, un sensor de calor y capsaicina expresado en las neuronas nociceptoras, está involucrado en la detección del dolor evocado por el calor, particularmente en tejidos inflamados (Caterina et al., 2000; Caterina et al., 1997; Davis et al., 2000; Tominaga et al., 1998). Los TRPV3 y TRPV4 relacionados se expresan fuertemente en los queratinocitos de la piel y se han implicado principalmente en la detección de temperaturas cálidas inocuas (Chung et al., 2003; Chung et al., 2004; Lee et al., 2005; Moqrich et al., 2005; Peier et al., 2002b; Smith et al., 2002; Xu et al., 2002). TRPV2 se activa por calor extremo (>50°C) (Caterina et al., 1999), y se ha considerado como un candidato molecular potencial para explicar la activación de las neuronas sensoriales deficientes en TRPV1 a temperaturas superiores a los ~50°C, como, así como la respuesta nocifensiva residual a estímulos de calor nocivos en ratones deficientes en TRPV1 (Caterina et al., 2000). Sin embargo, queda por establecer si TRPV2 funciona como un termosensor in vivo, ya que aún no se han descrito déficits en la detección de calor nocivo para ratones deficientes en TRPV2. Además, se ha demostrado claramente que una gran parte de los nociceptores sensibles al calor carecen de expresión tanto de TRPV1 como de TRPV2 (Woodbury et al., 2004). Por lo tanto, la base molecular de la detección de calor nocivo independiente de TRPV1 en el sistema somatosensorial es actualmente desconocida (Basbaum et al., 2009)

45 TRPM3 es un miembro de la subfamilia de melastatina de los canales de TRP con homología limitada a los canales de TRPV sensibles al calor. Se expresa en una variedad de tejido neuronal y no neuronal (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003; Oberwinkler y Philipp, 2007). El gen TRPM3 codifica diferentes isoformas de TRPM3 debido al empalme alternativo y al uso de exones, lo que lleva a canales con propiedades de activación y poros divergentes (Oberwinkler y otros, 2005). El neurosteroido sulfato de pregnenolona (PS) es actualmente el activador conocido más potente de TRPM3 (en caso, la (2 isoforma, Wagner et al., 2008), y la activación inducida por PS de las corrientes similares a TRPM3 se ha ligado a la contracción del músculo liso vascular la y la liberación de insulina inducida por Ca²⁺ de los islotes pancreáticos in vitro (Naylor et al., 2010; Wagner et al., 2008). Sin embargo, actualmente no está claro si la activación de TRPM3 inducida por PS se está produciendo in vivo, y los roles fisiológicos del canal siguen siendo poco claros (Nilius y Voets, 2008).

55 Estudios previos que demuestran la expresión de ARNm codificante de TRPM3 en neuronas sensoriales (Lechner et al., 2009; Nealen et al., 2003; Staaf et al., 2010), y respuestas al dolor inducidas por PS en ratones (Ueda et al., 2001) nos animó a investigar el posible papel de TRPM3 en la somatosensación y la nocicepción. En este estudio, encontramos que TRPM3 se expresa funcionalmente en un gran subconjunto de neuronas sensoriales de la raíz dorsal y los ganglios del trigémino (DRG y TG), y representa la mayoría de las respuestas de PS en estas células. La inyección intraplantar de PS provoca respuestas nocifensivas en ratones de tipo silvestre pero no en ratones *Trpm3*^{-/-}, lo que indica que la activación de TRPM3 provoca dolor. Además, descubrimos que TRPM3 es activado por calor. En consecuencia, los ratones deficientes en TRPM3 exhiben claros déficits en su respuesta de evitación al calor nocivo, pero no al frío nocivo ni a los estímulos mecánicos. Los ratones deficientes en TRPM3 tampoco lograron desarrollar hiperalgesia por calor después de un estímulo inflamatorio. Nuestros resultados proporcionan evidencia de que TRPM3 desempeña un papel previamente no anticipado en la sensación de calor y la nocicepción.

Resumen de la invención

La presente invención se basa en el hallazgo de que la Melastatina-3 potencial del receptor transitorio (TRPM3) es un canal nociceptor implicado en la detección del dolor. Se demostró que la TRPM3, expresada molecular y funcionalmente en las neuronas sensoriales, funciona como una quimio y termosensor en el sistema somatosensorial y media respuestas conductuales nocifensivas. Interferir con la función TRPM3, por ejemplo, mediante los agentes antagonistas TRPM3 y/o los agentes que reducen la expresión de TRPM3 pueden usarse como un tratamiento analgésico y/o profilaxis del dolor o la percepción del dolor. Por lo tanto, un primer aspecto de la divulgación se relaciona con el uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis del dolor, en donde dicho agente se selecciona de la lista que consiste en: un agente que es un antagonista de TRPM3 o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo; un agente que interfiere e inhibe preferentemente la producción de mensajeros endógenos de activación de TRPM3; un agente que interfiere e inhibe preferentemente la actividad de las neuronas sensoriales que expresan TRPM3 y un agente que inhibe la expresión del gen que codifica TRPM3 o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se divulga una composición farmacéutica para el tratamiento y/o profilaxis del dolor, cuya composición comprende un agente seleccionado de la lista que consiste en: un agente que es un antagonista de TRPM3 o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo; un agente que interfiere e inhibe preferentemente la producción de mensajeros endógenos de activación de TRPM3; un agente que interfiere e inhibe preferentemente la actividad de las neuronas sensoriales que expresan TRPM3; y un agente que inhibe la expresión del gen que codifica TRPM3 o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención se refiere a un método para la identificación de un agente para el tratamiento y/o profilaxis del dolor, en el que dicho método comprende la selección de agentes capaces de inhibir TRPM3. En una realización particular, dicho método para la identificación de un agente para el tratamiento y/o la profilaxis del dolor comprende la selección de agentes capaces de interferir e inhibir o bloquear preferentemente la cascada de señalización TRPM3. En otra realización particular, dicho método para la identificación de un agente para el tratamiento y/o profilaxis del dolor comprende la selección de agentes capaces de inhibir la expresión del gen que codifica TRPM3.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, el tratamiento del dolor es el tratamiento y/o la profilaxis del dolor asociado con cualquier enfermedad o afección. En realizaciones particulares de esta invención, el dolor o afección o enfermedad para la que se prevé el tratamiento y/o la profilaxis es la hiperalgesia. En otras realizaciones particulares, el dolor o afección o enfermedad para la que se prevé el tratamiento y/o la profilaxis es una enfermedad o afección relacionada con la inflamación tal como, pero no limitada a hiperalgesia inflamatoria.

Ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a un método para modular, inhibir o disminuir preferentemente, la percepción del dolor en un sujeto, en el que dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad afectiva de un agente seleccionado de la lista que consiste en: un agente que es un antagonista de TRPM3 o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo; un agente que interfiere e inhibe preferentemente la producción de mensajeros endógenos de activación de TRPM3; un agente que interfiere e inhibe preferentemente la actividad de las neuronas sensoriales que expresan TRPM3; y un agente que inhibe la expresión del gen que codifica TRPM3 o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. En realizaciones más particulares, dicho método para modular, inhibir o disminuir preferentemente, la percepción del dolor en un sujeto es un método en el que la disminución del nivel o la actividad de TRPM3 cambia, inhibe o disminuye preferentemente, la percepción del dolor en un sujeto.

En ciertas realizaciones de la divulgación, el agente de esta invención se selecciona de la lista que consiste en: un agente que es un antagonista de TRPM3 o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo; un agente que interfiere e inhibe preferentemente la producción de mensajeros endógenos de activación de TRPM3; un agente que interfiere e inhibe preferentemente la actividad de las neuronas sensoriales que expresan TRPM3; y un agente que inhibe la expresión del gen que codifica TRPM3 o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. En ciertas realizaciones de la presente invención, dicho agente es una molécula pequeña, un oligonucleótido antisentido, un aptámero, una molécula pequeña de ARN o ARNi interferente, un receptor soluble, una ribozima o un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el agente es un antagonista de TRPM3 o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. En realizaciones más específicas de esta invención, dicho antagonista de TRPM3 es un anticuerpo, una molécula pequeña, un aptámero o un receptor soluble y en otras realizaciones específicas dicho antagonista de TRPM3 es un anticuerpo TRPM3 o un aptámero de TRPM3. En otras realizaciones particulares, el agente inhibe la expresión del gen que codifica TRPM3, tal como, pero no limitado a, un oligonucleótido antisentido, un aptámero, un pequeño ARN interferente o un agente ARNi, una pequeña molécula y una ribozima, o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma. En realizaciones específicas adicionales de esta invención, dicho agente que inhibe la expresión del gen que codifica TRPM3 es una molécula de ARNi de TRPM3 o un aptámero de TRPM3. En otras realizaciones particulares de la presente invención, el agente de esta invención es un agente que inhibe la expresión del gen que codifica un agonista de TRPM3, tal como, entre otros, un oligonucleótido antisentido, un aptámero, un pequeño agente de ARN o ARNi interferente, una molécula pequeña y una ribozima, o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma.

En ciertas realizaciones de la presente invención, el sujeto es un mamífero. En ciertas realizaciones de la presente invención, el sujeto es un primate. En otras realizaciones de la presente invención, el sujeto es un ser humano. En ciertas realizaciones más de la presente invención, el sujeto es un animal de ensayo de laboratorio.

5 En ciertas realizaciones de la presente invención, el medicamento a ser identificado por el método reivindicado es para el control del dolor, más particularmente el control del dolor en un sujeto, preferentemente un humano.

La presente divulgación se refiere además a un método para tratar o prevenir los síntomas asociados con dolor o sensación o percepción de dolor en un sujeto, más particularmente dicho método comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente de esta invención, preferentemente durante un tiempo y bajo condiciones para mejorar uno o más síntomas, por ejemplo, los síntomas asociados con el dolor o una enfermedad o condición asociada con el dolor.

15 En una realización más particular, tales síntomas están asociados con la sensación o percepción de dolor y en otra realización particular tales síntomas están asociados con afecciones de enfermedad inflamatoria, tales como, pero sin limitación, hiperalgesia inflamatoria.

En ciertas realizaciones de esta invención, la hiperalgesia es hiperalgesia primaria, hiperalgesia secundaria o hiperalgesia inducida por opioides.

20 En ciertas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o afección relacionada con la inflamación es inflamación, hiperalgesia inflamatoria, acné, angina, artritis, neumonía por aspiración, empiema, gastroenteritis, gripe intestinal, enterocolitis necrotizante, enfermedad inflamatoria pélvica, faringitis, pleuritis, afección de garganta, rubor, dolor de garganta, gripe estomacal e infecciones del tracto urinario, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica o polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica.

Descripción

30 Breve descripción de las figuras de la invención.

Figura 1. El TRPM3 se expresa en neuronas somatosensoriales

(A) RT-PCR cuantitativa que muestra la expresión de ARNm de los canales de TRP indicados (en relación con TRPV1) en neuronas DRG aisladas (izquierda) y TG (derecha) (n = 3 experimentos independientes).

(B) Hibridación in situ utilizando sondas de ARN antisentido específicas para la detección de ARNm de TRPM3 y TRPV1 en secciones de tejido de DRG (paneles superiores) y TG (paneles inferiores). Las sondas de detección no revelaron ninguna tinción específica (ver Figura 9). La barra de escala representa 100 μm .

(C) Transferencia de Western de las fracciones de membrana totales aisladas de los tejidos DRG y TG de ratones $\text{Trpm3}^{+/+}$ y $\text{Trpm3}^{-/-}$ usando un anticuerpo específico de TRPM3. La detección de Na^+/K^+ ATPasa se utilizó como control de la carga igual de muestras de proteínas (30 $\mu\text{g}/\text{carril}$). Los datos se representan como media \pm SEM

45 Figura 2. Reducción de respuestas de PS en neuronas sensoriales deficientes en TRPM3

(A-B) Rastros representativos que muestran patrones típicos de Ca^{2+} intracelular en neuronas DRG de ratones $\text{Trpm3}^{+/+}$ (A) y $\text{Trpm3}^{-/-}$ (B) en respuesta al sulfato de pregnenolona (PS, 5 μM y 10 μM), nifedipina (Nif, 10 μM), aceite de mostaza (MO, 100 μM), capsaicina (cápsulas, 2 μM) y K^+ (50 mM)

(C-D) Prevalencia de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (C) y del trigémino (D) que responden a PS (10 μM), caps, MO o que no responden a estos tres estímulos (NR) en $\text{Trpm3}^{+/+}$ (Negro, n = 303 para DRG y n = 273 para TG) y ratones $\text{Trpm3}^{-/-}$ (gris, n = 356 para DRG y n = 320 para TG). ***, P < 0.001 (prueba exacta de Fisher).

(E-F) Curso temporal de la corriente interna de células enteras a -40 mV en neuronas TG de ratones $\text{Trpm3}^{+/+}$ (E) y $\text{Trpm3}^{-/-}$ (F) mediante estimulación con sulfato de pregnenolona (PS, 20 μM y 50 μM) o capsaicina (2 μM , recuadro F).

(G) Corrientes activadas por PS (20 μM y 50 μM) a -40 mV en neuronas TG individuales de ratones $\text{Trpm3}^{+/+}$ y $\text{Trpm3}^{-/-}$ (gris).

El diagrama de caja indica la media, así como los percentiles 10, 25, 75 y 90%.

(H) Amplitud de corrientes a un potencial de mantenimiento de +80 y -80 mV (medido con rampas de voltaje) durante la aplicación de 50 μM PS en una neurona DRG $\text{Trpm3}^{+/+}$ en solución libre de Na^+ .

(I) Relación corriente-voltaje antes (negro) y durante la aplicación (rojo) de PS (50 μM). Los puntos de tiempo se indican en el panel (H).

5 (J) Relación de corriente-voltaje de la corriente inducida por PS obtenida como la diferencia entre las dos trazas en el panel (I). Tenga en cuenta que la corriente se está rectificando abruptamente hacia afuera y muestra un potencial de inversión cercano a 0 mV, de acuerdo con las características de los canales TRPM3 expresados de manera heteróloga.

Figura 3. La capacidad de respuesta de la PS se limita a las neuronas DRG de diámetro pequeño

10 Se muestra una distribución de tamaño de una población total de neuronas DRG, y de la subpoblación de neuronas sensibles a la capsaicina (roja) y sensibles a la PS (verde). Las respuestas de PS se restringieron a las neuronas con un diámetro $<25 \mu\text{m}$ (diámetro promedio: $12.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$), similar al tamaño de las neuronas sensibles a la capsaicina (diámetro promedio: $12.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$).

15 Figura 4. Respuestas nocifensivas y aversivas a PS

(A-B) Duración total del comportamiento nocifensivo (A) y número de respuestas de comportamiento (la pata se lame y se levanta en 2 minutos; (B) en respuesta a la inyección intraplantar de vehículo (VHC), progesterona (PRO, 20 nmol/pata), sulfato de pregnenolona (PS, 2.5 o 5 nmol/pata) o capsaicina (caps, 1 nmol/pata) en ratones $\text{Trpm3}^{+/+}$ y $\text{Trpm3}^{-/-}$ (n = 8 para cada genotipo).

20

(C) Efecto de la adición de PS al agua potable sobre el consumo de agua en ratones $\text{Trpm3}^{+/+}$ y $\text{Trpm3}^{-/-}$ (n = 6 para cada genotipo). **, P <0.01, *** P <0.001 (prueba t de dos muestras). Los datos se representan como media \pm SEM.

25 Figura 5. TRPM3 es un canal sensible al calor

(A) Comparación de las respuestas de Ca^{2+} intracelular a PS (20 μM), capsaicina (2 μM) y calor (aumento rápido de la temperatura de 25 a 40°C) en células HEK293T transfectadas transitoriamente con TRPV1 (arriba) o TRPM3 (la isoforma TRPM3 α 2) (parte inferior). Imágenes en pseudocolor de células cargadas con Fura-2; la barra de escala muestra la concentración de calcio intracelular. Los círculos verdes indican células transfectadas, como se evidenció mediante la fluorescencia de GFP.

30

(B) Aumento de calcio inducido por PS, capsaicina y calor en células HEK293T no transfectadas (NT, negro n=39), y en células HEK293T transfectadas transitoriamente con TRPV1 (rojo, n=31) o TRPM3 (verde, n=29).

35

(C) Curso de tiempo de las corrientes de células completas a +150 y -150 mV en células HEK293T transfectadas con TRPM3 estimuladas con calor y PS (50 μM).

(D) Relaciones representativas de corriente-voltaje obtenidas de los puntos de tiempo indicados en (C)

40

(E) Corrientes representativas de TRPM3 de célula completa registradas durante pasos de voltaje que van desde -80 a +200 mV a las temperaturas indicadas.

(F) Promedio de amplitudes de corriente en estado estacionario a las temperaturas indicadas. Las células no transfectadas se indican como líneas punteadas. Los datos se representan como media \pm SEM.

45

Figura 6. Efectos sinérgicos del calor y la PS en TRPM3

(A) Cambios relativos en la fluorescencia de Fluo-4 en respuesta a un aumento gradual de la temperatura de 16 a 43°C en HEK293T que expresa TRPM3 de forma estable en ausencia y presencia de PS 10 μM , y en células HEK293T no transfectadas. La PS no afectó la respuesta al calor de células HEK293T no transfectadas (datos no mostrados). El nivel de expresión de TRPM3 en células TRPM3 que expresan establemente se muestra en la FIG. 9B.

50

(B) Ejemplos típicos del aumento de calcio intracelular inducido por dosis bajas de PS (100 y 500 nM) aplicados a temperatura ambiente (22°C) y 37°C en células HEK293T que expresan TRPM3 de forma estable.

55

(C) Diagrama de barras que muestra los incrementos promedio de Ca^{2+} en respuesta a las concentraciones de PS indicadas aplicadas a temperatura ambiente (negro) y a 37°C (rojo) (n \geq 35). Los datos se representan como media \pm SEM.

60

(D) Curso de tiempo de las respuestas de corriente de células completas a +150 mV a una dosis baja de PS (5 μM) aplicada a diferentes temperaturas.

(E) Relaciones de voltaje-corriente de la corriente inducida por PS a diferentes temperaturas, determinada como la diferencia entre las corrientes obtenidas en los puntos de tiempo indicados por los círculos de color (círculos abiertos menos círculos cerrados).

65

(F) Dependencia de la temperatura de la amplitud de corriente activada por PS (5 μ M; n=5). Los datos se representan como media \pm SEM.

5 Figura 7. Respuestas al calor dependientes de TRPM3 en neuronas somatosensoriales

(A-B) Rastros representativos que muestran patrones típicos de Ca^{2+} intracelular en neuronas TG de ratones *Trpm3*^{+/+} (A) y *Trpm3*^{-/-} (B) en respuesta a sulfato de pregnenolona (PS, 10 μ M), nifedipina (Nif, 10 μ M), capsaicina (cáps, 2 μ M), calor (43°C) y K^+ (50 mM).

10 (C-D) Porcentaje de neuronas DRG (C) y TG (D) que responden al calor en preparaciones de *Trpm3*^{+/+} (n=135 para DRG y n=159 para TG), *TRPM3*^{-/-} (n=217 para DRG y n=237 para TG), *TRPV1*^{+/+} (n=132 para DRG y n=106 para TG) y *TRPV1*^{-/-} (n=191 para DRG y n=105 para TG) ratones. Diferentes colores corresponden a los diferentes subtipos de respondedores de calor basados en PS y sensibilidad a la capsaicina.

15 Figura 8. Respuestas de comportamiento deterioradas al calor nocivo en ratones *Trpm3*^{-/-}

(A-C) Latencias de respuesta para ratones *Trpm3*^{+/+} y *Trpm3*^{-/-} en inmersión de cola (n=10 para cada genotipo), placa caliente (n=7 para cada genotipo) y pruebas de gancho de cola (n=8 para cada genotipo). *, P <0.05; **, P <0.01; prueba t de dos muestras.

(D) Comparación del comportamiento de los ratones *Trpm3*^{+/+} (n=13) y *Trpm3*^{-/-} (n=12) en el gradiente durante toda la duración del experimento (120 min). Los ratones *Trpm3*^{+/+} y *Trpm3*^{-/-} muestran zonas de temperatura preferidas similares.

25 (E) Comparación del comportamiento de los ratones *Trpm3*^{+/+} (n=13) y *Trpm3*^{-/-} (n=12) en el gradiente durante los primeros 30 minutos del experimento.

(F) Comparación del comportamiento de los ratones *Trpm3*^{+/+} (n=16) y *Trpm3*^{-/-} (n=19) en la prueba de elección de dos temperaturas, con las placas ajustadas a las temperaturas indicadas. Porcentaje de tiempo que los ratones pasaron en el lado I. *, P <0.05; **, P <0.01 (prueba t de dos muestras). Los datos se representan como media \pm SEM.

(G-H) Cambio en la latencia de la placa caliente (G) y la respuesta de la placa fría (H) 24 h después de la inyección interplanetaria de CFA en *Trpm3*^{+/+} (negro) y *Trpm3*^{-/-} (gris) (n=6 para cada genotipo; **, P<0.01 para inyección de vehículo versus CFA; prueba t de dos muestras).

35 Figura 9. Experimentos De Control Para La Expresión De ARNm De TRPM3

(A) Hibridación in situ utilizando una sonda de ARN con sentido contra el ARNm de TRPV1 y TRPM3 en secciones de tejido de DRG (parte superior) y TG (parte inferior). Barra de escala representa 50 μ m.

(B) PCR cuantitativa en tiempo real que muestra la expresión del ARNm de TRPM3 en células HEK293 que expresan de forma estable TRPM3, en TG aislados, DRG e islotes pancreáticos (n=2 experimentos independientes). Los datos representan unidades relativas de expresión de ARN calibradas para la expresión endógena de TRPM3 en DRG.

45 Figura 10. Generación de ratones knockout TRPM3

(A) Representación esquemática de la estrategia de focalización utilizada para generar ratones *Trpm3*^{-/-}. Se insertó un casete que contenía una construcción de fusión β -geo flanqueada por una secuencia IRES en el extremo 5' en el exón 17 del gen mTRPM3 mediante recombinación homóloga.

(B) PCR en el ADN genómico obtenido de ratones *Trpm3*^{+/+}, *Trpm3*^{+/-} y *Trpm3*^{-/-} usando dos pares de cebadores diferentes. Se anotan la secuencia de nucleótidos de los cebadores y las longitudes de amplicón pronosticadas. Las posiciones específicas de los conjuntos de cebadores en la secuencia genómica se indican mediante pequeñas flechas en el panel A. Los carriles 8 y 9 no muestran controles de plantilla (NTC) para cada conjunto de cebadores.

(C) Análisis de transcriptasa inversa (RT)-PCR de la expresión de TRPM3 en ratones de tipo silvestre (WT) y *Trpm3*^{-/-}. PCR con cebadores específicos de *Trpm3* y *Trpv1* en el cDNA generado por reacciones de RT a partir de RNA total de TG y DRG tejidos aislados de ratones WT y *Trpm3*^{-/-}. Se anotan la secuencia de nucleótidos de los cebadores y las longitudes de amplicón pronosticadas. Los cebadores específicos de *Trpm3* se indican mediante pequeñas flechas en el panel A.

(D) Inmunodetección de proteínas TRPM3 en fracciones de membrana total aisladas de cerebros de ratones de tipo silvestre (+/+) y *Trpm3*^{-/-}. La detección de Na^+/K^+ ATPasa se utilizó como control de la carga igual de muestras de proteínas (13 μ g/carril). Los asteriscos indican bandas no específicas detectadas en ambos grupos.

Figura 11. TRPM3-Respuestas de PS dependientes en las neuronas TG

(A-B) Se expusieron trazas representativas de neuronas trigeminales aisladas de ratones *Trpm3^{+/+}* (A) y *Trpm3^{-/-}* (B) a sulfato de pregnenolona (PS; 5 μ M y 10 μ M), nifedipina (Nif, 10 μ M), aceite de mostaza (MO, 100 μ M), capsaicina (caps, 2 μ M) y K^+ (50 mM), las respuestas se evaluaron mediante imágenes de calcio.

Figura 12. El efecto de PS se conserva en Knockout Doble *Trpv1^{-/-}/Trpa1^{-/-}*

(A-C) Rastros representativos de neuronas DRG (A y B) y TG (C) aisladas de ratones WT (A) y ratones knockout doble *Trpv1^{-/-}/Trpa1^{-/-}* (B y C). Las neuronas somatosensoriales se expusieron a sulfato de pregnenolona (PS, 10 μ M), nifedipina (Nif, 50 μ M), aceite de mostaza (MO, 100 μ M), capsaicina (caps, 2 μ M) y solución que contiene alto K^+ (50 mM).

(D-E) Prevalencia de neuronas DRG (D) y TG (E) que responden a PS (10 μ M), caps, MO o que no responden a estos tres estímulos (NR) en tipo silvestre (barras negras, n=134) o knockout doble *Trpv1^{-/-}/Trpa1^{-/-}* (barras cian, n=101). ***, $P < 0.001$ (prueba exacta de Fisher).

Figura 13. Experimentos de comportamiento realizados en cepas de control y ratones *Trpm3^{-/-}*

(A-B) Las respuestas de comportamiento (la pata se lame y se levanta) al vehículo (Vhc), progesterona (PRO, 25 nmol/pata trasera), sulfato de pregnenolona (PS, 2.5 y 5 nmol/pata trasera) y capsaicina (caps, 2.5 nmol/pata trasera) fueron medidos como en las figura 4A y 4B para C57BL/6J (n=8), 129SvEvBrd (n=9), knockout doble *Trpv1^{-/-}/Trpa1^{-/-}*, (n=7), ratones *Trpm3^{+/+}* y *Trpm3^{-/-}* (n=7). (C) Latencias de respuesta para ratones C57BL/6J, 129SvEvBrd, *Trpm3^{+/+}* y *Trpm3^{-/-}* en inmersión de cola a 48°C (n \geq 7 para cada genotipo), que muestran respuestas de comportamiento deterioradas a un calor nocivo. **, $P < 0.01$, (prueba t de dos muestras). Los datos se representan como media \pm SEM.

Figura 14. Desensibilización moderada de las respuestas TRPM3 después de la activación repetitiva.

(A y C) Ca^{2+} datos de imágenes para la activación repetitiva de TRPM3 con 40 μ M de PS (A) y estímulos de calor (42°C) (C) en líneas celulares TRPM3 estables. (B y D). Las respuestas de TRPM3 a PS (B) y los estímulos de calor (42°C) (D) se normalizaron a la primera respuesta. Las barras de error representan la media \pm SEM.

Figura 15. Modelar TRPM3 como un canal termosensible

(A) Trazas de corriente provocadas a diferentes temperaturas en respuesta al protocolo de voltaje indicado (izquierda). Trazas de corriente simuladas a diferentes temperaturas según lo predicho por el modelo de dos estados para canales TRP sensibles a la temperatura (derecha).

(B) Trazas media de la corriente-voltaje promedio a diferentes temperaturas (círculos cerrados) y trazas ajustadas (línea) calculadas por el modelo de dos estados.

(C) Entalpías y entropías asociadas con las transiciones de apertura (ΔH_{α} y ΔS_{α}) y de cierre (ΔH_{β} y ΔS_{β}) y diferencias en entalpía y entropía entre los estados abierto y cerrado (ΔH^{\ddagger} y ΔS^{\ddagger}), así como la valencia efectiva de la carga de activación (z) para diferentes termoTRPs.

(D) Comparación de las corrientes de TRPV1 y TRPM3 simuladas a -80 mV en función de la temperatura, utilizando los parámetros mostrados en (C) y asumiendo 1000 canales/celda.

Figura 16. Sensibilidad al calor de las neuronas DRG y comportamiento nociceptivo en presencia del bloqueador de TRPV1 AMG 9810.

(A-B) Ca^{2+} datos de imágenes que muestran una inhibición total de las respuestas de calor mediada por TRPV1 (42°C) y capsaicina (2 μ M) (A), pero calor sin alterar mediado por TRPM3 (42°C) y PS (40 μ M) respuestas (B).

(C) Efecto de AMG 9810 (5 μ M) sobre el porcentaje de neuronas DRG de ratones *Trpm3^{+/+}* y *Trpm3^{-/-}* que responden al calor (42°C) capsaicina (2 μ M) y PS (10 μ M). ***, $P < 0.001$ (prueba exacta de Fisher).

(D-E) Latencias de respuesta de las camadas *Trpm3^{+/+}* y *Trpm3^{-/-}* en placa térmica (55°C, D) y ensayos de inmersión de cola (48°C; E) (n=6 para cada condición), antes (basal) y después de siete inyecciones diarias con vehículo (vhc) o AMG 9810 (3 mg/kg). *, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (prueba t de dos muestras). Los datos se representan como media \pm SEM.

Figura 17. Prueba de gradiente térmico

(A-B) Comportamiento de los ratones $Trpm3^{+/+}$ (A) y $Trpm3^{-/-}$ (B) en el ensayo de gradiente térmico durante un ensayo de 2 horas, que se muestra en intervalos de 30 minutos ($n=13$ para ratones $Trpm3^{+/+}$ y $n=12$ para ratones $Trpm3^{-/-}$). Los datos se representan como media \pm SEM.

5 Figura 18. Temperatura interna del cuerpo después de las inyecciones de PS y capsaicina

(A-C) La temperatura central del cuerpo se midió utilizando el sistema de telemetría Physio Tel™ (DSI International, EE. UU.) Después de la inyección subcutánea del vehículo (A), sulfato de pregnenolona (PS, 28 mg/kg) (B) y capsaicina (cápsulas, 0.4 mg/kg). (C) en ratones $Trpm3^{+/+}$ (línea negra) y $Trpm3^{-/-}$ (línea gris) ($n=3$ para cada genotipo, las trazas representan la media \pm SEM).

Descripción

15 La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que TRPM3, un canal de catión no selectivo permeable al Ca^{2+} , se asocia con la detección de dolor. La detección o sensación de dolor se debe, al menos en parte, a la señalización a través de TRPM3. Hemos demostrado que la inhibición de la función TRPM3 se puede usar como analgésicos en el tratamiento y/o profilaxis del dolor y la hiperalgesia térmica. Por lo tanto, en un primer objeto, la presente invención proporciona el uso de antagonistas de TRPM3 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis del dolor. Cuando se usa en este documento, el término dolor se relaciona con todo tipo de dolor y sensación o percepción de dolor, enfermedades o afecciones asociadas con el dolor. Dichos dolores o enfermedades o condiciones asociadas con el dolor son, por ejemplo, pero no se limitan a, dolor agudo, dolor crónico, dolor neuropático, dolor postoperatorio, migraña, artralgia, neuropatías, lesiones nerviosas, neuropatía diabética, neurodegeneración, trastorno neurótico de la piel, accidente cerebrovascular, hipersensibilidad de la vejiga urinaria, síndrome del intestino irritable, un trastorno respiratorio como asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica, irritación de la piel, los ojos o la membrana mucosa, fevescencia, úlcera estomacal-duodenal, enfermedad inflamatoria del intestino, hiperalgesia y enfermedades inflamatorias.

25 En ciertas realizaciones, la invención contempla agentes que comprenden antagonistas o moduladores (aumento o disminución más particularmente) de la actividad de TRPM3 y su uso, más en particular como un agente terapéutico para disminuir el dolor o para la fabricación de un medicamento para la prevención, tratamiento o profilaxis del dolor. En otras realizaciones, los agentes de la presente invención se seleccionan de moléculas pequeñas, oligonucleótidos (antisentido o aptámeros), agentes terapéuticos de antígenos, pequeños ARN interferentes (o ARN de interferencia en general), receptores solubles, anticuerpos y/o terapias celulares.

35 En la presente invención pequeñas moléculas, por ejemplo, las moléculas orgánicas pequeñas con una masa molecular <500 Da y otras moléculas adecuadas, también pueden funcionar como antagonistas o moduladores de TRPM3 para prevenir o tratar afecciones asociadas con el dolor. Las moléculas pequeñas y otros candidatos fármacos pueden obtenerse fácilmente, por ejemplo, a partir de bibliotecas de productos naturales y combinatorias y utilizando métodos conocidos en la técnica, o métodos de selección de esta invención para seleccionar moléculas candidatas para su función antagonista o moduladora de TRPM3. Además, las bibliotecas de péptidos aleatorios, que consisten en todas las combinaciones posibles de aminoácidos, unidas a una fase sólida o en solución, también se pueden usar para identificar péptidos que actúan como antagonistas de TRPM3.

45 Los antagonistas o moduladores adecuados de TRPM3 también pueden desarrollarse mediante métodos conocidos de diseño de fármacos, por ejemplo, utilizando el análisis estructural de los interactores TRPM3 conocidos, incluidos los inhibidores o antagonistas de TRPM3, o el complejo de TRPM3 con estos interactores empleando métodos establecidos en la técnica, por ejemplo, usando cristalografía de rayos X para analizar la estructura del complejo formado (ver ejemplo Sielecki, AR et al. Science 1989; 243: 1346-51; Dhanaraj, V. et al. Nature 1992; 357 (6377): 466-72) y/o modificando los interactores conocidos de TRPM3, inhibidores más particulares o antagonistas de TRPM3, es decir, "compuestos de plomo", para obtener inhibidores (y más potentes) y compuestos para diferentes modos de administración (es decir, oral versus intravenoso).

55 La presente divulgación se refiere a anticuerpos dirigidos contra TRPM3, y rompe o modula la formación del complejo entre TRPM3 y compuestos, por ejemplo, ligandos, que interactúan con TRPM3 y/o estimulan TRPM3, y el uso de dichos anticuerpos. La invención también se refiere al desarrollo de anticuerpos contra proteínas TRPM3 y a composiciones que los contienen, incluyendo anticuerpos producidos de forma natural y preparados de forma recombinante. Dichos anticuerpos podrían incluir tanto anticuerpos policlonales como monoclonales preparados mediante técnicas genéticas conocidas, así como anticuerpos bispecificos (quiméricos) y anticuerpos que incluyen otras funcionalidades que los satisfacen para un uso diagnóstico adicional en conjunción con su capacidad de modular, en particular inhibiendo o antagonizando la actividad TRPM3.

60 Además, los anticuerpos que incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, y medicamentos que modulan la producción o actividad de TRPM3 y/o sus subunidades pueden poseer ciertas aplicaciones de diagnóstico y, por ejemplo, pueden utilizarse con el fin de detectar y/o medir condiciones tales como la sensación de dolor o similares.

Por ejemplo, TRPM3 o sus fragmentos pueden usarse para producir anticuerpos policlonales y monoclonales contra sí mismos en una variedad de medios celulares, mediante técnicas conocidas como la técnica de hibridoma que utiliza, por ejemplo, linfocitos de bazo de ratón fusionados y células de mieloma. Del mismo modo, las moléculas pequeñas que imitan o antagonizan la actividad(es) de los agentes de la invención se pueden descubrir o sintetizar, y se pueden usar en protocolos de diagnóstico y/o terapéuticos.

La metodología general para producir anticuerpos monoclonales por hibridomas es bien conocida. Las líneas celulares inmortales productoras de anticuerpos también pueden crearse mediante técnicas distintas a la fusión, como la transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico o la transfección con el virus de Epstein-Barr. Véase, por ejemplo, M. Schreier et al., "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas" (1981); Kennett et al., "Monoclonal Antibodies" (1980); véase también, Patente de EE.UU. Nos. 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,451,570; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632; 4,493,890. Los métodos para producir anticuerpos monoclonales TRPM3 también son bien conocidos en la técnica. Ver Niman et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 80: 4949-4953 (1983). Típicamente, el presente TRPM3 o un análogo peptídico se usa solo o conjugado con un vehículo inmunogénico, como el inmunógeno en el procedimiento descrito anteriormente para producir anticuerpos monoclonales TRPM3. Los hibridomas se seleccionan para determinar la capacidad de producir un anticuerpo que reaccione de forma inmunitaria con el análogo del péptido TRPM3 y la presente TRPM3. Los paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra los péptidos TRPM3 pueden seleccionarse para diversas propiedades; es decir, isótopo, epítipo, afinidad, etc. De particular interés son los anticuerpos monoclonales que neutralizan, inhiben o antagonizan la actividad de TRPM3. Tales monoclonales se pueden identificar fácilmente en los ensayos de actividad TRPM3. Los anticuerpos de alta afinidad también son útiles cuando es posible la purificación por inmunoafinidad de TRPM3 nativo o recombinante.

Los métodos para producir anticuerpos policlonales anti-polipéptido son bien conocidos en la técnica. Véase la patente de EE.UU. N° 4,493,795 de Nestor et al. Se puede preparar un anticuerpo monoclonal, que típicamente contiene Fab y/o F(ab'). Sub.2 porciones de moléculas de anticuerpo útiles, utilizando la tecnología de hibridoma descrita en Antibodies - A Laboratory Manual, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988), que se incorpora aquí como referencia. Brevemente, para formar el hibridoma a partir del cual se produce la composición del anticuerpo monoclonal, un mieloma u otra línea celular autoperpetuante se fusiona con linfocitos obtenidos del bazo de un mamífero hiperinmunizado con una proteína TRPM3, o un fragmento de la misma.

Los esplenocitos se fusionan típicamente con células de mieloma utilizando polietilenglicol (PEG) 6000. Los híbridos fusionados se seleccionan por su sensibilidad al HAT. Los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal útil en la práctica de esta invención se identifican por su capacidad para inmunorreaccionar con la presente TRPM3 y su capacidad para inhibir la actividad específica de TRPM3 en células diana.

Un anticuerpo monoclonal útil en la práctica de la presente invención puede producirse iniciando un cultivo de hibridoma monoclonal que comprende un medio nutriente que contiene un hibridoma que secreta moléculas de anticuerpo de la especificidad de antígeno apropiada. El cultivo se mantiene bajo condiciones y durante un período de tiempo suficiente para que el hibridoma secrete las moléculas de anticuerpo en el medio. Luego se recoge el medio que contiene el anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo se pueden aislar posteriormente mediante técnicas bien conocidas.

Los medios útiles para la preparación de estas composiciones son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente e incluyen medios de cultivo sintéticos, ratones consanguíneos y similares. Un medio sintético de ejemplo es el medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM; Dulbecco et al., Virol. 8:396 (1959)) suplementado con 4.5 g/l de glucosa, 20 mm de glutamina y 20% de suero de ternera fetal. Una cepa de ratón consanguínea de ejemplo es el Balb/c.

La inhibición de la expresión de TRPM3 puede ser deseable para tratar o prevenir afecciones asociadas con el dolor. Cuando la inhibición de la expresión de TRPM3 es deseable, también pueden usarse secuencias de ácido nucleico inhibitoras que interfieren con la expresión de TRPM3 a nivel transcripcional o de traduccional. Se puede aplicar la estrategia denominada antisentido, antígeno o interferencia de ARN. Estos enfoques utilizan, por ejemplo, ácidos nucleicos antisentido, ribozimas, agentes triplex o ARNs para bloquear la transcripción o traducción de ARNm o ADN de TRPM3 o de un ARNm o ADN específico de TRPM3, ya sea enmascarando ese ARNm con un ácido nucleico antisentido o ADN con un agente triple, al dividir la secuencia de nucleótidos con una ribozima o mediante la destrucción del ARNm a través de un mecanismo complejo involucrado en la interferencia de ARN.

La presente invención se extiende a oligonucleótidos antisentido, ribozimas, interferencias de ARN y agentes antigénicos, su uso y su preparación.

Los ácidos nucleicos antisentido son moléculas de ADN o ARN o análogos de ácido nucleico (por ejemplo, ácidos nucleicos de hexitol, ácidos nucleicos peptídicos) que son complementarios a al menos una porción de una molécula de ARNm específica (Weintraub Scientific American 1990; 262:40). En la célula, los ácidos nucleicos antisentido se hibridan con el ARNm correspondiente, formando una molécula de doble cadena. Los ácidos nucleicos antisentido interfieren con la traducción del ARNm, ya que la célula no traducirá un ARNm de doble cadena. Se prefieren

oligómeros antisentido de aproximadamente 15 nucleótidos, ya que se sintetizan fácilmente y tienen menos probabilidades de causar problemas que las moléculas más grandes cuando se introducen en la célula diana que produce TRPM3. También ácidos nucleicos o análogos, complementarios al sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre las regiones -10 o +10 de la secuencia de nucleótidos de TRPM3, se prefieren.

La potencia de los oligonucleótidos antisentido para inhibir TRPM3 puede mejorarse utilizando diversos métodos que incluyen la adición de polilisina, la encapsulación en liposomas (anticuerpos dirigidos, ácido catiónico, virus Sendai derivado, etc.) o en nanopartículas para entregar los oligonucleótidos a las células. Existen otras técnicas para mejorar la capacidad antisentido de los oligonucleótidos, como la conjugación de los oligonucleótidos antisentido, por ejemplo, a "péptidos que penetran células" (Manoharan, M. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2002; 12(2): 103-128/Juliano, R.-L. *Curr. Opin. Mol. El r.* 2000; 2(3): 297-303).

El uso de, por ejemplo, un oligonucleótido o un PNA (ácido nucleico peptídico) para detener la transcripción se conoce como estrategia antigénica (por ejemplo, formación de triplex). En el caso de los oligonucleótidos, el oligómero se enrolla alrededor del ADN de doble hélice (surco principal), formando una Hélice de tres cadenas. Por lo tanto, estos compuestos antigénicos pueden diseñarse para reconocer un sitio único en un gen elegido y bloquear la transcripción de ese gen in vivo. (Maher et al. *Antisense Res. y Dev.* 1991; 1:227; Helene, C. *Anticancer Drug Design* 1991; 6: 569/Casey, B. P. et al. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2001; 67: 163-192/Pooga, M. et al. *Biomol. Eng.* 2001; 17(6): 183-192/Nielsen, P. E. *Pharmacol. Toxicol.* 2000; 86(1): 3-7). Los oligonucleótidos antigénicos, así como los PNA, son fácilmente sintetizados por el experto en la materia e incluso están disponibles comercialmente.

Las ribozimas son moléculas que poseen la capacidad de escindir específicamente otro ARN de cadena sencilla de manera análoga a las endonucleasas de restricción de ADN. A través de la modificación de las secuencias de nucleótidos que codifican estos ARN, es posible diseñar moléculas que reconocen secuencias de nucleótidos específicas en una molécula de ARN y escindir las (Cech J. *Amer. Med. Assn.* 1988; 260:3030). Una ventaja importante de este enfoque es que, debido a que son específicos de la secuencia, solo se inactivan los ARNm con secuencias particulares.

Hay dos tipos básicos de ribozimas, a saber, tipo tetrahymena (Hasselhoff (1988) *Nature* 334: 585) y tipo "cabeza de martillo". Las ribozimas de tipo Tetrahymena reconocen secuencias que tienen cuatro bases de longitud, mientras que las ribozimas del tipo "cabeza de martillo" reconocen secuencias de bases de 11-18 bases de longitud. Cuanto más larga sea la secuencia de reconocimiento, mayor será la probabilidad de que la secuencia se produzca exclusivamente en la especie de ARNm diana. En consecuencia, las ribozimas de tipo cabeza de martillo son preferibles a las ribozimas de tipo tetrahymena para inactivar una especie de ARNm específica y las secuencias de reconocimiento basadas en 18 son preferibles a las secuencias de reconocimiento más cortas.

Los sitios específicos de escisión de la ribozima dentro de cualquier diana potencial de ARN se identifican inicialmente explorando la molécula diana para los sitios de escisión de la ribozima que incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, las secuencias de ARN cortas de entre 15 y 20 ribonucleótidos que corresponde a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión se pueden evaluar para determinar las características estructurales predichas, como la estructura secundaria que puede hacer que la secuencia de oligonucleótidos sea inadecuada. La idoneidad de las dianas candidatas también puede evaluarse probando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, utilizando ensayos de protección de ribonucleasa.

La interferencia de ARN implica la inserción de pequeñas piezas de ARN de doble cadena (ds) e incluso de una sola cadena en una célula. Si el ARNdc se corresponde con un gen en la célula, promoverá la destrucción del ARNm producido por ese gen, impidiendo así su expresión. Se ha demostrado que la técnica funciona en una variedad de genes, incluso en células humanas in vivo. Por ejemplo, los ARN de interferencia pequeños (ARNsi), los ARN de horquilla corta (ARNsh) o los vectores que expresan tales ácidos nucleicos pueden aplicarse en la estrategia de interferencia del ARN para inhibir la traducción del ARNm de TRPM3.

Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de ácidos nucleicos que median la interferencia del ARN específica para el ARNm de una proteína TRPM3 y al uso de ácidos nucleicos que median la interferencia del ARN específica para el ARNm de una proteína TRPM3, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de afecciones asociadas al dolor. Esto incluye el uso de ARNsi, ARNsh y vectores que expresan ácidos nucleicos para la interferencia de ARN.

El ARN antisentido, moléculas de ADN y análogos, ribozimas, compuestos antigénicos o ácidos nucleicos para la interferencia del ARN de la invención pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ácido nucleico. Estos incluyen técnicas para sintetizar químicamente oligonucleótidos bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, síntesis química de fosoramidita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN pueden generarse por transcripción in vitro e in vivo de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN antisentido. Las secuencias de ADN descritas en el presente documento pueden usarse, por lo tanto, para preparar tales moléculas. Dichas secuencias de ADN pueden incorporarse en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados, tales como los promotores de polimerasa T7 o

SP6. Alternativamente, las construcciones de ADNc antisentido que sintetizan ARN antisentido de forma constitutiva o inducible, dependiendo del promotor utilizado, pueden introducirse de forma estable en líneas celulares.

La función de supresión de TRPM3 también se puede lograr mediante la administración de un polipéptido variante (forma variante negativa dominante o receptor soluble) de TRPM3, o una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido variante de TRPM3. Al administrar un polipéptido variante de TRPM3 o una secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido, la variante competirá con la TRPM3 de tipo silvestre para transducir su señal y/o formará canales de TRPM3 heterotetraméricos no funcionales.

Otro aspecto de la presente divulgación es el uso de la transferencia de genes, incluida la terapia génica, para suministrar las moléculas mencionadas anteriormente que antagonizan o modulan la actividad de TRPM3. Terapia génica significa el tratamiento mediante el suministro de ácidos nucleicos terapéuticos a las células del paciente. Esto se revisa ampliamente en Lever y Goodfellow 1995; Br. Med Bull., 51, 1-242; Culver 1995; Ledley, F. D. 1995. Hum. Gene Ther. 6, 1129. Por transferencia génica, un ácido nucleico que codifica un agente antagonista de TRPM3 se introduce en las células de un sujeto para expresar el antagonista de TRPM3 e inhibir la función de TRPM3. Para lograr la terapia génica, debe haber un método de entrega de genes a las células del paciente y métodos adicionales para garantizar la producción efectiva de cualquier gen terapéutico. Hay dos enfoques generales para lograr la entrega de genes; Estos son la entrega no viral y la entrega de genes mediada por virus. Los vectores como se describen en este documento podrían usarse para este propósito.

En una realización de la invención, el ácido nucleico que codifica un antagonista o modulador de TRPM3 se introduce en un sujeto para expresar el antagonista o modulador y prevenir o tratar una afección asociada con el dolor. Para la transferencia de genes, los pasos clave son 1) para seleccionar el modo de entrega, por ejemplo, un vector adecuado para la administración de los genes inhibidores al sujeto, 2) administrar el ácido nucleico al sujeto; y 3) lograr la expresión apropiada del gen transferido para duraciones satisfactorias. Los métodos para la transferencia de genes son conocidos en la técnica. Los métodos para la terapia génica como se describen en este documento son meramente con fines de ilustración y son típicos de aquellos que pueden usarse para poner en práctica la invención. Sin embargo, también se pueden emplear otros procedimientos, como se entiende en la técnica. La mayoría de las técnicas para construir vehículos de distribución tales como vectores y similares se practican ampliamente en la técnica, y la mayoría de los profesionales están familiarizados con los materiales de recursos estándar que describen condiciones específicas, reactivos y procedimientos que se describen en la literatura.

la presente invención se refiere a un método o un método de selección para la identificación de un agente para el tratamiento y/o profilaxis del dolor, en el que dicho método comprende la selección de agentes capaces de inhibir la función de TRPM3, como se definió en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones de esta invención, dicha inhibición de TRPM3 incluye inhibir o antagonizar la actividad de TRPM3 y en otras realizaciones particulares de esta invención, dicha inhibición de TRPM3 incluye inhibir la expresión del gen que codifica TRPM3.

Uno de los métodos descritos comprende las etapas de:

(a) Cargar células que expresan TRPM3 con un compuesto marcado, por ejemplo, un compuesto fluorescente, capaz de monitorizar la actividad de TRPM3, que incluye, pero no se limita a los colorantes sensibles al Ca^{2+} como Fura-2, Fluo-4 o compuestos relacionados;

(b) Incubar un primer grupo de dichas células cargadas que expresan TRPM3 de la etapa (a) con antagonistas de TRPM3 candidatos, e incubar un segundo grupo de dichas células cargadas que expresan TRPM3 de la etapa (a) con vehículo, que no contiene el antagonista candidato de TRPM3 (células no tratadas);

(c) Estimular la actividad de TRPM3 con un estímulo adecuado, como el sulfato de pregnenolona, la nifedipina o el calor; y

(d) Comparar la señal fluorescente entre células incubadas con antagonistas de TRPM3 candidatos y células no tratadas (es decir, el segundo grupo de células de la etapa, las células que no se tratan con un antagonista candidato). Dicha comparación puede realizarse utilizando equipos tales como microscopios fluorescentes, lectores de placas fluorescentes o microfluorímetros.

Una disminución de la señal fluorescente en el primer grupo de células (las células tratadas con antagonistas de TRPM3 candidatas) en comparación con el segundo grupo de células (las células no tratadas) indica que el agente es un antagonista de TRPM3. En ciertas realizaciones, dicha disminución debe ser al menos una disminución de dos veces.

En realizaciones particulares adicionales de esta divulgación, dicho método comprende las etapas de:

(a) cargar neuronas sensoriales aisladas de ratones o ratas con un compuesto marcado, por ejemplo, un compuesto fluorescente, capaz de monitorizar la actividad de TRPM3, que incluye, pero no se limita a los colorantes sensibles al Ca^{2+} como Fura-2, Fluo-4 o compuestos relacionados;

(b) Incubar un primer grupo de dichas neuronas sensoriales cargadas del paso (a) con antagonistas TRPM3 candidatos, e incubar un segundo grupo de dichas células cargadas que expresan TRPM3 del paso (a) con vehículo, que no contiene el antagonista TRPM3 candidato (células no tratadas);

(c) Estimular la actividad de TRPM3 con un estímulo adecuado, como el sulfato de pregnenolona, la nifedipina o el calor; y

(d) Comparar la señal fluorescente entre neuronas sensoriales incubadas con antagonistas de TRPM3 candidatos y células no tratadas (es decir, el segundo grupo de células de la etapa, las células que no se tratan con un antagonista candidato). Dicha comparación puede realizarse utilizando equipos tales como microscopios fluorescentes, lectores de placas fluorescentes o microfluorímetros.

Una disminución de la señal fluorescente en el primer grupo de células (las células tratadas con antagonistas de TRPM3 candidatas) en comparación con el segundo grupo de células (las células no tratadas) indica que el agente es un antagonista de TRPM3. En ciertas realizaciones, dicha disminución debe ser al menos una disminución de dos veces

En realizaciones particulares adicionales de la divulgación, dicho método comprende las etapas de:

(a) registros de pinzamiento de parche de células completas en células que expresan TRPM3, en donde las corrientes de células completas se miden (1) en condiciones basales, (2) después de la estimulación con un estímulo activador de TRPM3 como el sulfato de pregnenolona, nifedipina o calor, (3) y luego de la adición de antagonistas TRPM3 candidatos en un primer grupo, o vehículo en un segundo grupo, ambos grupos en la presencia continua de dicho estímulo activador; y

(b) Comparación de la corriente de células completas restante entre las células tratadas con el antagonista de TRPM3 candidato y las células tratadas con vehículo (células no tratadas).

Una disminución de la corriente de células completas en el primer grupo de células (las células tratadas con el antagonista de TRPM3 candidato) en comparación con el segundo grupo de células (las células no tratadas) indica el agente como un antagonista de TRPM3. En ciertas realizaciones, dicha disminución debe ser al menos una disminución de dos veces.

En realizaciones particulares de esta invención, dicho método comprende las etapas de:

(a) Aplicación de antagonistas de TRPM3 candidatos a un primer grupo de animales de laboratorio y un segundo grupo de animales de laboratorio tratados con vehículo (grupo no tratado). Dichos animales de laboratorio incluyen, pero no se limitan a ratones y ratas. Dicha aplicación incluye, pero no se limita a, aplicación oral, inyección intraperitoneal, inyección intravascular, inyección local o aplicaciones tópicas;

(b) Inyección local (en la piel intraplantar) de un agonista TRPM3 adecuado, como el sulfato de pregnenolona; y

(c) Comparación de la respuesta nociceptiva a la inyección de agonistas, mediante la monitorización de comportamientos nocifensivos como lamer, levantar, estremecer y morder, entre animales tratados con antagonistas de TRPM3 candidatos y animales tratados con vehículo (grupo sin tratar). Una disminución de la respuesta nociceptiva en el primer grupo, los animales de laboratorio tratados con antagonistas de TRPM3 candidatos en comparación con el segundo grupo de animales de laboratorio tratados con vehículo (el grupo no tratado) indica el agente como un antagonista de TRPM3.

En realizaciones particulares de esta invención, dicho método comprende las etapas de:

(a) Aplicación de antagonistas de TRPM3 candidatos a un primer grupo de animales de laboratorio y un segundo grupo de animales de laboratorio tratados con vehículo (aplicación de vehículo) (grupo sin tratar). Dichos animales de laboratorio incluyen, pero no se limitan a ratones y ratas. Dicha aplicación incluye, pero no se limita a, aplicación oral, inyección intraperitoneal, inyección intravascular, inyección local o aplicaciones tópicas; y

(b) Comparación de la respuesta nociceptiva a un estímulo de calor, por ejemplo, midiendo la latencia de extracción cuando se coloca en una placa caliente o cuando la cola se sumerge en líquido caliente entre animales tratados con antagonistas de TRPM3 candidatos y animales tratados con vehículo (grupo no tratado).

Una disminución de la respuesta nociceptiva en el primer grupo, los animales de laboratorio tratados con antagonistas de TRPM3 candidatos en comparación con el segundo grupo de animales de laboratorio tratados con vehículo (el grupo no tratado) indica el agente como un antagonista de TRPM3.

En realizaciones particulares adicionales de esta invención, dicho método comprende los pasos de:

- 5 (a) Medición de la respuesta nociceptiva en animales de laboratorio a un estímulo de calor, por ejemplo, midiendo la latencia de extracción cuando se coloca en una placa caliente o cuando se sumerge la cola en fluido caliente. Dichos animales de laboratorio incluyen, pero no se limitan a ratones y ratas;
- (b) Inducción de inflamación local en dichos animales de laboratorio mediante tratamiento con una preparación proinflamatoria, como la inyección de adyuvantes de Freund completos o la aplicación tópica de aceite de mostaza;
- 10 (c) Aplicación de antagonistas de TRPM3 candidatos a dichos animales de laboratorio de la etapa (b). Dicha aplicación incluye, pero no se limita a, aplicación oral, inyección intraperitoneal, inyección intravascular, inyección local o aplicaciones tópicas;
- (d) Medición de la respuesta nociceptiva de los animales de laboratorio tratados con antagonistas de TRPM-3 candidatos de la etapa (c) a un estímulo de calor, por ejemplo, midiendo la latencia de extracción cuando se coloca en una placa caliente o cuando la cola se sumerge en fluido caliente; y
- 15 (e) Comparación de la respuesta nociceptiva en los segundos animales tratados térmicamente de la etapa (d), con la respuesta nociceptiva a los primeros animales tratados térmicamente de la etapa (a).
- 20 Una disminución o statu quo de la respuesta nociceptiva en el segundo grupo tratado con calor de la etapa (d) en comparación con el primer grupo tratado con calor de la etapa (a), indica el agente como un antagonista de TRPM3. Dicho agente puede usarse como analgésicos en el tratamiento y/o la profilaxis del dolor y la hiperalgesia, incluida la hiperalgesia térmica y más en particular la hiperalgesia inflamatoria.
- 25 Cuando se usa en este documento, el término TRPM3 se relaciona con la Melastatina-3 potencial del receptor transitorio, que incluye todas las isoformas de TRPM3. Las isoformas existen debido al empalme alternativo y al uso de exones.
- 30 Ciertos antagonistas del receptor pueden existir en una de varias formas tautoméricas, todas las cuales están abarcadas por la presente invención como formas tautoméricas individuales o como mezclas de las mismas. Cuando un antagonista de TRPM3 contiene un carbono quiral y, por lo tanto, existe en una o más formas estereoisoméricas o cuando existen uno o más isómeros geométricos, se apreciará que el método de la presente invención abarca todas las formas mencionadas de los antagonistas de TRPM3 ya sea como Isómeros individuales o como mezclas de isómeros, incluidos los racematos. Cuando se usa aquí, el término "antagonista de TRPM3" se refiere a un antagonista,
- 35 tal como un antagonista de peso molecular pequeño, de la Melastatina-3 Potencial de Receptor Transitorio que incluye todas las isoformas de TRPM3. Se apreciará que el término también abarca sus derivados farmacéuticamente aceptables adecuados. Derivados farmacéuticamente aceptables adecuados de un antagonista de TRPM3 son, por ejemplo, sales y solvatos. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen sales derivadas de ácidos apropiados, tales como sales de adición de ácido, o bases.
- 40 Un "vector" es un replicón, como un plásmido, fago o cósmido, al que se puede unir otro segmento de ADN para lograr la replicación del segmento adjunto.
- 45 Un "replicón" es cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, cromosoma, virus) que funciona como una unidad autónoma de replicación de ADN in vivo; es decir, capaz de replicarse bajo su propio control.
- Una "molécula de ADN" se refiere a la forma polimérica de desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina o citosina) en su forma de cadena simple o en una hélice de doble cadena. Este término se refiere solo a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no se limita a ninguna forma terciaria particular. Por lo tanto, este término incluye el ADN de doble cadena encontrado, entre otros, en moléculas de ADN lineales (por ejemplo, fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. Al analizar la estructura de moléculas de ADN de doble cadena particulares, las secuencias pueden describirse aquí de acuerdo con la convención normal de dar solo la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena de ADN no transcrita (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga al ARNm).
- 50 El término "oligonucleótido", como se usa en el presente documento para referirse a la sonda de la presente invención, se define como una molécula que comprende dos o más (desoxi) ribonucleótidos, preferiblemente más de tres. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores que, a su vez, dependerán de la función y uso final del oligonucleótido.
- 55 El término "cebador", como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido, ya sea que ocurra naturalmente como en una digestión de restricción purificada o que se produzca sintéticamente, que sea capaz de actuar como un punto de inicio de síntesis cuando se coloque en condiciones en las que la síntesis de un producto de extensión de cebador, que es complementario a una cadena de ácido nucleico, se induce, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. El cebador puede ser de cadena sencilla o de cadena doble y debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluida la temperatura, la fuente del cebador y el uso del método. Por ejemplo, para aplicaciones de
- 60
- 65

diagnóstico, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador oligonucleótido contiene típicamente 15-25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos.

5 Los cebadores u oligonucleótidos en el presente documento se seleccionan para que sean “sustancialmente”
complementarios a diferentes cadenas de una secuencia de ADN diana particular. Esto significa que los cebadores
deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus respectivas cadenas. Por lo tanto, la secuencia del
cebador no necesita reflejar la secuencia exacta de la plantilla. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no
complementario se puede unir al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador complementaria
10 a la cadena. Alternativamente, se pueden intercalar bases no complementarias o secuencias más largas en el cebador,
siempre que la secuencia del cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia de la cadena para hibridar
con el mismo y formar así la plantilla para la síntesis del producto de extensión.

15 Una “línea celular” es un clon de una célula primaria que es capaz de un crecimiento estable in vitro durante muchas
generaciones.

Un “clon” es una población de células derivadas de una sola célula o ancestro común por mitosis.

20 Un “anticuerpo” es cualquier inmunoglobulina, incluidos los anticuerpos y sus fragmentos, que se une a un epítipo
específico. El término abarca anticuerpos policlonales, monoclonales y quiméricos, el último mencionado se describe
con más detalle en la patente de EE.UU. Números 4,816,397 y 4,816,567.

La frase “molécula de anticuerpo” en sus diversas formas gramaticales como se usa en este documento contempla
tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una parte inmunológicamente activa de una molécula de
inmunoglobulina.

25 Las moléculas de anticuerpo de ejemplo son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina
sustancialmente intactas y aquellas porciones de una molécula de inmunoglobulina que contiene el paratopo, incluidas
aquellas porciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab').sub.2 y F(v), cuyas porciones se prefieren para uso
en los métodos terapéuticos descritos en este documento.

30 Las porciones Fab y F(ab').sub.2 de las moléculas de anticuerpo se preparan mediante la reacción proteolítica de
papaína y pepsina, respectivamente, en moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas por métodos que son bien
conocidos. Véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. No. 4,342,566 de Theofilopolous et al. Las porciones de la molécula
de anticuerpo Fab' también son bien conocidas y se producen a partir de porciones F(ab') seguidas de la reducción
de los enlaces disulfuro que unen las dos porciones de cadena pesada como con mercaptoetanol, y seguidas de la
35 alquilación de la proteína resultante mercaptano con un reactivo tal como yodoacetamida. Un anticuerpo que contiene
moléculas de anticuerpo intacto se prefiere aquí.

40 La frase “anticuerpo monoclonal” en sus diversas formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que tiene solo una
especie de sitio de combinación de anticuerpos capaz de inmunorreaccionar con un antígeno particular. Por lo tanto,
un anticuerpo monoclonal típicamente muestra una afinidad de unión única para cualquier antígeno con el que
inmunoreacciona. Por lo tanto, un anticuerpo monoclonal puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una
pluralidad de sitios de combinación de anticuerpos, cada uno de ellos inmuno-específico para un antígeno diferente;
por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico (quimérico). Como se usa en el presente documento, el término
“farmacéuticamente aceptable” abarca compuestos, composiciones e ingredientes para uso humano y veterinario: por
45 ejemplo, el término “sal farmacéuticamente aceptable” abarca una sal veterinaria aceptable.

La composición puede, si se desea, tener la forma de un paquete acompañado de instrucciones escritas o impresas
para su uso.

50 Normalmente, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se adaptarán para administración oral,
aunque también se contemplan composiciones para administración por otras vías, tales como por inyección y
absorción percutánea, por ejemplo, una composición farmacéutica, que se puede aplicar tópicamente en la zona del
cuerpo donde se produce el dolor.

55 Las composiciones particularmente adecuadas para administración oral son formas de dosificación unitaria tales como
comprimidos y cápsulas. También se pueden usar otras formas de dosis unitarias fijas, como los polvos presentados
en bolsas.

60 De acuerdo con la práctica farmacéutica convencional, el vehículo puede comprender un diluyente, agente de relleno,
desintegrante, agente humectante, lubricante, colorante, saborizante u otro adyuvante convencional.

Los vehículos típicos incluyen, por ejemplo, celulosa microcristalina, almidón, glicolato sódico de almidón,
polivinilpirrolidona, polivinilpolipirrolidona, estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio o sacarosa.

65 Las preparaciones orales líquidas pueden estar en forma de, por ejemplo, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden
presentarse como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas

preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, jarabe, metilcelulosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio, grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitán o acacia; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos tales como ésteres de glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo metil o propil p-hidroxibenzoato o ácido sórbico; y si se desea agentes aromatizantes o colorantes convencionales.

Para la administración parenteral, las formas de dosificación unitaria fluidas se preparan utilizando el compuesto y un vehículo estéril y, dependiendo de la concentración utilizada, pueden suspenderse o disolverse en el vehículo. En la preparación de soluciones, el compuesto puede disolverse en agua para inyección y esterilizarse por filtración antes de rellenar un vial o ampolla adecuado y sellar. Ventajosamente, los adyuvantes tales como un anestésico local, un conservante y agentes de tamponamiento pueden disolverse en el vehículo. Para mejorar la estabilidad, la composición se puede congelar después de rellenar el vial y eliminar el agua al vacío. Las suspensiones parenterales se preparan sustancialmente de la misma manera, excepto que el compuesto se suspende en el vehículo en lugar de disolverse, y la esterilización no se puede lograr por filtración. El compuesto se puede esterilizar por exposición a óxido de etileno antes de suspenderlo en el vehículo estéril. Ventajosamente, se incluye un agente tensioactivo o humectante en la composición para facilitar la distribución uniforme del compuesto.

Las composiciones pueden contener de 0.1% a 99% en peso, preferiblemente de 10 a 60% en peso, del material activo, dependiendo del método de administración. Las composiciones pueden, si se desea, tener la forma de un paquete acompañado de instrucciones escritas o impresas para su uso

Las composiciones se formulan de acuerdo con métodos convencionales, como los divulgados en los textos de referencia estándar, por ejemplo, las Farmacopeas británicas y estadounidenses, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.), Martindale The Extra Pharmacopoeia (Londres, The Pharmaceutical Press) y Harry's Cosmeticology. (Leonard Hill Books).

La invención se ilustra adicionalmente por medio de las realizaciones ilustrativas descritas a continuación.

TRPM3 se expresa molecular y funcionalmente en neuronas somatosensoriales

Utilizando PCR cuantitativa en tiempo real en ratones DRG y TG recién aislados, detectamos el ARNm de TRPM3 a niveles comparables a los de los canales de TRP somatosensoriales conocidos TRPA1, TRPM8, TRPV1 y TRPV2, y más altos que los de TRPV3 y TRPV4 activados por calor (Figura 1A). Estos resultados están en línea con estudios anteriores que muestran niveles significativos de ARNm de TRPM3 en neuronas sensoriales (Lechner et al., 2009; Nealen et al., 2003; Staaf et al., 2010). La hibridación in situ utilizando una sonda de ARN antisentido específica de TRPM3 produjo una fuerte señal en los cuerpos celulares de una gran fracción de las neuronas DRG y TG, comparable a las señales obtenidas con una sonda de ARN antisentido específica de TRPV1 (Figura 1B y Figura 9). La inspección visual de diferentes secciones reveló una señal de hibridación TRPM3 positiva en $78 \pm 6\%$ de las neuronas DRG y $82 \pm 5\%$ de neuronas TG. En conjunto, estos datos indican la presencia abundante de ARNm de TRPM3 en las neuronas sensoriales.

Para examinar la expresión funcional y la función in vivo de TRPM3 en el sistema somatosensorial, utilizamos una cepa de ratón deficiente en TRPM3 funcionalmente no caracterizada (Figura 10). El análisis de transferencia Western demostró la expresión de la proteína TRPM3 en tejido DRG y TG de ratones *Trpm3^{+/+}* pero no de ratones *Trpm3^{-/-}* (Figura 1C). Los ratones *Trpm3^{-/-}* fueron viables, fértiles y no mostraron diferencias obvias con respecto a los controles *Trpm3^{+/+}* en términos de apariencia general, anatomía general, peso corporal (a las 10 semanas: $24.9 \text{ g} \pm 0.9$ en *Trpm3^{+/+}* y $27.0 \text{ g} \pm 0.9$ en ratones *Trpm3^{-/-}* (n=15 para cada grupo; P=0.29), temperatura corporal central ($37.89 \pm 0.1^\circ\text{C}$ en -ratones *Trpm3^{+/+}* y $38.06 \pm 0.2^\circ\text{C}$ en ratones *Trpm3^{-/-}* (n = 6 para cada grupo; P=0.45)), frecuencia cardíaca (629 ± 25 bpm en ratones *Trpm3^{+/+}* y 585 ± 29 bpm en ratones *Trpm3^{-/-}* (n=6; P=0.28) y niveles basales de glucosa en sangre (135 ± 4 mg/dl en *Trpm3^{+/+}* y 135 ± 4 mg/dl en ratones *Trpm3^{-/-}* (n=7; P=0.96)).

Trabajos previos revelaron que la isoforma TRPM3a2 de ratón se activa rápida y reversiblemente por bajas concentraciones micromolares del neuroesteroide PS, y que PS no actúa sobre varios otros canales de TRP expresados en las neuronas DRG o TG, incluyendo TRPV1, TRPV2, TRPA1 o TRPM8 (FIG. 4A y los datos no mostrados) (véase también Chen y Wu, 2004; Wagner et al., 2008). Por lo tanto, usamos PS para probar la expresión funcional de TRPM3 en neuronas DRG y TG recién aisladas. PS evocó señales de calcio robustas y reversibles en el 58% de DRG (n=303) (Figura 2A) y el 57% de las neuronas TG (n=273) aisladas de ratones *Trpm3^{+/+}* (Figura 2A, 2C-2D y la figura 11). Las respuestas de PS, como las respuestas de capsaicina (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000), se restringieron a células de diámetro pequeño (diámetro <25 μm ; figura 3), conocidas por incluir neuronas nociceptoras no mielinizadas. Es importante destacar que la fracción de neuronas sensibles a PS disminuyó drásticamente en las preparaciones de DRG y TG de ratones *Trpm3^{-/-}* (Figura 2B-2D y Figura 11), mientras que las fracciones que respondieron al agonista de TRPA1 MO o La capsaicina agonista TRPV1 no se modificó (Figuras 2C y 2D). Por el contrario, las respuestas a PS se conservaron en las neuronas DRG y TG obtenidas de *Trpv1^{-/-}*, *Trpa1^{-/-}* y ratones *Trpv1^{-/-}/Trpa1^{-/-}* combinados (FIG. 12A-12E). En algunos experimentos, también estimulamos neuronas sensoriales con nifedipina (10 μM), un fármaco que se ha descrito como un agonista de TRPA1 (EC₅₀ = 0.4 μM

Fajardo et al., 2008) y TRPM3 (EC50 = 30 μ M Wagner et al., 2008). Encontramos que la fracción de neuronas sensibles a la nifedipina no se alteró significativamente en las preparaciones de DRG y TG de ratones *Trpm3*^{-/-}, en línea con el trabajo previo que sugiere que TRPA1 es el principal determinante de las respuestas de Ca²⁺ inducidas por nifedipina en neuronas sensoriales (Fajardo et al., 2008).

En experimentos de pinzamiento de parche de células enteras en neuronas TG, PS también produjo corrientes internas de más de 10 pA en 65% de neuronas TG (15 de 23) de ratones *Trpm3*^{+/+} y en 53% de neuronas TG (9 de 17) de ratones *Trpv1*^{-/-}/*Trpa1*^{-/-}, que nunca se observaron en neuronas de ratones *Trpm3*^{-/-} (0 de 21; P <0.001) (Figura 2E-2G). Las neuronas deficientes en TRPM3 mostraron respuestas inalteradas a la capsaicina (inserto de la Figura 2F): el 57% de *Trpm3*^{+/+} las neuronas TG respondieron a la capsaicina (13 de 23) en comparación con el 53% de los respondedores en *Trpm3*^{-/-} neuronas TG (11 de 21). Las corrientes inducidas por PS registradas en las neuronas DRG *Trpm3*^{+/+} en ausencia de cationes monovalentes extracelulares exhibieron una relación corriente-voltaje rectificadora hacia el exterior con un potencial de inversión cercano a 0 mV (Fig. 2H-2J), de acuerdo con las características de los canales TRPM3 α 2 expresados de forma heteróloga (Oberwinkler et al., 2005; Wagner et al., 2008). En conjunto, estos datos demuestran que TRPM3 se expresa funcionalmente en una gran fracción de las neuronas DRG y TG, y es el principal receptor de PS en estas células.

Activación de TRPM3 inducida por PS evoca dolor

Para investigar directamente si la activación de TRPM3 puede provocar dolor, probamos el comportamiento nocifensivo en ratones *Trpm3*^{+/+} y *Trpm3*^{-/-} después de la inyección de PS en la piel plantar de la pata trasera. La inyección de vehículo o progesterona (25 nmol/pata), un neuroesteroide estrechamente relacionado sin actividad agonista de TRPM3 (Wagner et al., 2008), no provocó respuestas nociceptivas medibles en ratones *Trpm3*^{+/+} o *Trpm3*^{-/-} (figuras 4A y 4B). Por el contrario, la inyección de PS (2.5 y 5 nmol/pata) provocó un fuerte comportamiento nocivo (lamer la pata y levantarla) en ratones *Trpm3*^{+/+} (Figura 4A, 4B). Es importante destacar que los ratones *Trpm3*^{-/-} carecían completamente de esta respuesta nocifensiva a PS, mientras que la inyección de la capsaicina agonista TRPV1 evocaba el comportamiento nocifensivo normal (Caterina et al., 2000) (Figuras 4A y 4B). Como los compañeros de camada *Trpm3*^{+/+} y *Trpm3*^{-/-} se encuentran en un antecedente genético heterogéneamente mixto de cepas de ratones 129SvEvBrd y C57BL/6J, previmos la posibilidad de que los déficits en las respuestas de la PS del comportamiento puedan atribuirse a la vinculación de otros determinantes derivados de 129SvEvBrd al locus TRPM3 interrumpido. Por lo tanto, probamos la sensibilidad a la PS de los ratones 129SvEvBrd y C57BL/6J pareados por edad, y encontramos respuestas de comportamiento similares a las de los ratones *Trpm3*^{+/+} (Figura 13A, B). Además, la inyección de PS en ratones knockout *Trpv1*^{-/-}/*Trpa1*^{-/-} provocó una respuesta nocifensiva que fue similar a la observada en ratones *Trpm3*^{+/+} (Figura 13A, B).

Para evaluar la contribución de TRPM3 a la nocicepción del trigémino, utilizamos una prueba de bebida aversiva (Caterina et al., 2000). Durante un período de 3 días, a los ratones se les permitió beber de una botella de agua durante solo 1 hora/día. En el cuarto día, esta solución se complementó con PS (750 μ M). En ratones *Trpm3*^{+/+} esto provocó una aversión modesta pero significativa, como lo demuestra una reducción del 30% en el volumen de agua consumida (Figura 4C). En contraste, los ratones *Trpm3*^{-/-} no mostraron respuesta aversiva y bebieron a la velocidad del día anterior (Figura 4C). Tomados en conjunto, nuestros resultados muestran que TRPM3 se expresa funcionalmente en el sistema somatosensorial y media el efecto nociceptivo de la PS.

TRPM3 es Activado por Calor

Si bien estos datos demuestran claramente que la activación de TRPM3 por PS exógena puede evocar dolor, no está claro si las concentraciones de PS endógenas en el sistema sensorial pueden alcanzar niveles suficientes para activar TRPM3 in vivo (Nilius y Voets, 2008; Wagner et al., 2008). Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que otros estímulos fisiológicamente relevantes pueden causar dolor a través de la activación de TRPM3. Dado que varios canales de TRPM estrechamente relacionados (TRPM8, TRPM4, TRPM5 y TRPM2) son termosensibles (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a; Talavera et al., 2005; Togashi et al., 2006), probamos para efectos de temperatura en TRPM3.

Para probar esta posibilidad, primero comparamos las respuestas de Ca²⁺ intracelular al agonista y al calor en células HEK293T que expresan transitoriamente TRPM3 o TRPV1. Las células que expresan TRPM3 mostraron respuestas robustas a PS y calor (40°C), pero eran insensibles a la capsaicina (Figuras 5A y 5B). La magnitud de la respuesta al calor fue similar a la de las células que expresan TRPV1, que también respondieron a la capsaicina, pero no a la PS (Figura 5B). Las aplicaciones repetitivas de un estímulo de calor idéntico dieron como resultado respuestas parcialmente desensibilizadoras, similares a lo que observamos con los estímulos de PS repetitivos (Figura 14). La sensibilidad térmica se confirmó en las grabaciones de pinzamiento de parche de células enteras de células HEK que expresan TRPM3, mostrando una activación marcada y reversible de una corriente de rectificación muy fuerte hacia el exterior (Figura 5C-5F). A partir del aumento inducido por la temperatura promedio en la corriente de entrada a -80 mV (figura 5F, recuadro), calculamos un valor de coeficiente de temperatura de 10 grados (Q₁₀) de 7.2.

Anteriormente, hemos demostrado que la activación térmica de otros canales TRP, incluidos TRPM8 y TRPA1 activados en frío y TRPV1, TRPM4 y TRPM5 activados por calor, implica un cambio en la dependencia de voltaje de la activación del canal y se puede aproximar mediante un modelo de dos estados (Karashima et al., 2009; Talavera et

al., 2005; Voets et al., 2004). El análisis detallado de las corrientes de células completas a diferentes voltajes y temperaturas reveló que la activación térmica de TRPM3 también se puede describir utilizando este formalismo de dos estados (FIG. 15A-C). Los valores derivados de la entalpía y la entropía asociados con la apertura de TRPM3 fueron un 30% más bajos que los determinados para TRPV1 (FIG. 15C). Tras este análisis, la relación temperatura-corriente de la corriente de TRPM3 hacia el interior a -80 mV se desplaza hacia temperaturas más altas en comparación con TRPV1 (FIG. 15D), y presenta una inclinación más baja, como se refleja en los valores máximos de Q_{10} entre 20 y 30°C. de 7.5 para TRPM3 contra 16.8 para TRPV1.

El trabajo previo en otros canales termosensibles de TRP ha demostrado efectos sinérgicos entre los agonistas químicos y los estímulos térmicos. Por ejemplo, las respuestas de mentol del TRPM8 activado en frío se potencian a bajas temperaturas, y las concentraciones de protones no activantes sensibilizan al TRPV1 para la activación por calor (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a; Tominaga et al., 1998). Observamos una sinergia similar de calor y PS en TRPM3. Usando un ensayo basado en placa de 96 pozos para determinar las respuestas de Ca^{2+} dependientes de la temperatura (Reubish et al., 2009), encontramos que el PS a 10 μ M cambió el perfil de respuesta térmica de las células que expresaban TRPM3 a temperaturas más bajas en 6.1 ± 0.4 grados (figura 6a). A la inversa, encontramos que el aumento de la temperatura de la temperatura ambiente a 37°C potenció las respuestas de PS (Fig. 6B, C). Curiosamente, las concentraciones de PS tan bajas como 100 nM, que están por debajo del umbral a temperatura ambiente, evocaron respuestas robustas a 37°C (Fig. 6B, C). El sinergismo entre calor y PS se confirmó aún más en las mediciones de corriente de células enteras, donde la respuesta actual a una dosis baja de PS (5 μ M) se potenció fuertemente a temperaturas más altas (FIG. 6D-6F). En conjunto, estos datos demuestran que la TRPM3 expresada de manera heteróloga funciona como un canal activado por calor, capaz de integrar estímulos químicos y térmicos.

TRPM3 contribuye a la sensibilidad al calor en las neuronas DRG y TG.

Para analizar la posible contribución de TRPM3 a la sensibilidad al calor en las neuronas DRG y TG, usamos imágenes de Ca^{2+} para sondear las respuestas al calor en las neuronas sensoriales de ratones *Trpm3^{+/+}* *Trpm3^{-/-}* y para correlacionar respuesta al calor con sensibilidad a PS y capsaicina (FIG. 7A). En línea con el trabajo anterior (Fischbach et al., 2007; Woodbury et al., 2004), encontramos que la gran mayoría de las neuronas sensoriales de ratones *Trpm3^{+/+}* mostraron sensibilidad al calor, con el 82% de las neuronas DRG (111/135) y el 79% de las neuronas TG (126/159) que responden a un estímulo térmico de 43°C. La población sensible al calor podría clasificarse además en cuatro grupos basados en la sensibilidad al PS y la capsaicina. La fracción más grande de neuronas DRG *Trpm3^{+/+}* positivas al calor (59/135; 43%) respondió tanto a la PS como a la capsaicina. Además, el 33% de las neuronas sensibles al calor respondieron a la PS, pero no a la capsaicina (45/135), y el 3% respondió a la capsaicina, pero no a la PS (4/135). Finalmente, 3 de 135 (2%) fueron insensibles tanto a la capsaicina como a la PS (Figura 7C). La capacidad de respuesta al calor no fue diferente cuando se aplicó el estímulo térmico antes de los agonistas químicos (datos no mostrados). Se obtuvo un perfil de respuesta similar en las neuronas TG *Trpm3^{+/+}* y en las neuronas DRG y TG de *TRPV1^{+/+}* (FIG. 7D). Las neuronas sensoriales de ratones *Trpm3^{-/-}* mostraron una reducción moderada pero significativa en la sensibilidad al calor, con un 59% de neuronas DRG (129/217; $P < 0.001$) y un 63% de neuronas TG (150/236; $P < 0.001$) respondiendo a un estímulo térmico a 43°C (FIG. 7B-7D). En particular, el subgrupo de neuronas sensibles al calor que responden a la PS, pero no a la capsaicina se redujo fuertemente en los ratones *Trpm3^{-/-}* (Figura 7B-7D). Para comparación, también analizamos la sensibilidad al calor, PS y capsaicina en neuronas aisladas de ratones *Trpv1^{-/-}*. Aquí, encontramos que el 60% de las neuronas DRG y el 62% de las neuronas TG respondieron al calor (Figuras 7C y 7D). La gran mayoría de las neuronas *Trpv1^{-/-}* sensibles al calor también respondieron a la aplicación PS (10 μ M) (Figuras 7C y 7D). Para analizar adicionalmente la contribución relativa de TRPM3 y TRPV1 a la sensibilidad al calor de las neuronas sensoriales, investigamos el efecto del antagonista selectivo de TRPV1 AMG 9810; (Figura 16A, B Gavva et al., 2005) sobre las respuestas al calor en las neuronas DRG *Trpm3^{+/+}* y *Trpm3^{-/-}*. A una concentración de 5 μ M, AMG 9810 eliminó completamente las respuestas de capsaicina y redujo significativamente el porcentaje de respondedores de calor (FIG. 16C). Sin embargo, aún observamos una fracción sustancial de células que responden al calor después del tratamiento de las neuronas *Trpm3^{-/-}* con AMG 9810 (Figura 16C). En conjunto, estos experimentos demuestran que tanto TRPV1 como TRPM3 contribuyen a las respuestas al calor en las neuronas DRG y TG, pero también indican la existencia de mecanismos de detección de calor independientes de TRPV1 y TRPM3 en las neuronas sensoriales.

Los ratones *Trpm3^{-/-}* exhiben sensibilidad reducida al calor nocivo

Para investigar si TRPM3 está involucrado en la sensación de calor in vivo, comparamos el comportamiento de los ratones *Trpm3^{+/+}* y *Trpm3^{-/-}* en diferentes ensayos nociceptivos y termosensoriales. En la prueba de inmersión de la cola, los ratones *Trpm3^{-/-}* exhibieron latencias de movimiento de la cola muy aumentadas en comparación con los compañeros de camada de *Trpm3^{+/+}* para temperaturas de baño entre 45 y 57°C, (Figura 8A). La respuesta retardada no fue consecuencia de una reactividad global más lenta de la cola del ratón, ya que los ratones *Trpm3^{-/-}* mostraron un retardo de respuesta normal a los estímulos mecánicos (ensayo de gancho de la cola; figura 8C). Los ratones *Trpm3^{-/-}* y *Trpm3^{+/+}* también fueron indistinguibles en su respuesta al pellizco intenso de la cola, con retrasos en la respuesta < 1 s para ambos genotipos ($n=9$). En el ensayo de placa caliente, los ratones *Trpm3^{-/-}* mostraron latencias normales a una temperatura de la placa de 50°C, pero respondieron con un retraso significativamente mayor a temperaturas entre 52 y 58°C (Figura 8B). Para excluir una posible interferencia de los antecedentes genéticos heterogéneos de las camadas de *Trpm3^{+/+}* y *Trpm3^{-/-}* en la respuesta conductual a los estímulos térmicos (Mogil et al.,

1999), repetimos el ensayo de inmersión de la cola usando los ratones con edad coincidente 129SvEvBrd y C57BL/6J. Las latencias de respuesta de los ratones de ambas cepas fueron comparables a las de los ratones *Trpm3^{+/+}*, y significativamente más rápidas que las de los ratones *Trpm3^{-/-}* (Figura 13C).

5 También comparamos la preferencia térmica de los ratones *Trpm3^{+/+}* y *Trpm3^{-/-}* cuando se les permitió moverse libremente durante 2 horas en una plataforma rectangular plana con un gradiente de temperatura de la superficie de 5 a 60°C a lo largo de la longitud (Lee et al., 2005; Moqrich et al., 2005). Observamos que, durante toda la duración del ensayo, los ratones *Trpm3^{+/+}* y *Trpm3^{-/-}* mostraron un comportamiento muy similar, y pasaron la mayor parte del tiempo en la zona de temperatura entre 27 y 31°C (FIG. 8D y la figura 14). Sin embargo, al analizar los primeros 30 minutos, que corresponden principalmente al período de exploración (Moqrich et al., 2005), los ratones *Trpm3^{-/-}* pasaron significativamente más tiempo a temperaturas entre 31 y 45°C que los animales de control (Figura 8E). Ambos genotipos cubrieron una distancia similar en la plataforma y tuvieron un tiempo de inactividad comparable, lo que sugiere que la deficiencia de TRPM3 no influye en el comportamiento exploratorio. Estos resultados indican que los ratones *Trpm3^{-/-}* tienen la misma preferencia térmica que los animales *Trpm3^{+/+}* pero muestran una evitación reducida a temperaturas más altas. Esto se confirmó en las pruebas de preferencia de dos placas (Figura 8F), donde los ratones *Trpm3^{-/-}* mostraron una preferencia reducida por la placa de 30°C sobre las placas más calientes (38 y 45°C), pero la evitación sin alteraciones de la temperatura fría (15°C). En conjunto, nuestros datos indican que TRPM3 se requiere específicamente para la sensación de calor.

20 Para investigar un posible papel de TRPM3 en la homeostasis de la temperatura, comparamos el efecto de las inyecciones subcutáneas de PS y capsaicina en ratones *Trpm3^{+/+}* y *Trpm3^{-/-}* (Figura 18). La capsaicina evocó una clara hipotermia en ambos genotipos, en línea con el trabajo anterior (Caterina et al., 2000). En contraste, la PS no tuvo efecto sobre la temperatura corporal central, a pesar de un claro comportamiento nociceptivo en los ratones *Trpm3^{+/+}*.

25 Finalmente, investigamos si TRPM3 puede estar involucrado en la participación de la hiperalgesia térmica durante la inflamación. En línea con el trabajo anterior, encontramos que la inyección de adyuvante completo de Freund (CFA) en la pata trasera de los ratones *Trpm3^{+/+}* produce una fuerte sensibilización a los estímulos de calor y frío, como lo demuestra la reducción de la latencia de extracción en el calor Ensayo de placa y comportamiento nocifensivo más fuerte en la placa fría (FIG. 8G, H). Sorprendentemente, mientras que los ratones *Trpm3^{-/-}* desarrollaron signos similares de hiperalgesia por frío, la inyección de CFA no alteró su latencia de extracción de la placa caliente (Fig. 8G, H). Estos datos indican que los ratones *Trpm3^{-/-}* tienen un fuerte déficit en el desarrollo de hiperalgesia por calor, similar a lo que se ha informado para ratones deficientes en TRPV1 (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000).

35 La primera caracterización de los ratones *Trpv1^{-/-}*, hace aproximadamente una década, no solo proporcionó pruebas concluyentes del papel crucial de TRPV1 en la detección de calor nocivo, hiperalgesia térmica y dolor, sino que también indicó la existencia de sensores de calor nocivos adicionales en las neuronas sensoriales (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). Desde entonces, el papel de los diferentes canales de TRP termosensibles en la detección de temperaturas frías y cálidas ha sido bien establecido. Sin embargo, la base molecular de la detección de calor nocivo independiente de TRPV1 sigue siendo totalmente esquiva. En el pasado, varios otros canales TRP activados por calor habían sido identificados, pero ninguno de ellos demostró funcionar como un sensor de calor en las neuronas sensoriales. Aquí, identificamos TRPM3 como un nuevo sensor de calor nocivo expresado en un gran subconjunto de neuronas sensoriales de pequeño diámetro, y demostramos que desempeña un papel imprevisto en la detección de calor nocivo. Mientras que TRPM3 y TRPV1 comparten solo una homología de secuencia limitada, nuestros resultados actuales revelan una sorprendente similitud funcional: ambos forman canales de cationes permeables al calcio activados por calor; ambas se expresan funcionalmente en una gran proporción de neuronas sensoriales de pequeño diámetro, ambas están involucradas en las respuestas de comportamiento nociceptivo a los ligandos químicos y al calor nocivo, y ambas se requieren para el desarrollo de la hiperalgesia por calor después de un ataque inflamatorio.

50 El trabajo anterior indicó la expresión de TRPM3, a nivel de ARNm y/o proteína, en varios tejidos, incluyendo cerebro, riñón, páncreas endocrino, músculo liso vascular y neuronas sensoriales (Grimm et al., 2003; Lechner et al., 2009; Lee et al., 2003; Naylor et al., 2010; Nealen et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005; Oberwinkler and Philipp, 2007; Staaf et al., 2010; Wagner et al., 2008). Los estímulos activadores de TRPM3 *in vitro* informados incluyeron hinchamiento de células hipotónicas, agotamiento interno de almacenamiento de Ca^{2+} , D-eritro-esfingosina y PS (Grimm et al., 2003; Grimm et al., 2005; Lee et al., 2003; Wagner et al., 2008). Con el uso de PS, que actualmente es la herramienta farmacológica disponible más potente y selectiva para investigar los roles biológicos de TRPM3 (Wagner et al., 2008), se ha proporcionado evidencia que sugiere que la expresión funcional del canal en las células beta pancreáticas y el músculo liso vascular (Naylor et al., 2010; Wagner et al., 2008). Sin embargo, los estímulos reales que regulan la actividad de TRPM3 *in vivo* y los roles fisiológicos de TRPM3 permanecieron en gran parte desconocidos. Aquí, proporcionamos la primera descripción de los ratones *Trpm3^{-/-}*, que formarán una base firme para una investigación más profunda de las funciones biológicas de TRPM3. Los ratones *Trpm3^{+/+}* no mostraron deficiencias evidentes en la fertilidad, anatomía general, peso corporal, temperatura corporal central, locomoción o comportamiento exploratorio. Con respecto al papel propuesto de TRPM3 en la liberación de insulina, tampoco encontramos diferencias en la glucemia en reposo, lo que sugiere que la homeostasis de la glucosa basal no se ve afectada de manera crítica. Por lo tanto, los ratones *Trpm3^{-/-}* parecen generalmente sanos, sin indicaciones de deficiencias metabólicas o de desarrollo importantes.

Además, varios aspectos del comportamiento relacionados con la somatosensación y la nocicepción no se alteraron en los ratones *Trpm3^{-/-}*, incluida la evitación de las temperaturas frías y la respuesta nocifensiva a los estímulos mecánicos o las inyecciones de capsaicina. Sin embargo, encontramos déficits significativos y específicos en las respuestas nocifensivas a los estímulos activadores de TRPM3. Primero, confirmamos y respaldamos un estudio anterior que muestra que la inyección de PS provoca dolor en ratones (Ueda et al., 2001). La inyección intraplantar de PS en ratones *Trpm3^{+/+}* indujo una fuerte respuesta nocifensiva, consistente en un vigoroso lamido y levantamiento de la pata trasera, que fue comparable a lo que observamos tras la inyección de la capsaicina agonista TRPV1. Esta respuesta al dolor se conservó en ratones knockout doble *Trpv1^{-/-}/Trpa1^{-/-}* pero se eliminó completamente en ratones *Trpm3^{-/-}*, lo que indica que TRPM3 es el principal sensor de PS en los nociceptores. De manera similar, encontramos que la adición de PS al agua potable llevó a una reducción moderada del consumo de agua en *Trpm3^{+/+}* pero no en ratones *Trpm3^{-/-}*, indicativo de aversión a PS dependiente de TRPM3. En segundo lugar, encontramos que los ratones *Trpm3^{-/-}* exhiben un fuerte déficit en la detección de estímulos de calor nocivos, como lo demuestran las latencias de reacción prolongadas en la inmersión de la cola y los ensayos de placa caliente, y una reducción de la evitación de las zonas de temperatura caliente en las pruebas de gradiente térmico y de preferencia térmica. La diferencia en la respuesta al calor entre los ratones *Trpm3^{+/+}* y *Trpm3^{-/-}* fue aún más pronunciada después de la inyección de CFA. Este desafío inflamatorio provocó una reducción significativa en las latencias de respuesta de los ratones *Trpm3^{+/+}*, indicativo de hiperalgesia por calor, pero no cambió las latencias de respuesta al calor en los ratones *Trpm3^{-/-}*. Tomados en conjunto, estos resultados establecen TRPM3 como un quimio y termosensor en el sistema somatosensorial, involucrados en la detección de estímulos nocivos en tejidos sanos e inflamados.

Nuestro análisis del calor, la capsaicina y la sensibilidad a PS de las neuronas DRG y TG de ratones *Trpm3^{+/+}*, *Trpm3^{-/-}*, *Trpv1^{+/+}* y *Trpv1^{-/-}* indica la existencia de al menos cuatro subconjuntos distintos de neuronas sensibles al calor. El subconjunto más grande abarca neuronas sensibles al calor que respondieron tanto a PS como a capsaicina, lo que sugiere la coexpresión de TRPV1 y TRPM3. Además, identificamos neuronas sensibles al calor que respondían a la capsaicina, pero no a la PS (expresión de TRPV1), o a la PS, pero no a la capsaicina (expresión de TRPM3). Finalmente, una fracción de las neuronas activadas por el calor no respondía tanto a la PS como a la capsaicina, lo que indica la existencia de un mecanismo de detección de calor independiente de TRPM3 y TRPV1. En línea con esto, observamos una fracción sustancial de células sensibles al calor después de la inhibición farmacológica de TRPV1 en preparaciones de DRG y TG de ratones *Trpm3^{-/-}*. Además, los ratones *Trpm3^{-/-}* tratados con un antagonista selectivo de TRPV1 todavía respondieron al calor nocivo, aunque con un aumento de la latencia. Los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a esta termosensibilidad residual son actualmente desconocidos.

¿Cómo se compara la sensibilidad al calor de TRPM3 con la de TRPV1 y otros canales termosensibles de TRP? A partir del cambio inducido por la temperatura en la corriente de TRPM3, determinamos un valor máximo de Q_{10} de ~7, que es comparable a los valores de Q_{10} entre 6 y 25 que se han informado para otros canales de TRP activados por calor, incluido TRPV1-TRPV4, TRPM2 y TRPM5 (Caterina et al., 1999; Caterina et al., 1997; Guler et al., 2002; Peier et al., 2002b; Smith et al., 2002; Talavera et al., 2005; Togashi et al., 2006; Watanabe et al., 2002). Nuestro análisis de los parámetros termodinámicos asociados con la activación de canales indicó que la dependencia de la activación de TRPM3 con la temperatura cambia a una temperatura más alta en comparación con TRPV1. Sin embargo, debe observarse que el umbral térmico para el inicio del potencial de acción inducido por el calor o el frío en un nervio sensorial no solo dependerá de la sensibilidad térmica de los canales termosensibles de despolarización (TRP), sino también de sus niveles de expresión a nivel terminaciones nerviosas sensoriales y en la amplitud relativa de otras conductancias, en particular canales de Na^+ regulados por voltaje y diversas conductancias de K^+ (Basbaum et al., 2009; Madrid et al., 2009; Noel et al., 2009; Viana et al., 2002). Además, se sabe que las sensibilidades térmicas de los canales de TRP están moduladas por diversos factores intra y extracelulares (Basbaum et al., 2009; Damann et al., 2008). En este sentido, encontramos una mejora prominente de la sensibilidad al calor de TRPM3 por parte del neuroesteroide PS. En particular, nuestros datos indican una fuerte sinergia entre el calor y la PS en concentraciones entre 100 y 1000 nM, lo que está dentro del rango de los niveles plasmáticos de PS medidos en humanos adultos (0.1-0.8 μM Havlikova et al., 2002). Los niveles plasmáticos de PS pueden elevarse a concentraciones supramicromolares durante el parto y en diversas condiciones patológicas, pero también disminuyen con el envejecimiento (Havlikova et al., 2002; Hill et al., 2001; Schumacher et al., 2008), lo que puede influir aún más en la sensibilidad al calor y dolor a través de TRPM3.

En conclusión, hemos identificado TRPM3 como un canal nociceptor involucrado en la detección de calor agudo y la hiperalgesia inflamatoria por calor, y por lo tanto como un objetivo potencial para los nuevos tratamientos analgésicos.

Materiales y métodos

Células

Se cultivaron células de riñón embrionario humano, HEK293T, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero humano al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, 2 unidades/ml de penicilina y 2 mg/ml de estreptomina a 37°C en una incubadora de humedad controlada con 10% de CO_2 . Las células HEK293T se transfectoron de forma transitoria con TRPM3a2 murino (número de acceso AJ 544535) en el vector bicistrónico pCAGGS/ires-GFP, usando Mirus TransIT-293 (Mirus corporation; Madison, EE. UU.). Las células transfectadas se visualizaron mediante la

expresión de la proteína de fluorescencia verde (GFP), mientras que las células GFP negativas del mismo lote se utilizaron como controles. Las neuronas TG y DRG de ratones adultos (semanas postnatales 8-12) se aislaron como se describió anteriormente (Karashima et al., 2007). Se desarrollaron células HEK293T transfectadas de manera estable con TRPM3 α 2 utilizando el sistema Flp-In (Invitrogen).

5

Animales

Ratones Trpm3 $^{-/-}$ (Figura 10), obtenidos de Lexicon Genetics se generaron utilizando recombinación homóloga en células 129SvEvBrd ES. Se inyectaron células ES en blastocistos de ratones donantes C57BL/6J para generar animales quiméricos, que se aparearon con ratones C57BL/6J y se genotiparon para el alelo mutado. Los heterocigotos se aparearon, lo que dio como resultado ratones Trpm3 $^{+/+}$, Trpm3 $^{+/-}$ y Trpm3 $^{-/-}$ con la distribución Mendeliana esperada. A menos que se mencione lo contrario, los compañeros de camada Trpm3 $^{+/+}$ y Trpm3 $^{-/-}$ se usaron en experimentos de comportamiento. Para comparación, también utilizamos ratones puros de 129SvEvBrd (amablemente proporcionados por The Sanger Institute, Cambridge, Reino Unido) y C57BL/6J (Charles River) en experimentos de comportamiento, como se indica en el texto.

15

Los ratones Trpv1 $^{-/-}$ en un fondo C57BL/6J puro se obtuvieron del Laboratorio Jackson (<http://jaxmice.jax.org/strain/003770.html>), y se utilizaron ratones C57BL/6J de edad y peso coincidente como controles coincidentes (Trpv1 $^{+/+}$). Los ratones Trpv1 $^{-/-}$ se aparearon con ratones Trpa1 $^{-/-}$ (Kwan et al., 2006) para obtener ratones knockout doble Trpv1 $^{-/-}$ /Trpa1 $^{-/-}$. Los ratones de todos los genotipos se alojaron en condiciones idénticas, con un máximo de 4 animales por jaula en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y con comida y agua ad libitum. Solo se utilizaron ratones machos de 10-12 semanas de edad en todos los experimentos.

20

PCR cuantitativa

25

El ARN total de los tejidos DRG y TG recién aislados se extrajo con el mini kit RNeasy (Qiagen) y posteriormente se utilizó para la síntesis de ADNc utilizando perlas de primera cadena Ready-To-Go You-Prime (GE Healthcare). Se analizaron muestras de ADNc por triplicado de cada preparación independiente (n=3) mediante reacciones cuantitativas en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) en el sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems) utilizando ensayos específicos de expresión del gen TaqMan para Trpa1, Trpm3, Trpm8, Trpv1, Trpv2, Trpv3 y Trpv4 (Applied Biosystems). Se utilizaron gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y β -actina como controles endógenos (Applied Biosystems). Se utilizó ARNm de Trpv1 como calibrador para cuantificaciones relativas de señales de ARNm detectadas.

30

Extracción de Proteínas e Inmunodetección

35

Se lisaron proteínas de cerebro recién aislado, tejidos DRG y TG de ratones de tipo silvestre y Trpm3 $^{-/-}$ en 3 ml de tampón de lisis enfriado con hielo (Tris 50 mM, pH 7.5, KCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 1 mM, Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y un cóctel de inhibidores de proteasa (10 μ g/ml de leupeptina y antipaina, 2 μ g/ml de quimostatina y pepstatina)) utilizando el homogeneizador Polytron (Kinematica AG, Suiza). Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron a 4000 x g durante 15 minutos para eliminar los núcleos, las mitocondrias y cualquier fragmento celular grande restante. Los sobrenadantes preclarados se ultracentrifugaron a 100000 xg durante 1 hora. Los gránulos que contenían fracciones de membrana totales se solubilizaron en una solución salina tamponada con fosfato frío (PBS; tampón fosfato 10 mM, pH 7.4, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM) que contenía Triton X-100 al 1%, dodecilsulfato de sodio al 0.25% (SDS), PMSF 1 mM y un cóctel de inhibidores de proteasa. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el método de ensayo del ácido bicinconínico, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Las muestras (30 μ g) se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) y se transfirieron posteriormente a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad, EE. UU.) Como se describió anteriormente (Vriens et al., 2005). Las proteínas respectivas se detectaron con anticuerpos anti-TRPM3 de rata monoclonal purificada (dilución 1: 600) (Wagner et al., 2008) y anti-Na⁺/K⁺ ATPasa de ratón monoclonal (dilución 1: 5000) (Abcam, Reino Unido). Los complejos inmunoreactivos se visualizaron mediante quimioluminiscencia, utilizando anticuerpos anti-IgG de rata (Sigma, EE. UU.) O anti-IgG de ratón (GE Healthcare) conjugados con peroxidasa de rábano picante (diluciones 1: 40000 y 1: 5000, respectivamente).

45

50

Determinación de la glucosa en sangre

55

Se recogieron muestras de sangre mediante sangrado de la cola. Los niveles de glucosa se midieron a través del medidor de glucosa en sangre ACCU-CHEK Aviva (Roche Diagnostics).

Sistema de telemetría PhysioTel™

60

Se implantó un transmisor ETA-F10 (DSI™, Minneapolis, EE. UU.) En la cavidad abdominal (intraperitoneal) de un ratón macho adulto (semanas postnatales 10-12). Tres semanas después de la cirugía, los ratones se recuperaron y se utilizaron para realizar experimentos. Los datos se recopilaron utilizando el sistema DSI Dataquest® A.R.T.™ ((DSI™, Minneapolis, EE. UU.). La temperatura corporal central, la frecuencia cardíaca y el ECG fueron muestreados

65

cada 2 s. El vehículo, el sulfato de pregnenolona y la capsaicina se inyectaron por vía subcutánea (200 µl) en las concentraciones indicadas.

Hibridación in situ

5 Los ganglios trigeminales (TG) y los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de ratones *Trpm3^{+/+}* y *Trpm3^{-/-}* se diseccionaron y congelaron instantáneamente en el medio KP-CryoCompound (Klinipath, Países Bajos). Se procesaron secciones de criostato de 20 µm de espesor y se sondaron con sondas de ARN sentido y antisentido marcadas con digoxigenina (DIG). Las sondas de ARN se generaron mediante reacciones de transcripción in vitro SP6/T7 (Roche Diagnostics),
10 utilizando fragmentos de ADNc de *Trpm3* (número de acceso AJ 544535, 348 pares de bases (bp) entre los nucleótidos 1531-1879), *Trpv1* (número de acceso NM_001001445, 346 bp entre los nucleótidos 1157-1503). Las moléculas híbridadas se detectaron con fragmentos Fab anti-DIG conjugados con fosfatasa alcalina de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics).

15 Electrofisiología y ensayos de Ca²⁺ intracelular

Las corrientes de membrana de células completas se midieron con un EPC-10 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania). La velocidad de muestreo fue de 20 kHz y las corrientes se filtraron digitalmente a 2.9 kHz. Para las grabaciones en células HEK293T, la solución extracelular contenía (en mM): 138 NaCl, 5.4 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 glucosa, 10 HEPES (pH 7.2 con NaOH) y la solución de la pipeta contenida (en mM): 100 CsAsp, 45 CsCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 1 MgCl (pH 7.2 con CsOH). Para grabaciones en neuronas sensoriales, la solución extracelular contenía (en mM): 140 NaCl, 4 KCl, 2 MgCl₂, 100 nM TTX, 10 TRIS (pH 7.4 con HCl) y la solución de la pipeta contenía (en mM): 140 CsCl, 0.6 MgCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES, 5 TEA (pH 7.2 con CsOH). Para determinar la relación I-V de las corrientes inducidas por PS en las neuronas, todas las mediciones se realizaron en condiciones extracelulares libres monovalentes para suprimir otras conductancias catiónicas presentes en las neuronas DRG. La solución extracelular contenía en mM 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 280 D-Mannitol (pH 7.2 con NMDG).

Las mediciones de Ca²⁺ intracelular ratiométricas basadas en Fura-2 se realizaron como se describió anteriormente (Vriens et al., 2007). El siguiente procedimiento se usó para distinguir las respuestas inducidas por estímulos de las variaciones de fondo en la fluorescencia. Primero, calculamos la derivada temporal de la relación de fluorescencia (dRatio/dt) y la desviación estándar (SD) de dRatio/dt en ausencia de cualquier estímulo. Se observó una respuesta positiva cuando un estímulo causó un aumento de dRatio/dt que excede a 5 X SD. Las neuronas que no respondieron y que tampoco respondieron a K⁺ 50 mM se descartaron del análisis. Para cada condición, se analizaron un mínimo de 100 células derivadas de al menos tres aislamientos separados y en al menos doce mediciones independientes.

Para determinar una relación de temperatura-respuesta promedio para TRPM3, también usamos un ensayo basado en fluo-4 que utiliza placas de 96 pozos y el sistema 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems). Las células HEK293T que expresan de manera estable TRPM3α2 murina (Figura 9B) o las células HEK293T no transfectadas se cargaron con Fluo-4-AM durante 30 min, se tripsinizaron, se centrifugaron, se resuspendieron en una solución que contenía (en mM) 150 NaCl, 6 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂ y 10 HEPES (pH 7.4 con NaOH) y se transfirieron a una placa de 96 pozos (a 15000-25000 células/pozo; 50 µl). Cuando se indica, se añadió PS (10 µM) a los pozos. La fluorescencia de Fluo-4 se midió mientras la temperatura del pozo se elevó de 16 a 43°C en pasos de 3 grados. Se usaron señales de fluorescencia sustraídas en el fondo para calcular los cambios inducidos por la temperatura en la fluorescencia como $\Delta F/F_{16^\circ\text{C}}$, donde $F_{16^\circ\text{C}}$ es la fluorescencia corregida en el fondo a 16°C y $\Delta F = F - F_{16^\circ\text{C}}$. Los neuroesteroides sulfato de pregnenolona, la progesterona y el activador de TRPV1 capsaicina (todos Sigma) se aplicaron a las concentraciones indicadas de una solución madre de 100 mM, 250 mM y 10 mM respectivamente en DMSO.

Comportamiento

50 Las inyecciones de pata trasera, pruebas de bebida, pruebas de gradiente térmico, pruebas de elección de temperatura, placa caliente, placa fría, gancho de cola y ensayos de inmersión de cola se realizaron como se describió anteriormente (Cao et al., 1998; Caterina et al., 2000; Karashima et al., 2009; Mocrich et al., 2005). Para evocar la hiperalgesia inflamatoria, se inyectó intraplantarmente adyuvante completo de Freund (CFA, Sigma) (50 µl) en ambas patas traseras 24 h antes de las pruebas de comportamiento. Se usó aceite de maíz como control del vehículo. Para obtener la inhibición farmacológica de TRPV1, se inyectó AMG 9810 (Tocris Bioscience) disuelto en DMSO i.p a 3 mg/kg durante 7 días consecutivos (Gavva et al., 2007; Gavva et al., 2005). Se utilizó DMSO como control del vehículo. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del Consejo de la Comunidad de la Unión Europea y fueron aprobados por el comité de ética local.

60 Análisis de los datos

Los datos electrofisiológicos se analizaron utilizando el software FITMASTER (HEKA Elektronik, Alemania) y el software WinASCD (Guy Droogmans, Leuven). Se utilizó Origin 7.1 (OriginLab Corporation, Northampton, EE. UU.) Para el análisis estadístico y la visualización de datos. Los parámetros para el modelo de dos estados se determinaron a partir de un ajuste global de corrientes de células completas simuladas a corrientes experimentales medidas durante pasos de voltaje a diferentes temperaturas (Figura 5), utilizando rutinas caseras en Igor Pro 5.0 (Karashima et al.,

2009; Voets et al., 2004; Voets et al., 2007). Asumimos una conductancia lineal de un solo canal con un valor de Q_{10} de 1.35

Los datos agrupados de los parámetros continuos se expresan como media \pm SEM y se utilizó la prueba t de dos colas no pareada de Student para la comparación estadística entre los grupos. La prueba exacta de Fisher se usó para detectar diferencias estadísticas en la fracción de respondedores entre genotipos. $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Referencias

Bandell, M., Macpherson, L. J., and Patapoutian, A. (2007). From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr Opin Neurobiol* 17, 490-497.

Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267-284.

Bautista, D. M., Jordt, S. E., Nikai, T., Tsuruda, P. R., Read, A. J., Poblete, J., Yamoah, E. N., Basbaum, A. I., and Julius, D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124, 1269-1282.

Bautista, D. M., Siemens, J., Glazer, J. M., Tsuruda, P. R., Basbaum, A. I., Stucky, C. L., Jordt, S. E., and Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448, 204-208.

Cao, Y. Q., Mantyh, P. W., Carlson, E. J., Gillespie, A. M., Epstein, C. J., and Basbaum, A. I. (1998). Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 392, 390-394.

Caterina, M. J. (2007). Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R64-76.

Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I., and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313.

Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., and Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436-441.

Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.

Chen, S. C., and Wu, F. S. (2004). Mechanism underlying inhibition of the capsaicin receptor-mediated current by pregnenolone sulfate in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1027, 196-200.

Chung, M. K., Lee, H., and Caterina, M. J. (2003). Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *J Biol Chem* 278, 32037-32046.

Chung, M. K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M., and Caterina, M. J. (2004). TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J Biol Chem* 279, 21569-21575.

Colburn, R. W., Lubin, M. L., Stone, D. J., Jr., Wang, Y., Lawrence, D., D'Andrea, M. R., Brandt, M. R., Liu, Y., Flores, C. M., and Qin, N. (2007). Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54, 379-386.

Damann, N., Voets, T., and Nilius, B. (2008). TRPs in our senses. *Curr Biol* 18, R880-889.

Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., Harries, M. H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., et al. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405, 183-187.

Dhaka, A., Murray, A. N., Mathur, J., Earley, T. J., Petrus, M. J., and Patapoutian, A. (2007). TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54, 371-378.

Fajardo, O., Meseguer, V., Belmonte, C., and Viana, F. (2008). TRPA1 channels: novel targets of 1,4-dihydropyridines. *Channels (Austin)* 2, 429-438.

Fischbach, T., Greffrath, W., Nawrath, H., and Treede, R. D. (2007). Effects of anandamide and noxious heat on intracellular calcium concentration in nociceptive drg neurons of rats. *J Neurophysiol* 98, 929-938.

- Gavva, N. R., Bannon, A. W., Hovland, D. N., Jr., Lehto, S. G., Klionsky, L., Surapaneni, S., Immke, D. C., Henley, C., Arik, L., Bak, A., et al. (2007). Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia elicited by TRPV1 blockade. *J Pharmacol Exp Ther* 323, 128-137.
- 5 Gavva, N. R., Tamir, R., Qu, Y., Klionsky, L., Zhang, T. J., Immke, D., Wang, J., Zhu, D., Vanderah, T. W., Porreca, F., et al. (2005). AMG 9810 [(E)-3-(4- t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6- yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 313, 474-484.
- 10 Grimm, C., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G., and Harteneck, C. (2003). Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem* 278, 21493-21501.
- Grimm, C., Kraft, R., Schultz, G., and Harteneck, C. (2005). Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine [corrected]. *Mol Pharmacol* 67, 798-805.
- 15 Guler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., and Caterina, M. (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 22, 6408-6414.
- Havlikova, H., Hill, M., Hampl, R., and Starka, L. (2002). Sex- and age-related changes in epitestosterone in relation to pregnenolone sulfate and testosterone in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2225-2231.
- 20 Hill, M., Bicikova, M., Parizek, A., Havlikova, H., Klak, J., Fajt, T., Meloun, M., Cibula, D., Cegan, A., Sulcova, J., et al. (2001). Neuroactive steroids, their precursors and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal blood: 2. Time profiles of pregnanolone isomers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78, 51-57.
- 25 Karashima, Y., Damann, N., Prenen, J., Talavera, K., Segal, A., Voets, T., and Nilius, B. (2007). Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci* 27, 9874-9884.
- Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K. Y., Vennekens, R., Nilius, B., and Voets, T. (2009). TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1273-1278.
- 30 Knowlton, W. M., Bifolck-Fisher, A., Bautista, D. M., and McKemy, D. D. (2010). TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* 150, 340-350.
- 35 Kwan, K. Y., Allchorne, A. J., Vollrath, M. A., Christensen, A. P., Zhang, D. S., Woolf, C. J., and Corey, D. P. (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for haircell transduction. *Neuron* 50, 277-289.
- Lechner, S. G., Frenzel, H., Wang, R., and Lewin, G. R. (2009). Developmental waves of mechanosensitivity acquisition in sensory neuron subtypes during embryonic development. *Embo J* 28, 1479-1491.
- 40 Lee, H., Iida, T., Mizuno, A., Suzuki, M., and Caterina, M. J. (2005). Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci* 25, 1304-1310.
- 45 Lee, N., Chen, J., Sun, L., Wu, S., Gray, K. R., Rich, A., Huang, M., Lin, J. H., Feder, J. N., Janovitz, E. B., et al. (2003). Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J Biol Chem* 278, 20890-20897.
- 50 Madrid, R., de la Pena, E., Donovan-Rodriguez, T., Belmonte, C., and Viana, F. (2009). Variable threshold of trigeminal cold-thermosensitive neurons is determined by a balance between TRPM8 and Kvl potassium channels. *J Neurosci* 29, 3120-3131.
- McKemy, D. D., Neuhausser, W. M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52-58.
- 55 Mogil, J. S., Wilson, S. G., Bon, K., Lee, S. E., Chung, K., Raber, P., Pieper, J. O., Hain, H. S., Belknap, J. K., Hubert, L., et al. (1999). Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* 80, 67-82.
- 60 Moqrich, A., Hwang, S. W., Earley, T. J., Petrus, M. J., Murray, A. N., Spencer, K. S., Andahazy, M., Story, G. M., and Patapoutian, A. (2005). Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307, 1468-1472.
- Naylor, J., Li, J., Milligan, C. J., Zeng, F., Sukumar, P., Hou, B., Sedo, A., Yuldasheva, N., Majeed, Y., Beri, D., et al. (2010). Pregnenolone Sulphate- and Cholesterol-Regulated TRPM3 Channels Coupled to Vascular Smooth Muscle Secretion and Contraction. *Circ Res*.
- 65

- Nealen, M. L., Gold, M. S., Thut, P. D., and Caterina, M. J. (2003). TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *J Neurophysiol* 90, 515-520.
- 5 Nilius, B., and Voets, T. (2007). Neurophysiology: channelling cold reception. *Nature* 448, 147-148.
- Nilius, B., and Voets, T. (2008). A TRP channel-steroid marriage. *Nat Cell Biol* 10, 1383-1384.
- 10 Noel, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschaliere, A., and Lazdunski, M. (2009). The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK1 control both warm and cold perception. *Embo J* 28, 1308-1318.
- Oberwinkler, J., Lis, A., Giehl, K. M., Flockerzi, V., and Philipp, S. E. (2005). Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem* 280, 22540-22548.
- 15 Oberwinkler, J., and Philipp, S. E. (2007). Trpm3. *Handb Exp Pharmacol*, 253-267.
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., and Patapoutian, A. (2002a). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108, 705-715.
- 20 Peier, A. M., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Moqrich, A., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Story, G. M., Colley, S., Hogenesch, J. B., McIntyre, P., et al. (2002b). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296, 2046-2049.
- 25 Reubish, D., Emerling, D., Defalco, J., Steiger, D., Victoria, C., and Vincent, F. (2009). Functional assessment of temperature-gated ion-channel activity using a real-time PCR machine. *Biotechniques* 47, iii-ix.
- Schumacher, M., Liere, P., Akwa, Y., Rajkowski, K., Griffiths, W., Bodin, K., Sjøvall, J., and Baulieu, E. E. (2008). Pregnenolone sulfate in the brain: a controversial neurosteroid. *Neurochem Int* 52, 522-540.
- 30 Smith, G. D., Gunthorpe, M. J., Kelsell, R. E., Hayes, P. D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J. E., Jerman, J. C., Walhin, J. P., Ooi, L., et al. (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418, 186-190.
- Staa, S., Franck, M. C., Marmigere, F., Mattsson, J. P., and Ernfors, P. (2010). Dynamic expression of the TRPM subgroup of ion channels in developing mouse sensory neurons. *Gene Expr Patterns* 10, 65-74.
- 35 Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112, 819-829.
- 40 Talavera, K., Nilius, B., and Voets, T. (2008). Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. *Trends Neurosci* 31, 287-295.
- Talavera, K., Yasumatsu, K., Voets, T., Droogmans, G., Shigemura, N., Ninomiya, Y., Margolskee, R. F., and Nilius, B. (2005). Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* 438, 1022-1025.
- 45 Togashi, K., Hara, Y., Tominaga, T., Higashi, T., Konishi, Y., Mori, Y., and Tominaga, M. (2006). TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *Embo J* 25, 1804-1815.
- 50 Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I., and Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543.
- Ueda, H., Inoue, M., Yoshida, A., Mizuno, K., Yamamoto, H., Maruo, J., Matsuno, K., and Mita, S. (2001). Metabotropic neurosteroid/sigma-receptor involved in stimulation of nociceptor endings of mice. *J Pharmacol Exp Ther* 298, 703-710.
- 55 Viana, F., de la Pena, E., and Belmonte, C. (2002). Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat Neurosci* 5, 254-260.
- 60 Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430, 748-754.
- Voets, T., Owsianik, G., Janssens, A., Talavera, K., and Nilius, B. (2007). TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nature Chemical Biology* 3, 174-182.
- 65

- Vriens, J., Owsianik, G., Fisslthaler, B., Suzuki, M., Janssens, A., Voets, T., Morisseau, C., Hammock, B. D., Fleming, I., Busse, R., and Nilius, B. (2005). Modulation of the Ca²⁺ permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. *Circ Res* 97, 908-915.
- 5 Vriens, J., Owsianik, G., Janssens, A., Voets, T., and Nilius, B. (2007). Determinants of 4 alpha-phorbol sensitivity in transmembrane domains 3 and 4 of the cation channel TRPV4. *J Biol Chem* 282, 12796-12803.
- Wagner, T. F., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Mathar, I., Dufer, M., Lis, A., Flockerzi, V., Philipp, S. E., and Oberwinkler, J. (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat Cell Biol* 10, 1421-1430.
- 10 Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S. H., Benham, C. D., Droogmans, G., and Nilius, B. (2002). Heatevoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277, 47044-47051.
- 15 Woodbury, C. J., Zwick, M., Wang, S., Lawson, J. J., Caterina, M. J., Koltzenburg, M., Albers, K. M., Koerber, H. R., and Davis, B. M. (2004). Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. *J Neurosci* 24, 6410-6415.
- 20 Xu, H., Ramsey, I. S., Kotecha, S. A., Moran, M. M., Chong, J. A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., et al. (2002). TRPV3 is a calciumpermeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418, 181-186.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la identificación de un agente para el tratamiento y/o la profilaxis del dolor, en el que dicho método comprende la detección de agentes capaces de inhibir TRPM3, en el que dicha selección comprende determinar el efecto antinociceptivo de dicho compuesto.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichos agentes son capaces de inhibir la expresión de un gen que codifica TRPM3, o en el que dichos agentes son capaces de inhibir la expresión de un agonista de TRPM3.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que comprende los pasos de:
- (a) Aplicación de antagonistas de TRPM3 candidatos a un primer grupo de animales de laboratorio y un segundo grupo tratado con vehículo, grupo no tratado, de animales de laboratorio;
- 20 (b) Inyección local de un agonista de TRPM3 adecuado; y
- (c) Medir y comparar la respuesta nociceptiva a la inyección de agonistas, al monitorizar el comportamiento nocifensivo, entre los animales tratados con antagonista de TRPM3 candidato y los animales tratados con vehículo, grupo no tratado, en donde una disminución de la respuesta nociceptiva en el primer grupo, el antagonista, los animales de laboratorio tratados con antagonista TRPM3 candidato en comparación con el segundo grupo de animales de laboratorio tratados con vehículo, el grupo no tratado indica el agente como un antagonista de TRPM3.
- 25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que comprende los pasos de:
- (a) Aplicación de antagonistas de TRPM3 candidatos a un primer grupo de animales de laboratorio y a un segundo grupo de animales de laboratorio tratados con vehículo, no tratados; y
- 30 (b) Medir y comparar la respuesta nociceptiva a un estímulo de calor entre el grupo de animales tratados con el antagonista de TRPM3 candidato y el grupo de animales tratados con vehículo, grupo no tratado, en donde una disminución de la respuesta nociceptiva en el primer grupo, los animales de laboratorio tratados con antagonistas de TRP 3 candidato, en comparación con el segundo grupo de animales de laboratorio tratados con vehículo, indican que el agente es un antagonista de TRPM3.
- 35 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende los pasos de:
- (a) Medición de la respuesta nociceptiva en animales de laboratorio a un estímulo de calor;
- (b) Inducción de inflamación local en dichos animales de laboratorio;
- 40 (c) Aplicación de antagonistas de TRPM3 candidatos a dichos animales de laboratorio de la etapa (b);
- (d) Medición de la respuesta nociceptiva de los animales de laboratorio tratados con antagonistas de TRPM-3 candidatos de la etapa (c) a un estímulo de calor; y
- 45 (e) Comparación de la respuesta nociceptiva en los segundos animales tratados térmicamente de la etapa (d), con la respuesta nociceptiva a los primeros animales tratados térmicamente de la etapa (a), en donde una disminución o statu quo de la respuesta nociceptiva en el segundo grupo tratado con calor de la etapa (d) en comparación con el primer grupo tratado con calor de la etapa (a), indica el agente como un antagonista de TRPM3.
- 50 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho dolor es hiperalgesia inflamatoria.

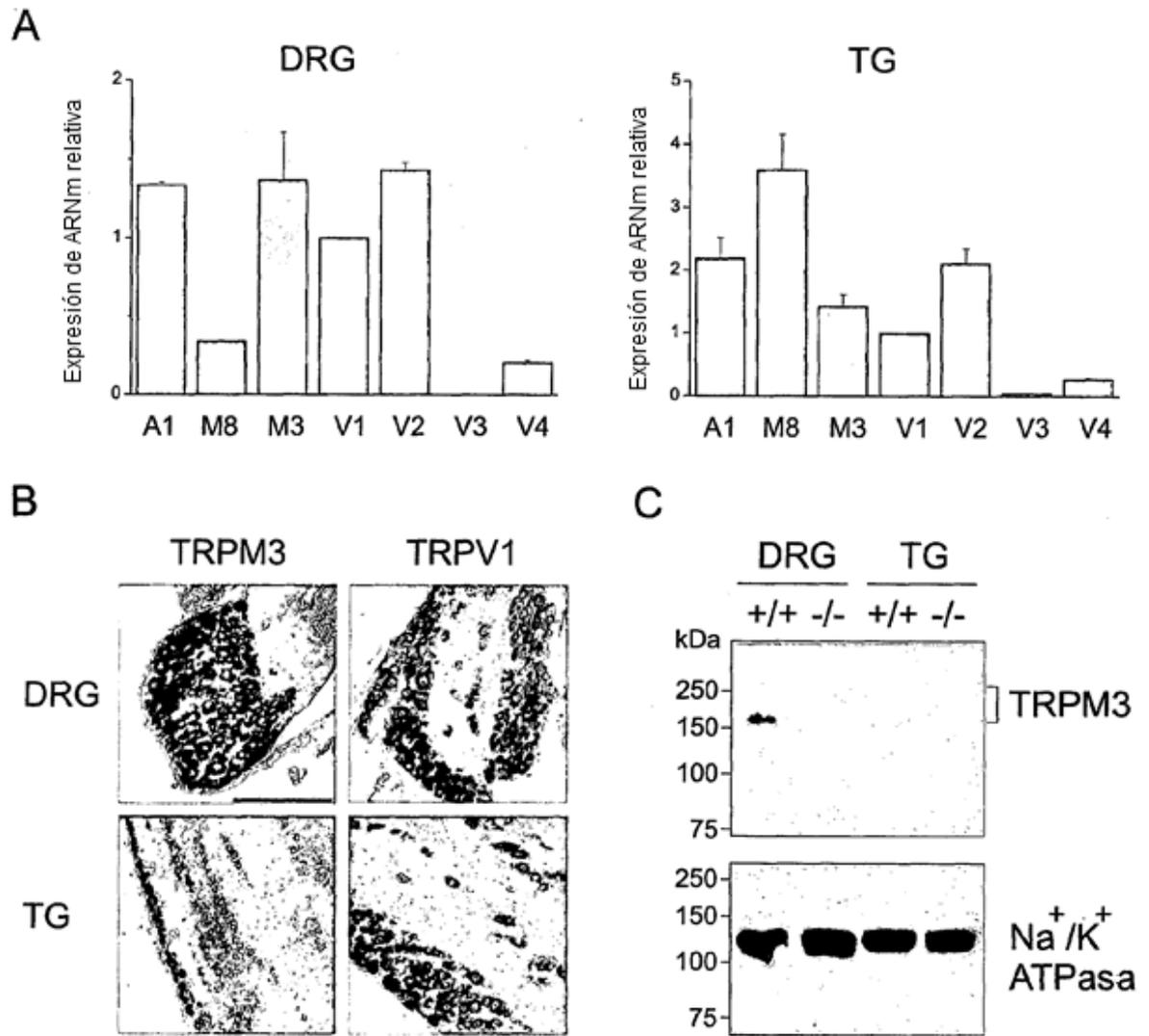


Figura 1

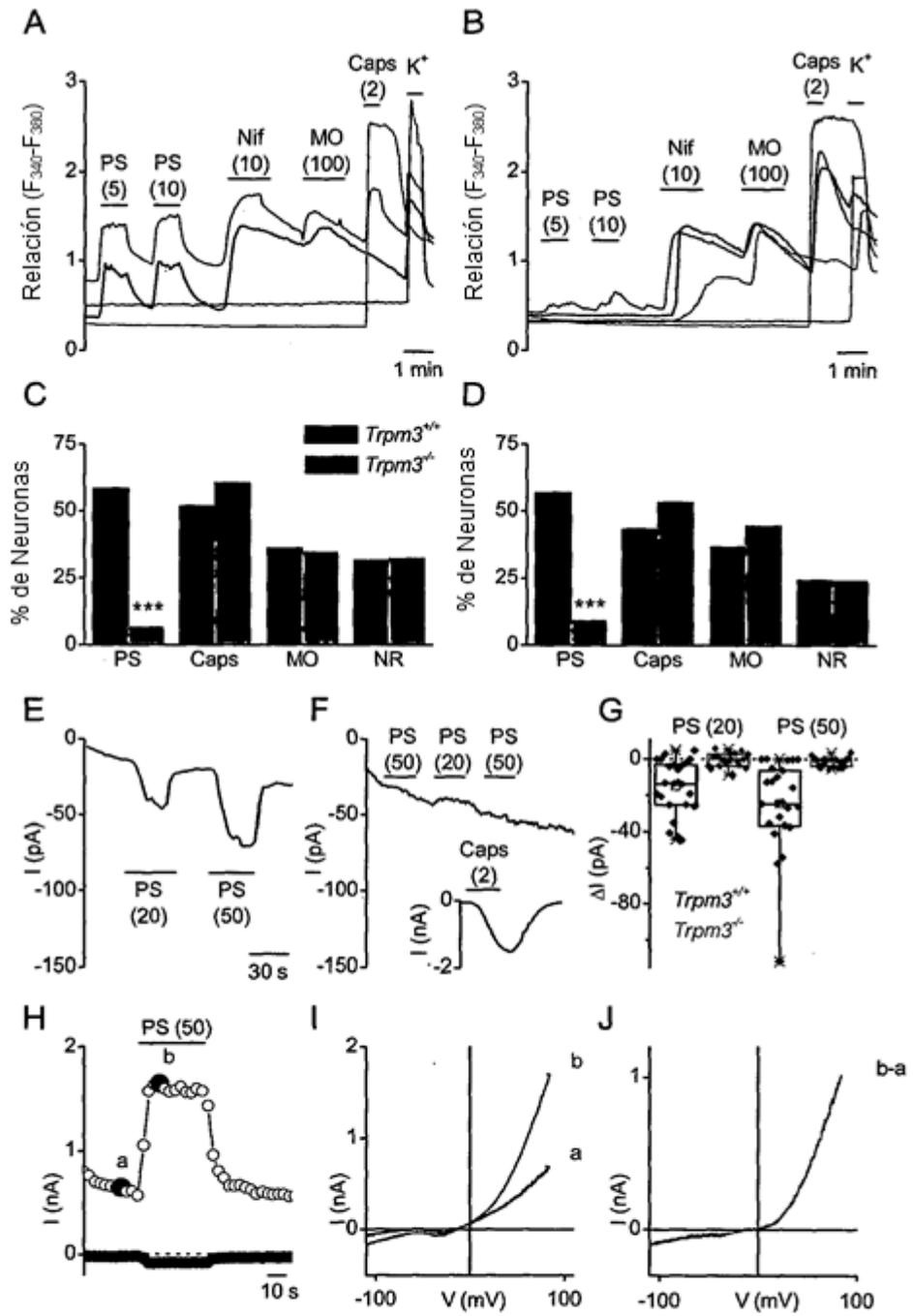


Figura 2

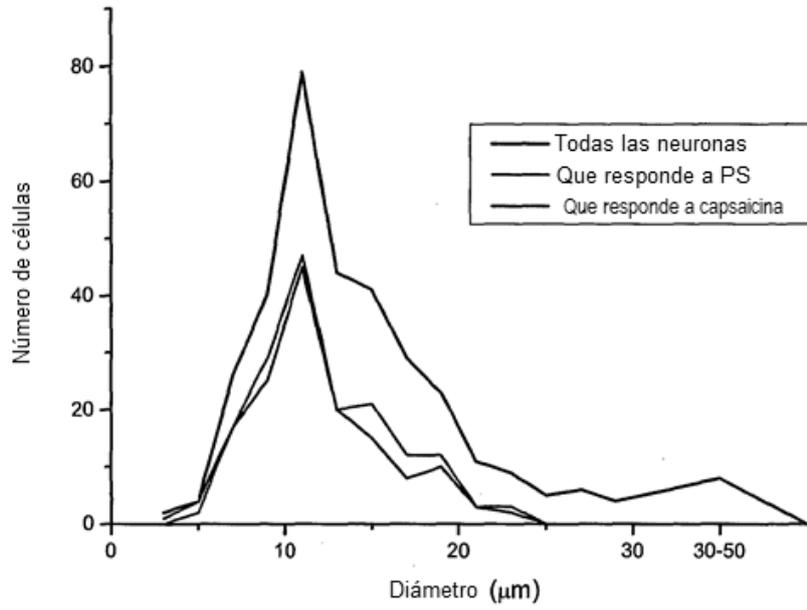


Figura 3

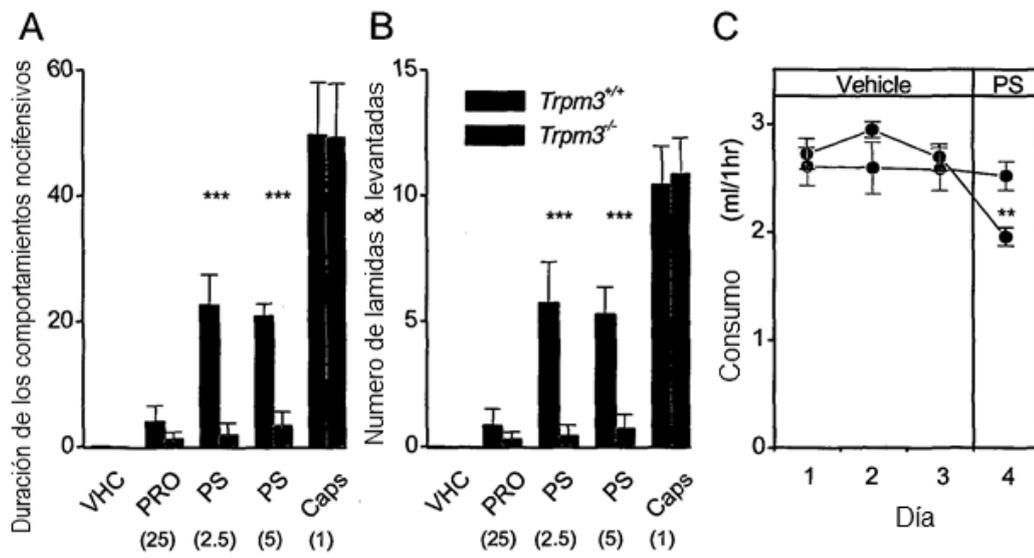


Figura 4

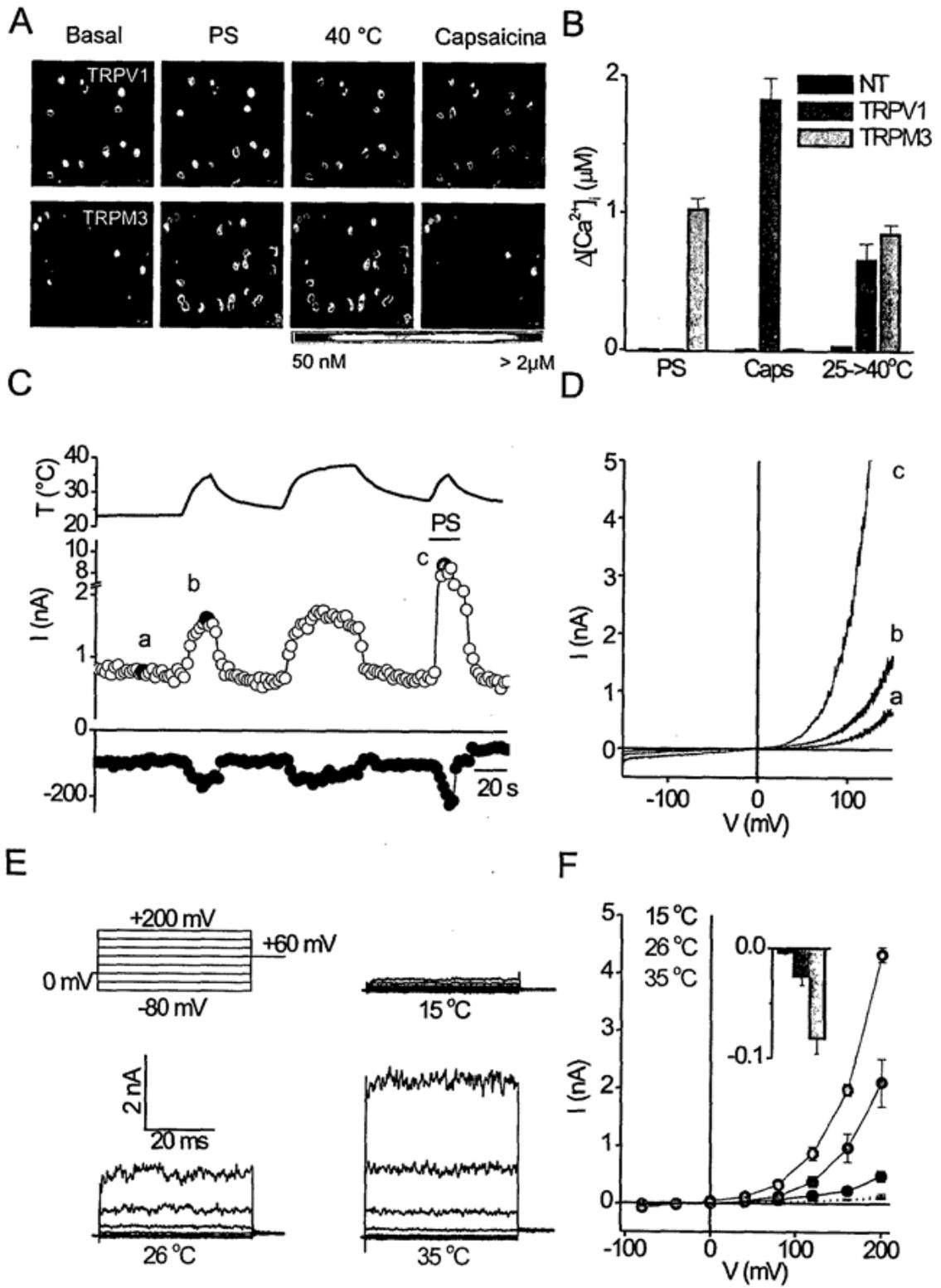


Figura 5

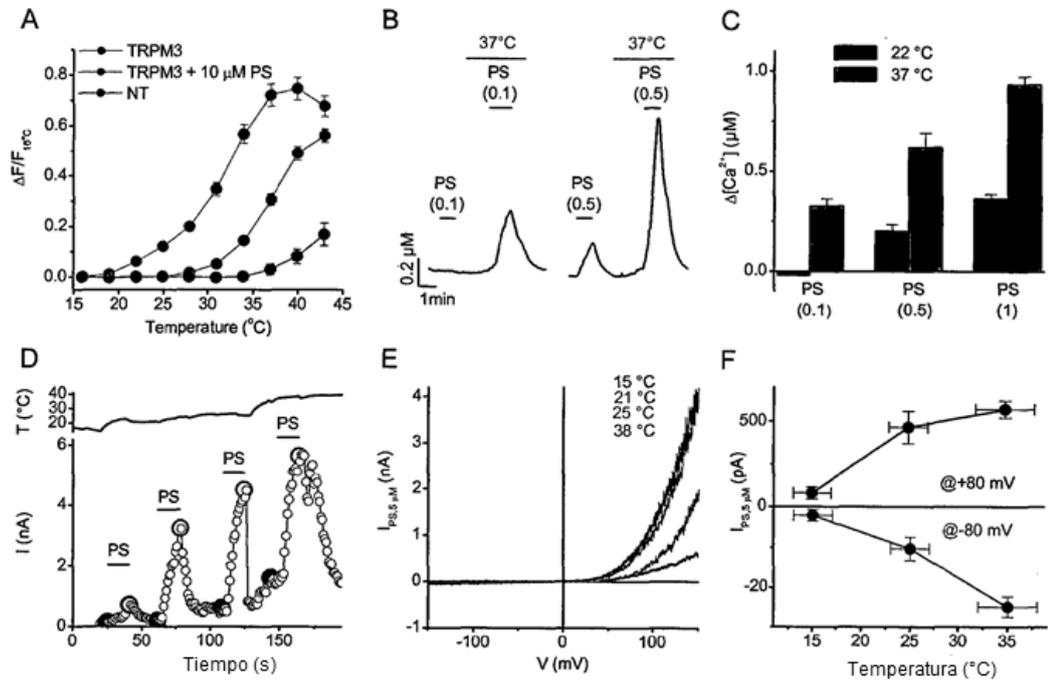


Figura 6

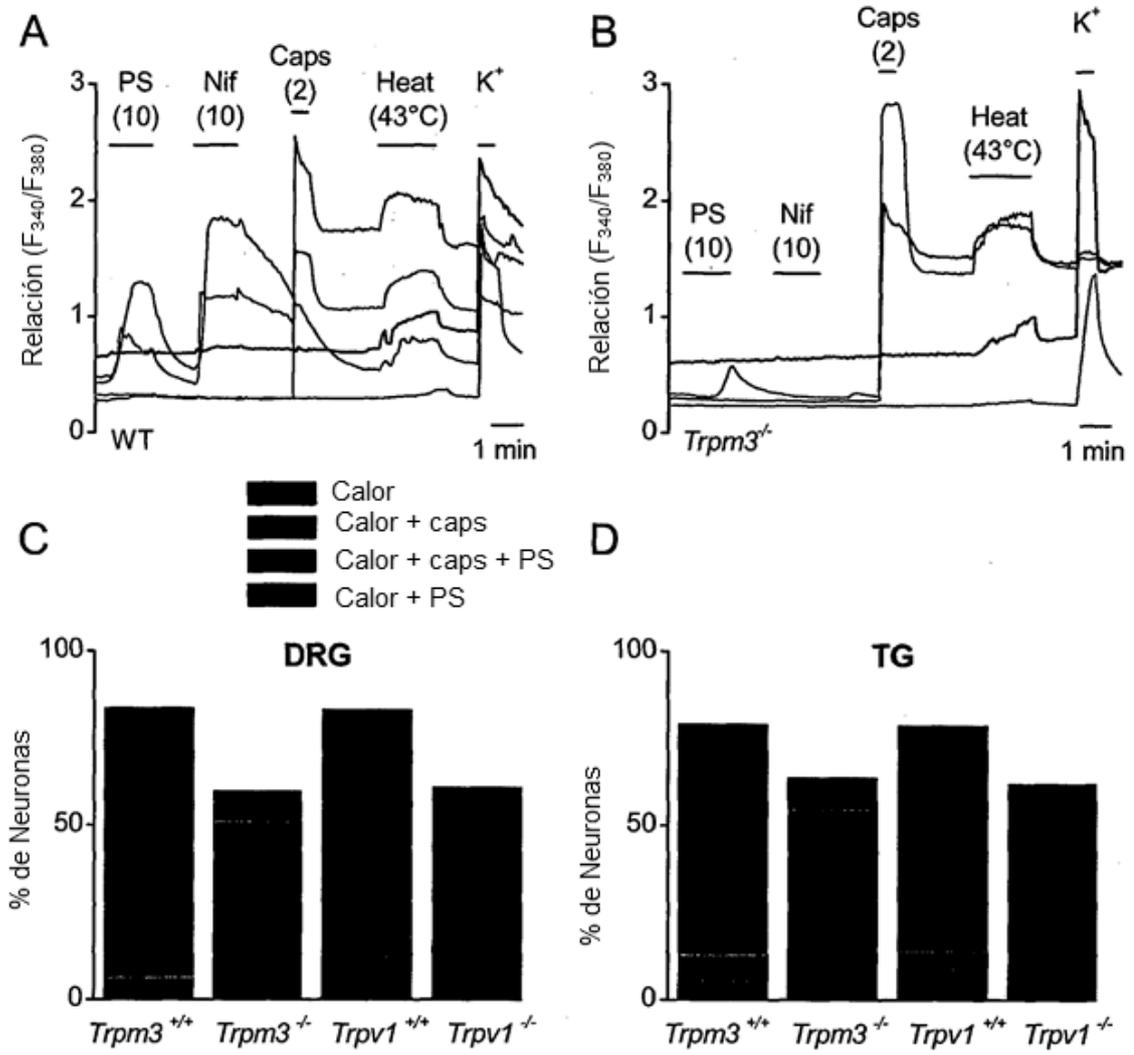


Figura 7

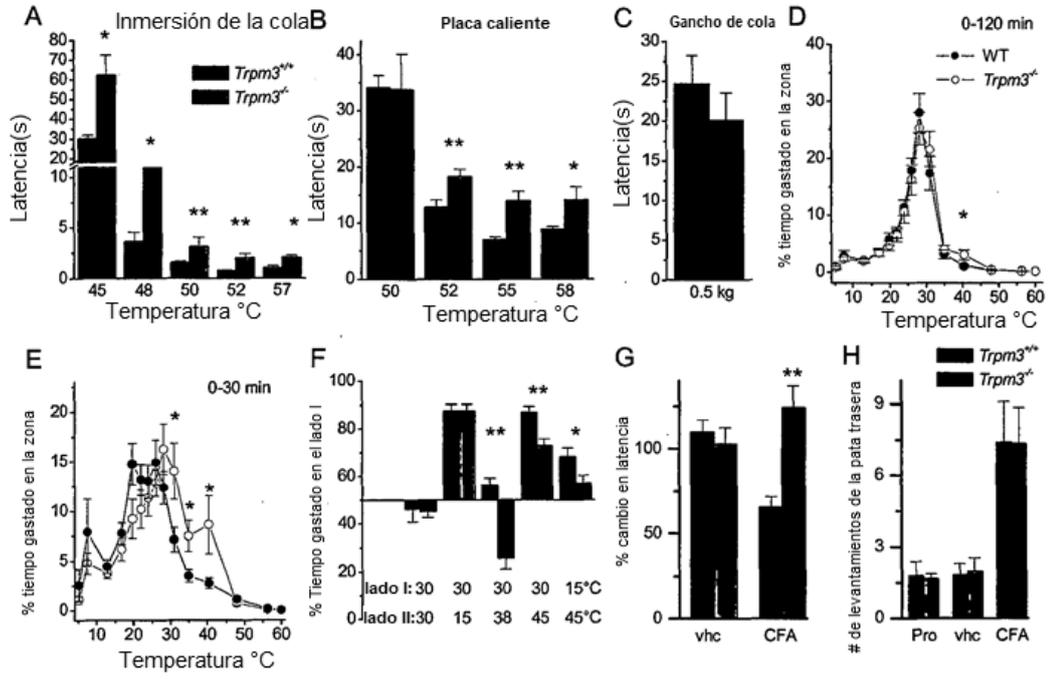


Figura 8

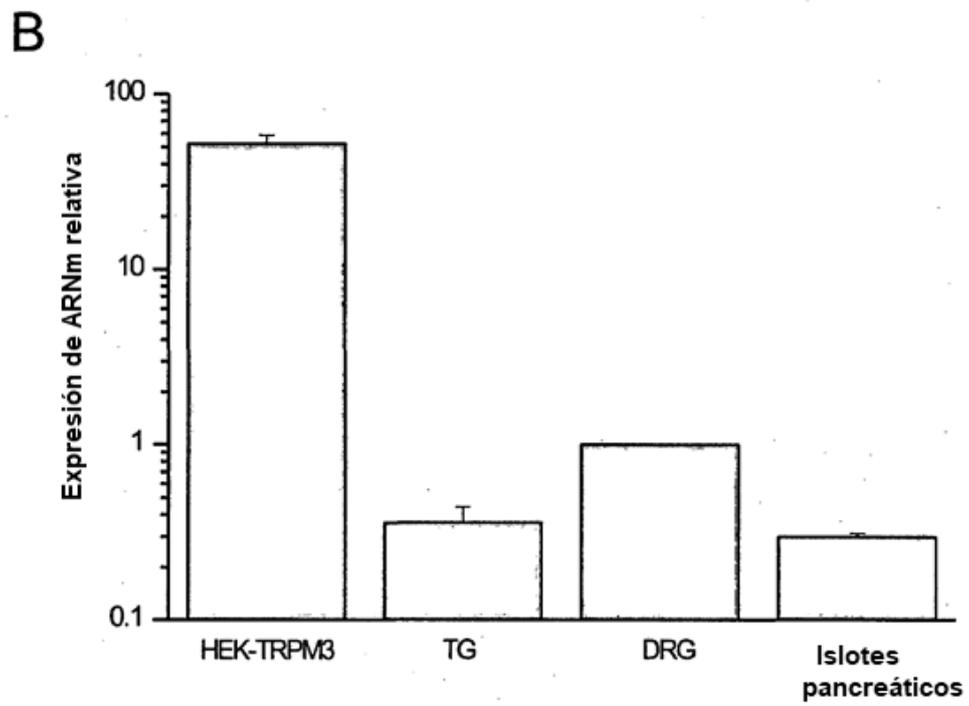
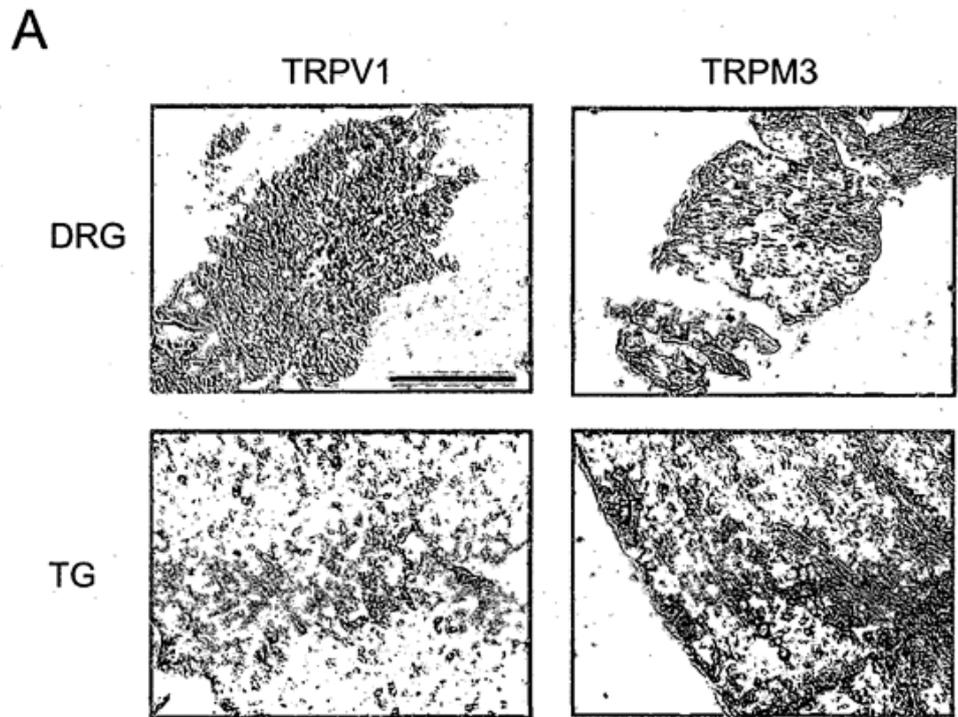


Figura 9

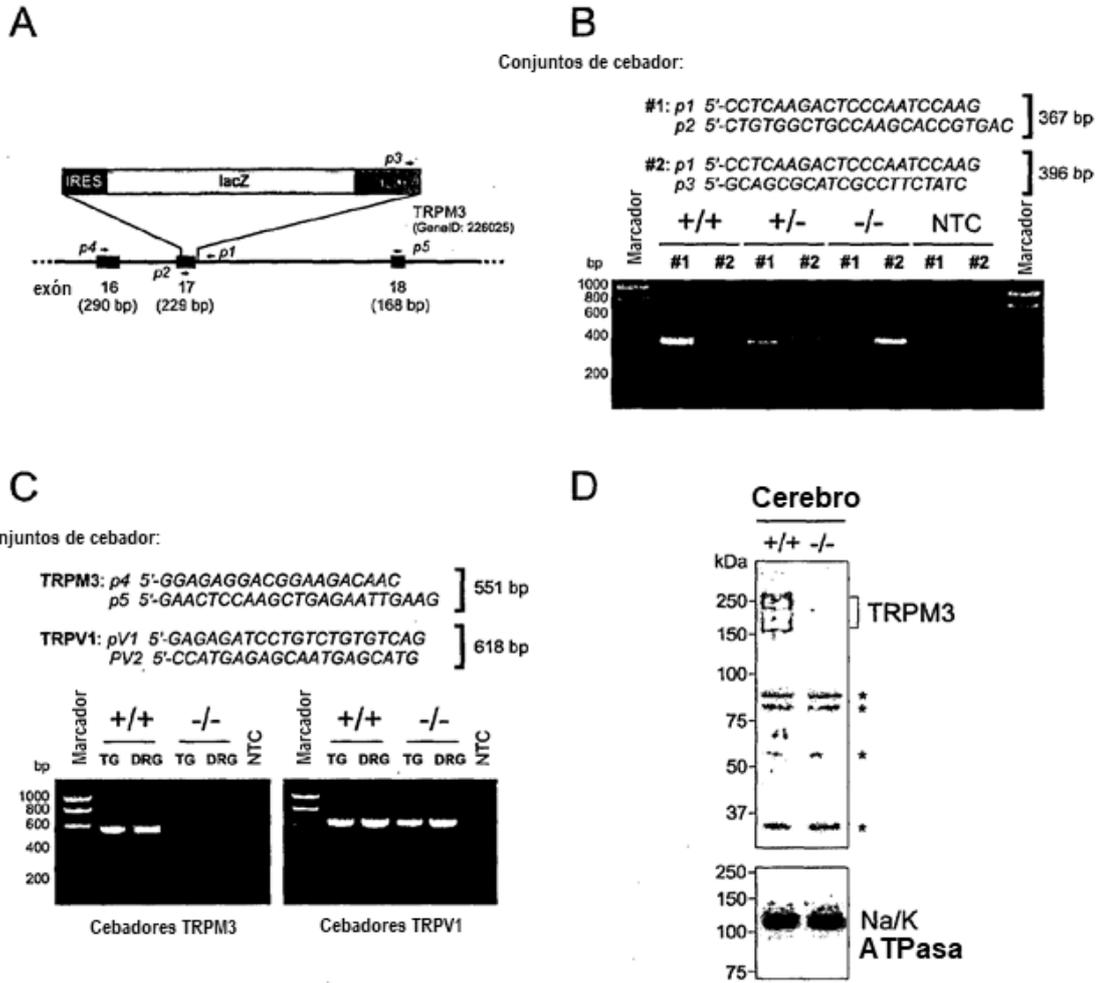


Figura 10

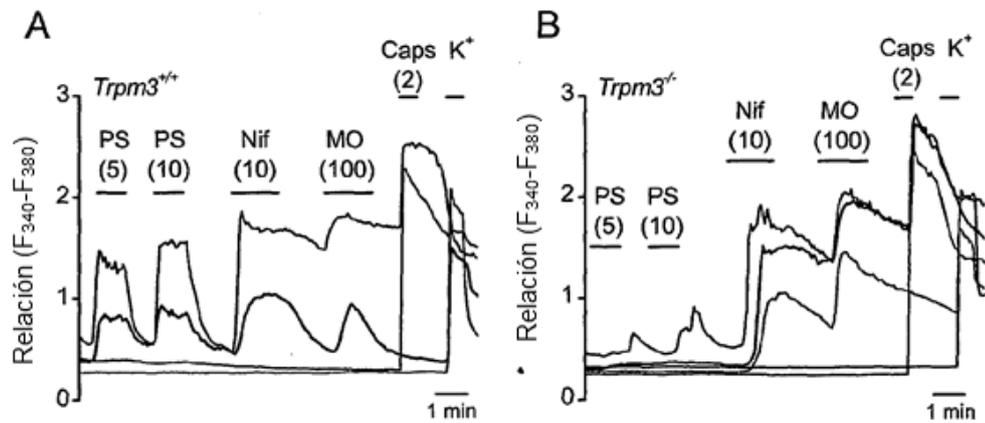


Figura 11

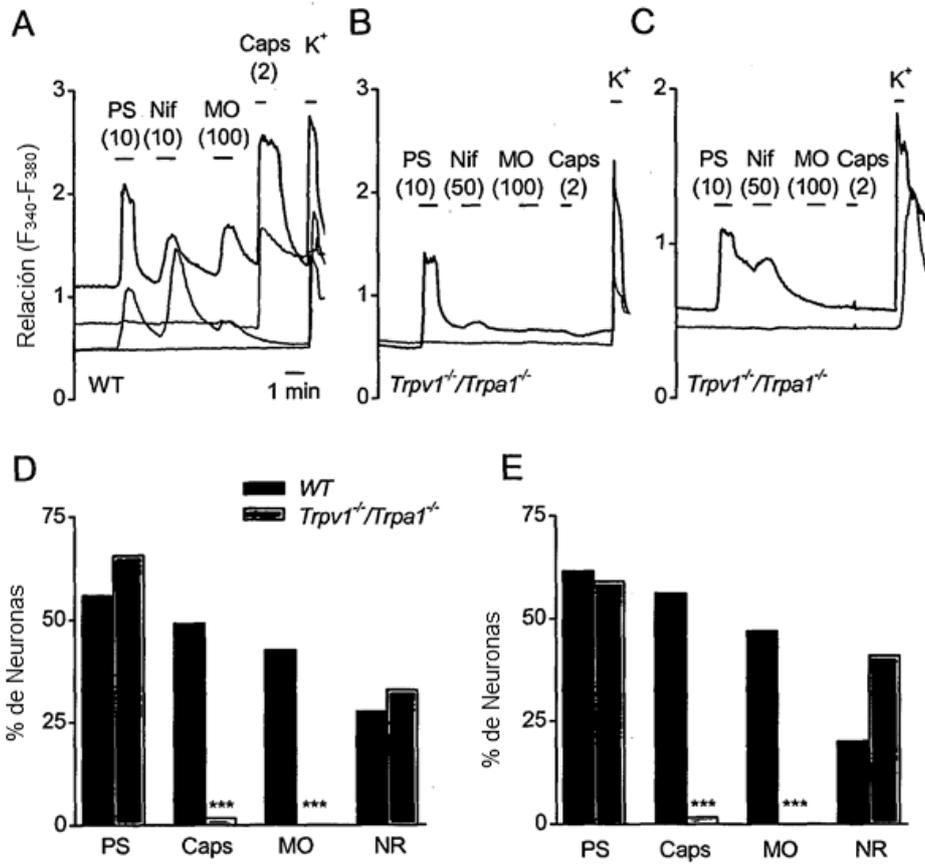


Figura 12

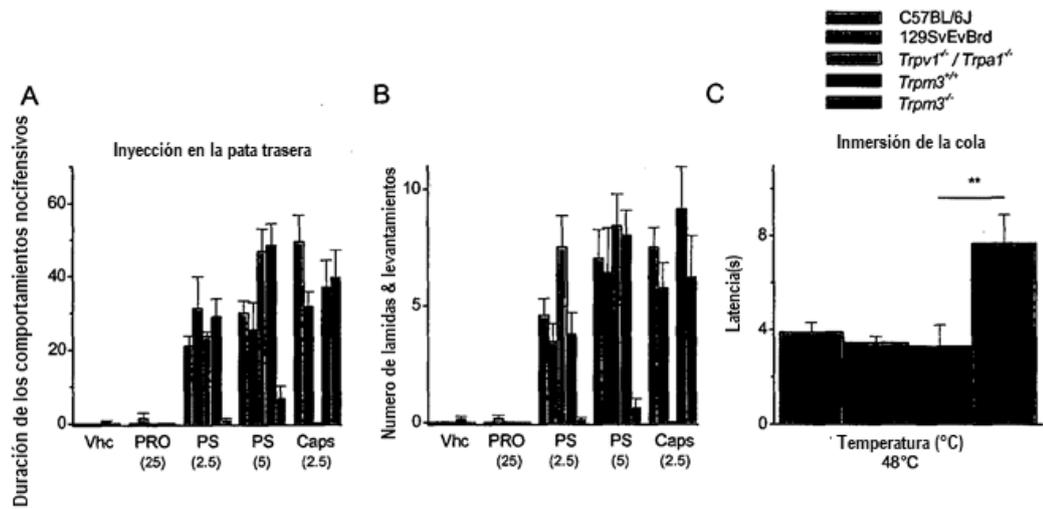


Figura 13

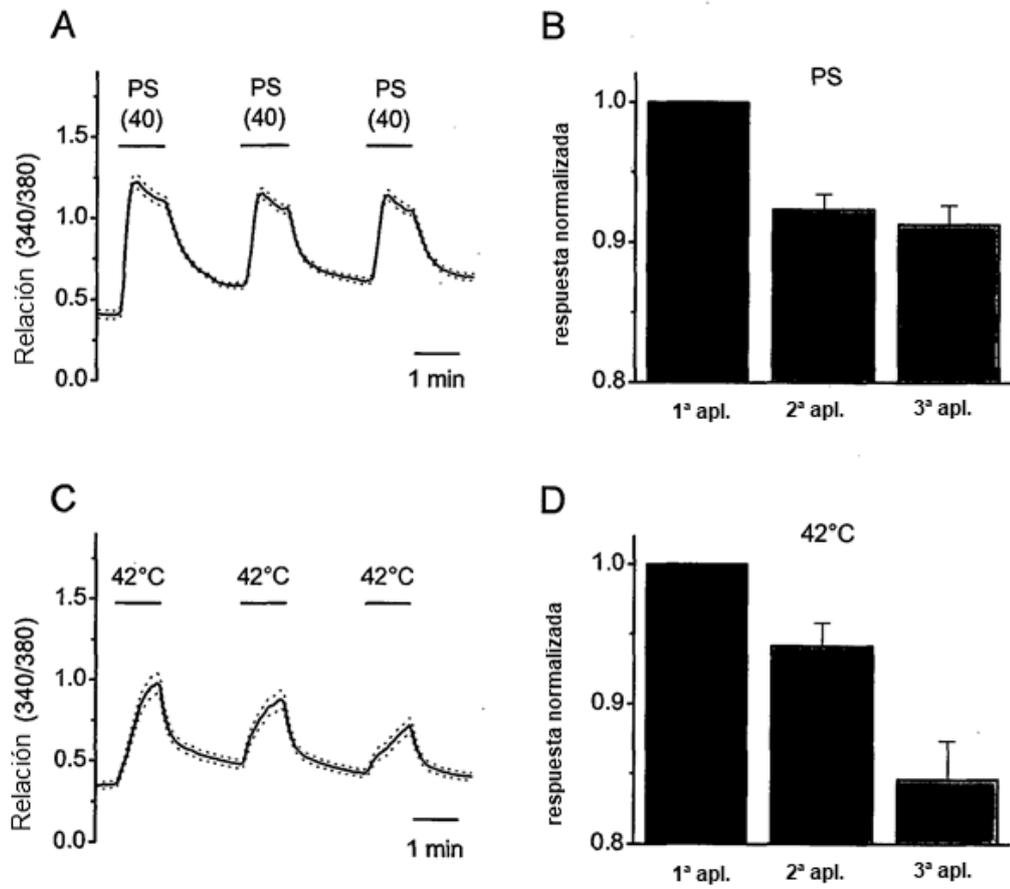


Figura 14

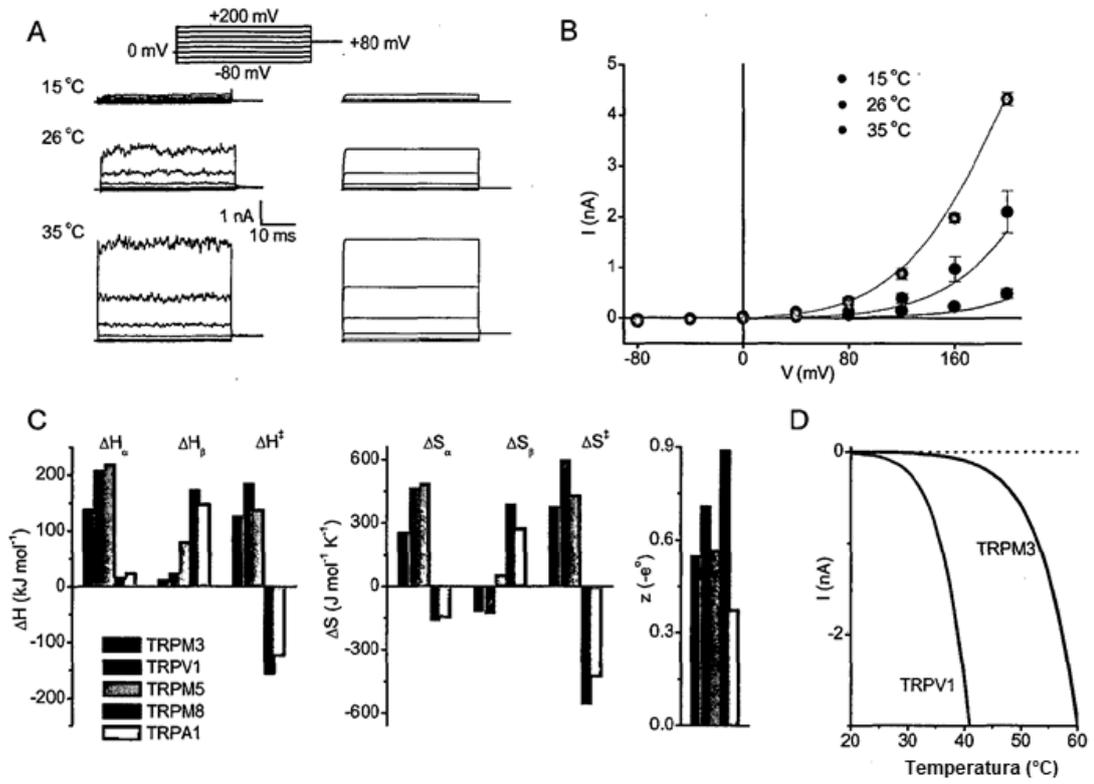


Figura 15

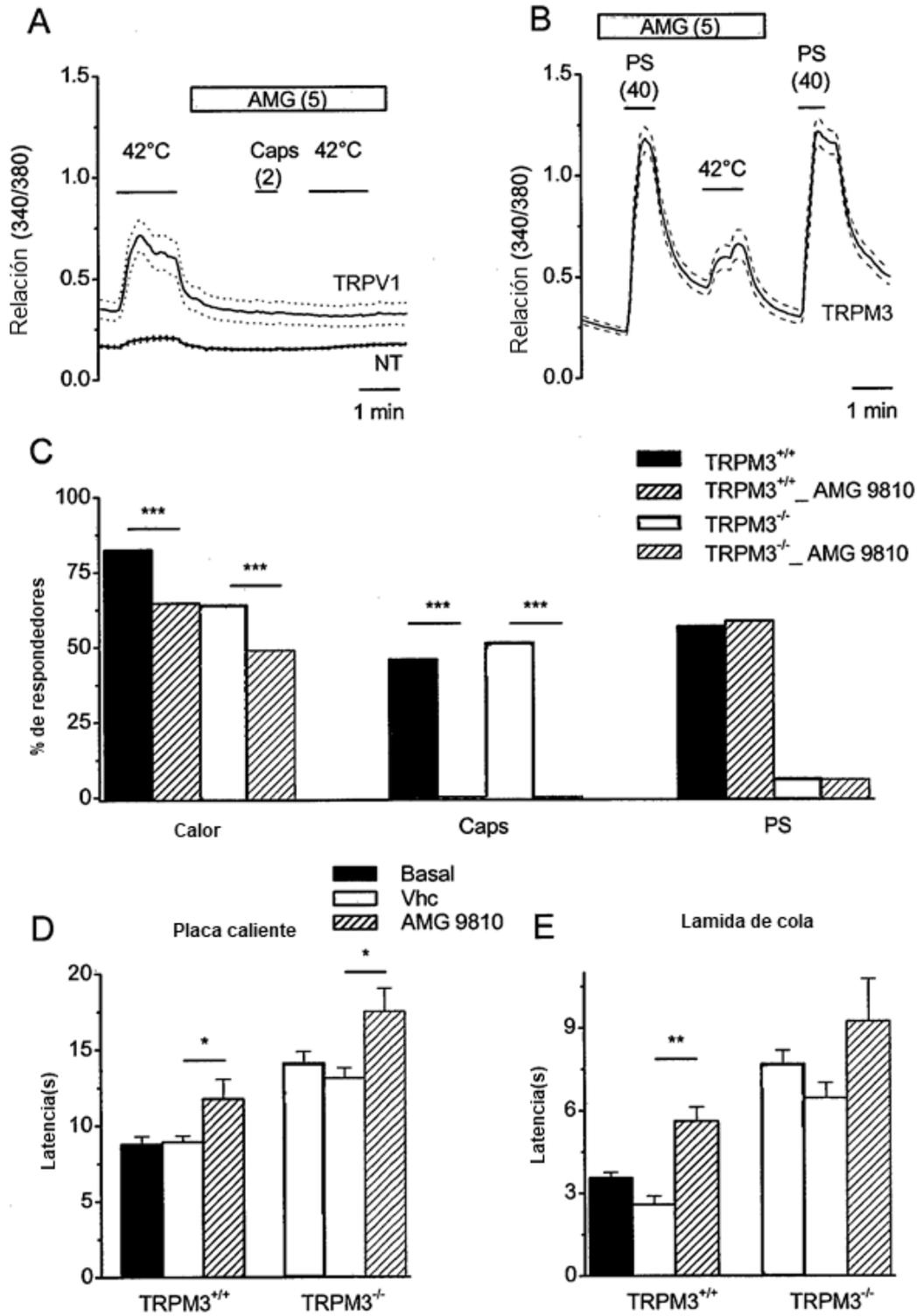


Figura 16

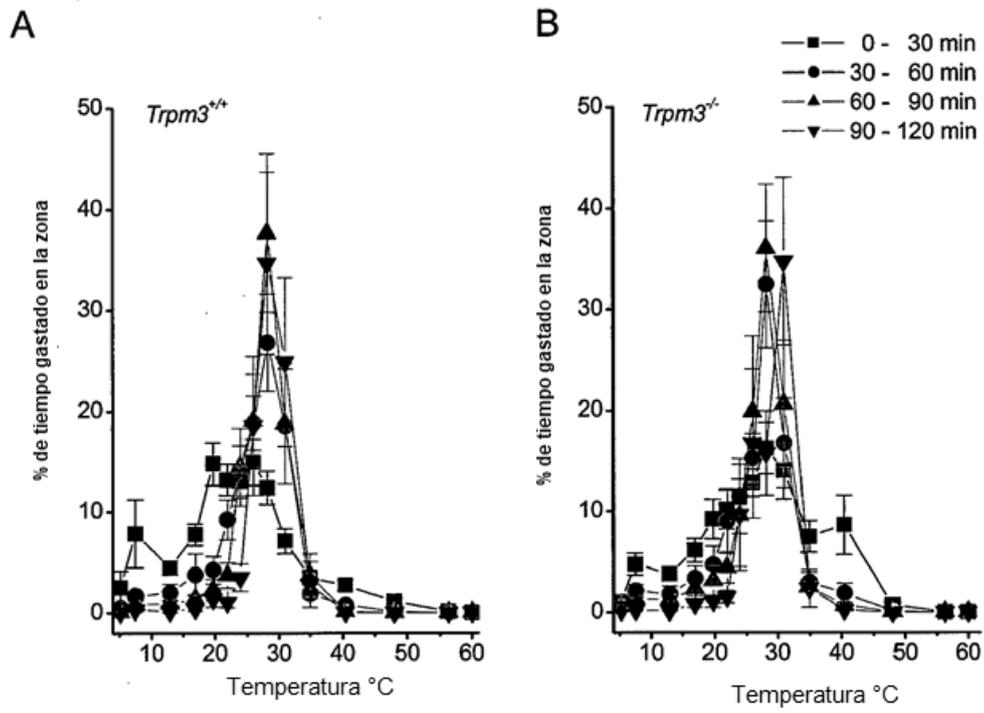


Figura 17

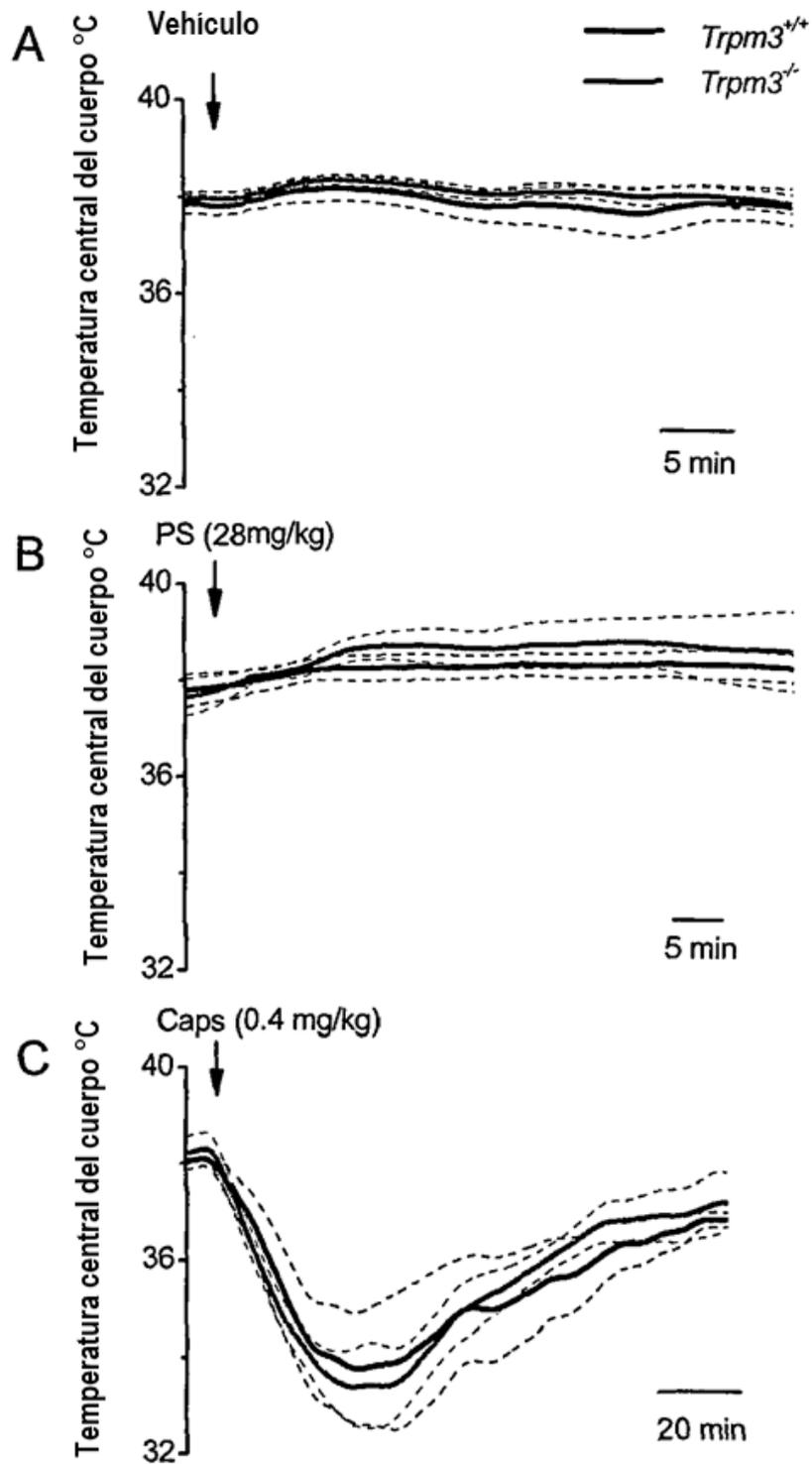


Figura 18