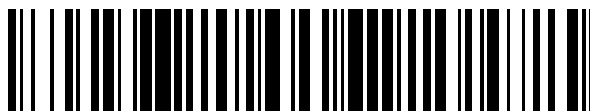


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 598**

51 Int. Cl.:

A61K 38/06	(2006.01)	A61K 9/00	(2006.01)
A61K 38/07	(2006.01)	A61K 31/352	(2006.01)
A61K 38/08	(2006.01)	A61K 31/4422	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01)	A61K 47/64	(2007.01)
A61K 31/55	(2006.01)	C12N 9/12	(2006.01)
A61K 38/04	(2006.01)	A61P 25/00	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)		
A61K 38/46	(2006.01)		
A61K 9/70	(2006.01)		
A61K 38/02	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2006 E 12177074 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2601964**

54 Título: **Compuestos de balanol para su uso en el tratamiento de dolor**

30 Prioridad:

21.03.2005 US 664071 P
01.09.2005 US 713435 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.01.2019

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN
THE CITY OF NEW YORK (100.0%)
116th Street and Broadway
New York, NY 10027, US**

72 Inventor/es:

**AMBRON, RICHARD;
SUNG, YING-JU;
LANDRY, DONALD W y
DENG, SHI-ZIAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 696 598 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

Compuestos de balanol para su uso en el tratamiento de dolor

5 **Memoria descriptiva**

La presente solicitud reivindica prioridad de Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º de Serie 60/713.435 que se presentó el 1 de septiembre de 2005 y de Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N.º de Serie 60/664.071, que se presentó el 21 de marzo de 2005.

10

Información de la subvención

El tema de esta solicitud se desarrolló, al menos en parte, a cargo de los *National Institutes of Health Grants* NS12250 y NS35979, por lo que el Gobierno de los Estados Unidos tiene determinados derechos en este documento.

15

1. Introducción

La presente invención se refiere al descubrimiento de una nueva ruta molecular implicada en la hiperexcitabilidad de larga duración de las neuronas sensoriales, que, en animales superiores, se asocia a dolor persistente.

20

2. Antecedentes de la invención

El dolor se percibe como resultado de la comunicación entre las dos divisiones principales, la central y la periférica, del sistema nervioso. Mientras que las dos divisiones trabajan juntas para producir nuestra experiencia subjetiva, los sistemas nerviosos central y periférico son diferentes desde el punto de vista anatómico y funcional.

25

Un estímulo doloroso que incide en un receptor especializado del dolor se propaga a lo largo de una rama periférica de una neurona sensorial periférica cuyo cuerpo celular se encuentra dentro de un ganglio de la raíz dorsal (parte del sistema nervioso periférico) y después a lo largo de una rama central de la neurona que entra en la médula espinal (sistema nervioso central). Posteriormente, la señal se transmite a una neurona de segundo orden en la médula espinal, que a su vez transmite la señal al lado opuesto ("contralateral") de la médula espinal y después a las estructuras de percepción de dolor en el cerebro.

30

Los receptores del dolor periférico se encuentran en las terminaciones nerviosas libres que pueden responder a estímulos mecánicos, térmicos o químicos. El dolor puede ser agudo o crónico. El dolor agudo se transmite típicamente desde el receptor a lo largo de los axones de las neuronas sensoriales A δ , que están cubiertas de una capa delgada con el compuesto aislante, la mielina, que facilita la conducción del impulso. El dolor crónico normalmente viaja a través de las fibras C, que, debido a que no están mielinizadas, transmiten los impulsos lentamente, lo que lleva a la característica típica del dolor crónico y difuso. Los mediadores químicos de la inflamación, tales como la bradiquinina y las prostaglandinas estimulan los receptores del dolor y son agentes importantes en los síndromes de dolor crónico, como el dolor persistente asociado a artritis o a inflamación de los nervios.

35

40

La percepción del dolor se puede alterar en varias etapas de la ruta del dolor. Por ejemplo, el estímulo doloroso puede eliminarse administrando un anestésico local al receptor periférico. Clásicamente se sabe que los fármacos, tales como los opioides, intervienen en la etapa del sistema nervioso central de la ruta del dolor y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos intervienen en la etapa periférica (aunque ahora se comprende que existe una cierta reactividad cruzada de ambas). Del mismo modo, lo que se percibe como dolor crónico (no debido a una lesión primaria de la médula espinal) se asocia típicamente a la sensibilización de los receptores del dolor periférico, así como a los cambios en la excitabilidad de las neuronas de segundo orden, y por lo tanto, tiene componentes del sistema nervioso tanto periférico como central. Los componentes periféricos y centrales implicados en el dolor crónico se denominan, respectivamente, hiperalgesia "primaria" y "secundaria" (Urban y Gebhart, 1999, citando a Woolf, 1983 y La Motte *et al.*, 1991).

45

50

En cuanto a los componentes del sistema nervioso central del dolor crónico, la neurona de la médula espinal que recibe el estímulo del axón del ganglio de la raíz dorsal, presenta cambios en la expresión de genes en el contexto de dolor crónico y se cree que contribuye al fenómeno de la "sensibilización central" o "hiperalgesia espinal". Se cree que los receptores espinales de N-metil-D-aspartato ("NMDA") desempeñan un papel importante en este proceso (Urban y Gebhart, 1999, citando a Urban y Gebhart, 1998; Palacek *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1993). La lesión de la médula espinal sin la activación del sistema nervioso periférico también puede producir hiperalgesia espinal que da como resultado un síndrome de dolor central (Zhang *et al.*, 2005). El dolor neuropático central se ha asociado con la fosforilación del factor de transcripción, proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico ("CREB") (Cron *et al.*, 2005).

55

60

Con respecto al componente del sistema nervioso periférico del dolor crónico asociado a la lesión nerviosa ("dolor neuropático"), el dolor neuropático persistente es un problema clínico importante que ha resistido principalmente a un tratamiento eficaz. En seres humanos (Gracely *et al.* 1992) y en sistemas de modelos de mamíferos (Millan, 1999), el

65

dolor persistente después de una lesión nerviosa se asocia a una hiperexcitabilidad de larga duración (LTH, *long-term hyperexcitability*) de las neuronas sensoriales (SN, *sensory neurons*) que tienen axones en el nervio lesionado. La LTH se manifiesta como una mayor sensibilidad a los estímulos eléctricos en el cuerpo de la célula SN y en el axón en el sitio de la lesión (Wall y Devor, 1983; Study y Kral, 1996; Zhang *et al.*, 1997; Chen y Devor, 1998; Kim *et al.*, 1998; Abdulla y Smith, 2001). Estos cambios dan como resultado la descarga de potenciales de acción de las SN en reposo o durante una estimulación inocua, lo que lleva a la excitación continua de las neuronas de orden superior en el sistema nervioso central y a la hiperalgesia espinal o secundaria y al dolor persistente. Debido a que la aparición de la LTH implica alteraciones en la expresión génica (Waxman *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2003), una pregunta importante es ¿cómo se producen en el núcleo estos cambios inducidos por una lesión que se produce lejos del cuerpo celular? Responder a esta pregunta ha sido extremadamente difícil utilizando el sistema nervioso complejo de mamíferos.

Un alternativa experimentalmente favorable es el conjunto homogéneo de las SN que residen en los ganglios pleurales bilaterales del molusco *Aplysia californica* (Walters *et al.*, 2004). La estimulación mecánica nociva de la pared corporal (Walters *et al.*, 1983a) o aplastamiento de axones de SN *in vivo* o *in vitro*, genera una LTH con propiedades electrofisiológicas similares a las observadas después de axotomía de las SN de mamíferos (Walters *et al.*, 1991; Walters, 1994; Ambron *et al.*, 1996; Bedi *et al.*, 1998; Ungless *et al.*, 2002; Sung y Ambron, 2004). La LTH aparece después de un retraso, lo que sugiere que su inducción después del aplastamiento del nervio es atribuible a una señal de lesión molecular positiva (Walters *et al.*, 1991; Ambron y Walters, 1996; Lin *et al.*, 2003). Dos estudios confirman esta idea. Primero, el bloqueo del transporte axonal después de una lesión nerviosa en los sistemas nerviosos extirpados impidió la aparición de LTH (Gunstream *et al.*, 1995). En segundo lugar, la LTH se indujo en SN no lesionadas mediante inyección de axoplasma de axones lesionados (Ambron *et al.*, 1995). La LTH también se suscitó en las SN después de la inyección intrasomática de un miembro de ERK (quinasa regulada por señal extracelular) de la familia MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) (Sung *et al.*, 2001). Otros experimentos han sugerido que el cGMP y la PKG (proteína quinasa dependiente de cGMP; proteína quinasa G) probablemente estén implicados (Lewin y Walters, 1999). Sin embargo, a pesar de estas observaciones, se desconoce la identidad de la señal del axón, cómo se activan la PKG y ERK, o cómo pueden interactuar estas quinasas. Además, también se informó que la LTH es inducida por el cAMP que actúa sobre la PKA (proteína quinasa A) en un paradigma de aprendizaje (Dale *et al.*, 1988; Scholz y Byrne, 1988).

La Patente de Estados Unidos N.º 6.476.007 de Tao y Johns ("la patente 007") se relaciona con una ruta de señalización propuesta en el sistema nervioso central en la que la estimulación de un receptor de N-metil-D-aspartato ("NMDA") conduce a la activación de la óxido nítrico sintasa ("NOS") y a la producción de óxido nítrico ("NO"), que después estimula a la guanilato ciclasa ("GC") y la producción de guanosín monofosfato cíclico (cGMP), que a su vez activa la proteína quinasa α dependiente de cGMP ("PKG"). Se observó que la administración del inhibidor de la PKG Rp-8-[4-clorofenil]tio-cGMPS trietilamina en el sistema nervioso central por administración intratecal, después de la inducción de una respuesta inflamatoria, produjo una antinocicepción significativa en ratas 10 y 60 minutos más tarde. Además, se observó una regulación positiva de la expresión de PKG en la médula espinal lumbar 96 horas después de la estimulación nociva que se bloqueó por la administración de un inhibidor NOS neuronal, un inhibidor GC soluble y un antagonista del receptor de NMDA.

Sin embargo, aunque Tao y Johns pretenden abordar el mecanismo de la hiperalgesia inflamatoria del sistema nervioso central, antes de la presente invención seguía existiendo la necesidad de determinar el mecanismo del dolor, y en particular, dolor crónico e hiperexcitabilidad de larga duración, en las neuronas sensoriales del sistema nervioso periférico.

La necesidad de abordar el mecanismo del dolor en el sistema nervioso periférico es importante por varias razones, la primera de ellas es la accesibilidad a los fármacos. El sistema nervioso central está secuestrado del resto del cuerpo por la barrera hematoencefálica, que se crea mediante uniones estrechas entre las células endoteliales del sistema nervioso central e impide que muchos fármacos terapéuticos alcancen el sistema nervioso central. Debido a la permeabilidad extremadamente limitada de la barrera hematoencefálica, el tratamiento de la hiperalgesia espinal según Tao y Johns sería problemático. La capacidad, según la presente invención, para tratar el aspecto de la hiperalgesia primaria del dolor mediante la administración de agentes al sistema nervioso periférico, que no tiene los mismos problemas de permeabilidad, confiere una ventaja sustancial.

Una segunda razón por la que el tratamiento de los mecanismos del dolor periférico es importante, es que el sistema nervioso periférico es el portal de la percepción del dolor. La ventaja que ofrece la presente invención es la de intervenir en el dolor subjetivo cuando aparece por primera vez, tal como en el contexto de un estímulo normalmente no doloroso que produce la percepción de dolor como resultado de una hiperexcitabilidad de larga duración (LTH). El dolor subjetivo puede desencadenarse en personas que padecen dolor crónico mediante estímulos – tal como un toque ligero de una sábana o una brisa pasajera - que normalmente no serían dolorosos. La presente invención se dirige a esta primera etapa de la ruta del dolor.

3. Resumen de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de una nueva ruta molecular implicada en la hiperexcitabilidad de larga duración de las neuronas sensoriales en el sistema nervioso periférico, que, en animales superiores, se asocia a dolor persistente. Se basa en el descubrimiento de que, después de la lesión de un axón de una neurona sensorial, un aumento en la actividad de la óxido nítrico sintasa ("NOS") produce un aumento en la producción de óxido nítrico ("NO"), que a su vez activa a la guanilil ciclasa ("GC"), lo que aumenta los niveles de guanosín monofosfato cíclico ("cGMP"). El aumento del cGMP produce la activación de la proteína quinasa G ("PKG"), que después se transporta de forma retrógrada a lo largo del axón al cuerpo de la célula neuronal, donde fosforila a la proteína quinasa erk activada por mitógeno ("MAPKerk"). Después, la MAPKerk activada se transloca en el núcleo celular, donde modula la expresión de los genes relacionados con el dolor.

En diversas realizaciones, la presente solicitud desvela métodos y composiciones para inhibir y/o tratar la hiperexcitabilidad de larga duración y/o el dolor persistente en un sujeto que padece hiperalgesia primaria (sistema nervioso periférico), que comprende administrar al sujeto, un agente que inhiba una etapa en la ruta anterior. En realizaciones particulares, el agente se administra de forma que se suministra a una neurona sensorial en un ganglio de la raíz dorsal. En realizaciones específicas, el agente comprende un péptido que facilita el transporte retrógrado desde la periferia a un cuerpo celular sensorial neuronal. La presente solicitud desvela ensayos que pueden utilizarse para identificar moléculas que pueden modular (inhibir o promover) etapas en esta ruta y, por lo tanto, modular la hiperexcitabilidad de larga duración y/o la percepción del dolor.

La presente solicitud desvela un gen PKG clonado de *Aplysia californica*, su proteína codificada y sus homólogos, y anticuerpos dirigidos hacia la proteína purificada.

4. Breve descripción de las figuras

Figura 1A-D, A, Parte superior, diagrama esquemático de apPKG que muestra la posición de los dominios de unión del cGMP en tándem conservados, los sitios de unión de ATP y catalítico, y la posición de una secuencia autoinhibidora. Parte inferior, alineación de secuencia Clustal W de la secuencia de aminoácidos de apPKG prevista con las PKG de DG1 (número de registro de GenBank AAB03405; SEQ ID NO: 52) y DG2T3a (AAA28459; SEQ ID NO: 53) de *Drosophila*, I α humana (BAA08297; SEQ ID NO: 54) y II (CAA64318; SEQ ID NO: 55), I β de ratón (AAD16044; SEQ ID NO: 56) y II (AAA02572; SEQ ID NO: 57) y rata II (CAA85284; SEQ ID NO: 58). Los aminoácidos conservados se indican en negrita; los aminoácidos similares se indican en gris claro. B, análisis filogenético de la familia PKG. C, Expresión de apPKG en neuronas. Una transferencia de Northern de tejido múltiple se hibridó con un fragmento de ADNc de apPKG N terminal marcado con ³²P. La flecha indica el ARNm de apPKG. Los tamaños de los patrones de ARN se indican a la izquierda de la figura. Se utilizó una sonda marcada con ³²P para el ARN ribosómico 5S (flecha) para asegurar la uniformidad de carga. D, localización del ARNm de apPKG en ganglios pleurales y pedales por hibridación *in situ* con un ARN antisentido marcado con digoxigenina (izquierda) o ARN en sentido (derecha). El ARNm de apPKG se expresa en el grupo sensorial pleural (flecha). Barra de escala 200 μ m.

Figura 2A-C. La apPKG es una PKG de tipo I. A, La actividad quinasa de la proteína apPKG recombinante inactiva purificada (100 ng) se midió mediante la transferencia de ³²P de [³²P]ATP al sustrato BPDEtido en presencia (+) o en ausencia (-) de 8-Br-cGMP 100 nM. La actividad causada por la autofosforilación se sustrajo utilizando una reacción de control peptídica (véase Materiales y Métodos). Tenga en cuenta que la actividad de la quinasa se inhibió en presencia de 10 μ M de inhibidor de PKG, Rp-8-pCPT-cGMPS (Rp-G). B, Actividad quinasa de apPKG recombinante activa (25 ng) y PKG de bovino de tipo I α (bPKG1 α) (50 ng) en presencia de cuatro sustratos peptídicos PKG de tipo I: péptidos A, RKISASGP (SEQ ID NO: 21); B, RKISASEFDRPLR (SEQ ID NO: 22; BPDEtido); y D, RKRSRAE (SEQ ID NO: 23; H2Btido). El péptido C, QKRPRRKDTP (SEQ ID NO: 24), es un sustrato de PKG de tipo II. C, apPKG fosforila a VASP recombinante en la serina-239. La VASP-GST recombinante purificada (0,5 μ g) se incubó con la apPKG activa (100 ng) o con la PKG bovina recombinante (50 ng), o solo en el tampón de quinasa, a temperatura ambiente durante 20 min. Después de SDS-PAGE, se exploró una transferencia de Western con un anticuerpo anti-fosfo-VASP (Ser 239) (p-VASP S239).

Figura 3A-B. A, expresión de la proteína apPKG en el sistema nervioso. Parte superior, se exploró una transferencia de Western (10 μ g de proteína por carril) con el anticuerpo Ab (*antibody*) de apPKG generado contra un péptido N terminal de la proteína apPKG. Carril, 1 ganglios pedales; carril 2, ganglios pleurales; carril 3, axoplasma extruido de nervios periféricos; carril 4, músculo de la pared corporal; carril 5, masa bucal; carril 6, genitales; carril 7, apPKG recombinante. Las dos señales específicas de apPKG se indican con flechas. Parte inferior, la transferencia se eliminó y volvió a explorarse con un anticuerpo la α -actina para indicar la carga de proteínas. Las posiciones de los marcadores de masa molecular en kilodalton se indican a la izquierda. B, la apPKG se expresa en las neuronas sensoriales de *Aplysia*. Microscopía confocal de una sección óptica de 2 μ m tomada de una serie Z a través del grupo sensorial pleural expuesto al Ab apPKG 24 h después del aplastamiento del nervio *in vivo*. Se muestran imágenes representativas de grupos sensoriales contralaterales (CC, *contralateral clusters*) no lesionados y lesionados de secciones en el centro de la neurona para mostrar el núcleo. Un grupo sensorial lesionado teñido en presencia de un segundo Ab solo muestra la tinción de fondo. Barra de escala, 20 μ m. Aunque la tinción es principalmente en el citoplasma, también se tiñe el núcleo de algunas neuronas. Ha de tenerse en cuenta que el patrón de tinción de apPKG

es esencialmente idéntico entre los grupos sensoriales contralaterales no lesionados y lesionados.

Figura 4A-C. La actividad de apPKG aparece en el ganglio pleural después de un retraso tras el aplastamiento del nervio. A, Los nervios periféricos p5-p9 se aplastaron en un lado. En los momentos indicados, los ganglios pleurales (cuadrados blancos/grises) y pedales (cuadrados punteados/negros) se recogieron de los lados lesionados (negro/gris) y de control contralateral (CC) (blanco/punteado) y se analizaron para determinar la actividad de apPKG utilizando BPDEtido como sustrato en presencia del inhibidor 6-22 amida, específico de PKA. La actividad de apPKG en cada punto se corrigió para autofosforilación y se normalizó a la actividad de apPKG total obtenida mediante la adición de 8-Br-cGMP 1 M a una muestra por duplicado. La actividad relativa de apPKG fue la relación entre la actividad de apPKG de cada muestra y la actividad basal de apPKG en una muestra de un animal sin tratamiento previo. Seis animales fueron examinados independientemente en cada punto de tiempo. El ANOVA de dos vías con medidas repetidas mostró efectos significativos de axotomía, el tiempo y su interacción en los ganglios pleurales ($p < 0,001$ en cada caso). B, la apPKG se activa y transporta de manera retrógrada después de lesión. Los nervios p5-p9 se aplastaron y se ligaron. Veinticuatro horas después, el axoplasma se extruyó desde el sitio del aplastamiento (Ap), desde el sitio del aplastamiento/ligadura (Ap/Lig) y desde el sitio de la ligadura (sitio de Lig) en los nervios de control, como se indica en el esquema entre paréntesis. El axoplasma que contenía las mismas cantidades de proteína de cada segmento, se analizó para determinar la actividad de apPKG como se indicó en A. La línea indica el nivel de actividad basal de apPKG, determinado mediante el ensayo del axoplasma recogido de nervios no lesionados. Las barras de error representan \pm SEM (del inglés *standard error of the mean*, error típico de la media). Un asterisco indica una diferencia significativa en comparación con los grupos restantes ($p < 0,05$; ensayos ANOVA y Newman-Keuls). Un enriquecimiento de apPKG activa en el sitio del Ap/Lig es característico de señales positivas moleculares de lesión. C, la proteína apPKG se transporta de manera retrógrada después de la lesión. Los nervios periféricos se aplastaron y se ligaron como se indicó en B. Veinticuatro horas después, los nervios lesionados y de control se fijaron, se expusieron al anticuerpo (Ab) de apPKG y se procesaron para análisis inmunohistoquímico. Las secciones ópticas (2 μ m) a través de cada nervio se examinaron mediante microscopía confocal. Todas las imágenes tenían el mismo aumento y se tomaron después de exposiciones idénticas al haz confocal. Cada imagen se alineó en la misma dirección; los cuerpos celulares (*somata*) centrales están a la izquierda del segmento mostrado. 1, Segmento de un nervio de un animal no lesionado. 2, Segmento que contiene el sitio de Lig (flecha) en un nervio contralateral a la lesión. 3, Segmento del nervio que contiene el sitio de Ap (flecha), que se ha expandido durante las 24 h. 4, Segmento del nervio que contiene el sitio de Ap/Lig (flecha). 5, Segmento del nervio expuesto al segundo anticuerpo solamente. Barra de escala, 20 μ m para todas las imágenes.

Figura 5A-B. Las SN desarrollan una LTH *in vitro*. Las propiedades eléctricas de las SN después del tiempo *in vitro* se compararon con las de las SN de control en el grupo sensorial *in vivo* (d 0). A, Parte superior, un solo potencial de acción representativo generado en respuesta a un pulso despolarizante de 20 ms que muestra el aumento en la amplitud del pico después de 7 d *in vitro*. Parte inferior, descarga de potencial de acción en respuesta a un pulso de ensayo intracelular normalizado de 1 s. Tenga en cuenta el disparo repetitivo en las neuronas después de 7 d *in vitro*. B, Datos que comparan la duración del pico, la amplitud del pico, el umbral del pico y el disparo repetitivo de las SN de control (barras grises) con los de 2-7 d *in vitro* (barras blancas). Cada barra contiene el número de células examinadas. Las barras de error representan \pm SEM. Un asterisco indica diferencia significativa con respecto al valor *in vivo* ($p < 0,01$; ensayos ANOVA y Newman-Keuls).

Figura 6A-D. La inhibición de NOS, sGC o apPKG impide la inducción de LTH en las SN *in vitro*. Las SN se retiraron del grupo y se cultivaron *in vitro* en presencia de Rp-8-pCPT-cGMPS (RpcGMPS), Rp-8-pCPT-cAMPS (RpcAMPS) u ODQ (todos a 10 μ M). Como control (C), otras SN retiradas al mismo tiempo no se expusieron a ningún inhibidor. A, B, el tercer día *in vitro*, 12 SN expuestas a RpcGMPS, Rp-cAMPS u ODQ, y 12 SN de control se atravesaron con un microelectrodo para evaluar el disparo repetitivo en respuesta a la estimulación en tres corrientes de ensayo (A) y para determinar el umbral del pico (B). El tercer día se examinaron las células, y no más tarde, para evitar una exposición más prolongada a los fármacos. El ANOVA de dos vías con medidas repetitivas mostró que tanto Rp-cGMPS como ODQ redujeron significativamente el disparo repetitivo generado por las corrientes de ensayo de 2 y 3 nA en relación con los controles. Las barras de error indican SEM y los asteriscos indican significación ($p < 0,0001$ en cada caso). De manera similar, Rp-cGMPS y ODQ impidieron significativamente la disminución inducida por lesión en el umbral en comparación con 4 células C (ensayos ANOVA y PLSD (diferencia mínima significativa) de Fisher; $p < 0,05$). Hubo una variabilidad considerable en el umbral en presencia de Rp-cAMPS y la diferencia media con respecto a los controles no fue significativa. C, Detección de ARNm de nNOS en SN individuales mediante RT-PCR. Los fragmentos de longitudes apropiadas se amplificaron con series de cebadores para apnNOS, sensorina A y la isoforma de actina específica de neurona de cinco series distintas de muestras de SN *in vivo* (0) o después de 16 h *in vitro*. El tamaño de los fragmentos sintetizados detectados por tinción con bromuro de etidio en geles de agarosa al 2 % fue idéntico al de los previstos a partir de secuencias conocidas en la base de datos. Adicionalmente, los productos de la PCR se verificaron mediante análisis de secuencia de ADN. Finalmente, no hubo amplificación en ausencia de transcriptasa inversa, lo que indica que las preparaciones de ARN no estaban contaminadas con ADN genómico (panel inferior). Las posiciones de los marcadores moleculares se indican a la izquierda. D, Efectos de los inhibidores de NOS sobre LTH. L-Tiocitrulina (50 μ M) y L-NAME (1 mM) se utilizaron como se describe anteriormente. n, Número de SN. Los datos se normalizaron a la excitabilidad promedio de las células de control en la misma preparación. El asterisco indica significación ($p < 0,001$), comparando LTH con y sin inhibidor mediante ensayo ANOVA y de Dunnett. Las barras de error indican SEM.

Figura 7A-F. A, Activación de apMAPK en los ganglios pleurales después del aplastamiento del nervio. Parte superior izquierda, veinticinco microgramos de un lisado de ganglios pleurales recogidos en los momentos indicados después del aplastamiento de los nervios p5-p9 se resolvieron mediante SDS-PAGE y se exploró una transferencia de Western con el Ab pTpYmapk para detectar las ERK-MAPK activas. El anticuerpo reconoció una quinasa de 43 kDa cuya actividad se incrementó en el lado lesionado (I) en relación con el control contralateral (CC) 16 h y más tarde después de la lesión. Parte inferior izquierda, la quinasa activada por lesión fue apMAPK. La transferencia se eliminó y se exploró con el anticuerpo D8, que reconoce a la apMAPK tanto activa como inactiva. D8 reconoció la misma proteína de 43 kDa que fue reconocida por el anticuerpo pTpY. A la derecha, la MAPK pTpY relativa se determinó por densitometría (Sung *et al.*, 2003). Todos los valores se normalizaron a niveles de apMAPK total. Se presenta la relación entre la intensidad de MAPK pTpY normalizada en cada momento y el control sin tratamiento previo normalizado. El valor del control sin tratamiento previo se estableció arbitrariamente en 1,0. El análisis de Western en esta figura se realizó con el mismo material utilizado para evaluar la actividad apPKG en la Figura 4 A. Los valores de apMAPK representan un promedio de seis animales. La línea indica el nivel basal de la actividad de apMAPK de animales sin tratamiento previo. Cada uno de los siguientes experimentos (B-E) se repitió al menos dos veces, y se muestran resultados representativos. B, la apPKG fosforila a la apMAPK endógena en neuronas, pero no en el axoplasma, *in vitro*. Parte izquierda, se retiraron las neuronas de los ganglios pleurales de un animal no lesionado, se preparó un lisado y se incubaron 25 µg con 100 ng de proteína apPKG activa o con 1 µM de 8-Br-cGMP en presencia o en ausencia de 10 µM de U0126. Parte derecha, se incubaron veinticinco microgramos de axoplasma con apPKG activa como se ha indicado anteriormente. Se detectó apMAPK activa mediante inmunotransferencia con el anticuerpo de pTPYmapk. C, la apPKG fosforila la serina-383 en Elk1. Cien nanogramos de apPKG y 0,5 µg de proteína Elk1 recombinante purificada se incubaron con 5 µg del lisado neuronal pleural o con 0,2 µg de ERK2 recombinante purificada. La Elk1 fosforilada (p-Elk1) se detectó explorando una transferencia Western con un anticuerpo que reconoce la Ser 383 fosforilada. D, Fosforilación directa de ERK2 en T183 por apPKG. Se incubaron doscientos nanogramos de ERK2 recombinante con 100 ng de apPKG en presencia o en ausencia de 1 µg de BPDEtido. La mezcla de reacción se dividió en tercios, se preparó una transferencia de Western de cada uno de ellos y se detectó ERK2 con Ab^{pTpYmapk} (parte superior), Ab^{PYmapk} (parte central) y Ab^{pTmapk} (parte inferior), respectivamente. E, Activación relativa de ERK2 por apPKG y MEK1. Se utilizaron cien nanogramos de apPKG, la subunidad catalítica de MEK1 y MEK1 como se indica y la producción de fosfo-Elk1 se midió con Ab^{pElk1} como se muestra en C. F, La lesión del nervio aumenta el nivel de apMAPK pY en el cuerpo celular de neuronas lesionadas (I) en relación con las neuronas del control contralateral (CC). Se exploró una transferencia Western preparada utilizando 25 µg de un lisado neuronal pleural, recogido en los momentos indicados después del aplastamiento de los nervios p5-p9, con el anticuerpo mono-específico pY, Ab^{pYmapk} seguido de D8 para detectar la apMAK total como en A. La transferencia muestra los resultados de dos animales para cada punto. N, Lisado del animal sin aplastamiento de nervios.

Figura 8A-B. A, la apPKG no entra en el núcleo de las SN. Se microinyectaron las mismas cantidades de BSA, apPKG o ERK1 marcados con Alexa Fluor 546, en el citoplasma de las SN después de 2 d *in vitro*. Las neuritas se cortaron después con una aguja fina para provocar una respuesta a la lesión y 30 min más tarde, las células se examinaron por microscopía confocal. La imagen es una sección óptica de 2 µm a través del centro de la célula que muestra el núcleo. Barra de escala, 20 µm. B, Rp-8-pCPT-cGMPs inhibe la translocación nuclear de apMAPK inducida por axotomía. Las SN no tratadas como controles y las expuestas a 10 µM de Rp-8-pCPT-cGMPs (Rp-cGMPs) o Rp-cAMPs durante 2 d *in vitro* se inmunotñeron con el anticuerpo D8 para localizar la apMAPK. Parte superior, ejemplos representativos de secciones ópticas de 2 µm de las SN de control y las expuestas a Rp-8-pCPT-cGMPs o Rp-cAMPs. Barra de escala, 20 µm. Parte inferior, Histograma del valor del medio de la inmunorreactividad de MAPK nuclear. La intensidad de la tinción la determinó una persona que desconocía el tratamiento que recibían las células. n, Número de células para cada tratamiento. El asterisco indica una diferencia significativa con respecto al control (p<0,05 mediante ensayos ANOVA y Newman-Keuls).

Figura 9. La actividad relativa de PKG en varias posiciones del nervio ciático en relación con el punto de lesión se muestra esquemáticamente sobre la gráfica.

Figura 10A-C. A. Balanol-7R; B. 10" desoxibalanol; C. 14" descarboxibalanol.

Figura 11A-B. Dermatomas superficiales. A. vista frontal, B. vista posterior.

55 5. Descripción detallada de la invención

Para mayor claridad de la descripción, y no como limitación, esta sección se divide en las siguientes subsecciones.

- (i) la ruta NO/cGMP/PKG
- (ii) ensayos para identificar moduladores de la ruta NO/cGMP/PKG; y
- (iii) modulación de la ruta NO/cGMP/PKG;
- (iv) modulación de las rutas del dolor utilizando mecanismos de transporte neuronal retrógrado; y
- (v) apPKG.

65

5.1. La ruta NO/cGMP/PKG

La presente invención proporciona un modelo para la inducción de LTH y/o de dolor persistente en el que la lesión nerviosa activa a la óxido nítrico sintasa neuronal ("nNOS") en el axón, lo que conduce a la producción de NO, lo que produce la activación de la guanilil ciclasa ("GC") soluble, a la formación de guanosín monofosfato cíclico ("cGMP") y a la activación de la proteína quinasa G ("PKG"). La PKG activada se transporta de forma retrógrada al cuerpo celular de las neuronas sensoriales (SN), donde activa a la MAPK-erk en el citoplasma, que después entra en el núcleo y activa la transcripción de genes responsables de la aparición de LTH y/o del dolor persistente.

La hiperexcitabilidad de larga duración ("LTH") (*por sus siglas en inglés Long-term hiperexcitability*), como se define en el presente documento, es el aumento de la sensibilidad de un axón o cuerpo celular de una neurona sensorial frente a un estímulo. Durante las pruebas electrofisiológicas, la LTH se manifiesta como una disminución en el umbral pico, un aumento en el disparo repetitivo, picos más amplios y/o un aumento en la amplitud del pico. En los animales que perciben dolor, la LTH se asocia a dolor persistente (véase Sung y Ambron, 22 de marzo de 2004).

Las pruebas electrofisiológicas pueden realizarse utilizando métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo específico no limitativo de pruebas electrofisiológicas utilizando neuronas sensoriales de *Aplysia californica* (en adelante "*Aplysia californica*" o simplemente "*Aplysia*") puede realizarse de la siguiente manera (véase Liao *et al.*, 1999). Pueden efectuarse registros intracelulares de cuerpos celulares de SN con microelectrodos de vidrio rellenos de acetato de potasio 3 M (resistencia de electrodo 8-20 M). Los registros pueden efectuarse a 19-21 °C mientras que la preparación se baña en agua de mar artificial ("ASW", *artificial sea water*) tamponada, medio L15 o una mezcla 1:1 de ASW y L15, a un pH de 7,6. El umbral del pico del pericarion puede medirse con una serie estándar de pulsos de despolarización de 20 ms. El disparo repetitivo (acomodación del pico) puede cuantificarse contando el número de picos generado por un pulso de despolarización intracelular de 1 s utilizando 2,5 veces la corriente de umbral determinada con el pulso de 20 ms. El disparo repetitivo puede examinarse, por ejemplo, contando el número de picos generado por una serie de pulsos de despolarización de 1 s a 1,25, 2,5 y 5 veces la corriente de umbral, o por 1, 2, 3 y 5 nA. La resistencia de entrada (*R_{in}*, *input resistance*) puede determinarse a partir del cambio de tensión producido durante la inyección de un pulso hiperpolarizante de 1 s (0,5 nA). La excitabilidad del axón puede analizarse pasando corriente entre dos compartimentos a través de una abertura estrecha, sellada con vaselina, que contiene los nervios p7, p8 y p9. El umbral puede determinarse con una serie rápida de pulsos de 2 ms. El disparo repetitivo puede analizarse aplicando dos pulsos de 1 s a 0,4 y 0,8 veces la corriente de umbral de 2 ms.

El dolor persistente incluye un dolor que dura más que el periodo de lesión agua, e incluye síndromes de dolor crónico tal como dolor neuropático (véase Bennett *et al.*, 2005). En realizaciones específicas no limitativas, la duración del dolor persistente es de al menos 1 día, de al menos una semana, de al menos un mes o de al menos un año.

5.2. Ensayos para identificar moduladores de la ruta NO/cGMP/PKG

La presente invención desvela ensayos que identifican moduladores (inhibidores o promotores/inductores) de la ruta NO/cGMP/PKG. Dichos ensayos pueden utilizarse para evaluar a un agente de ensayo para determinar si el agente de ensayo es un agente que modula al menos una etapa de la ruta y por lo tanto modular la LTH. Se puede utilizar un inhibidor de la ruta para inhibir la LTH y se puede utilizar para inhibir y/o tratar el dolor persistente en una neurona sensorial y/o en un sujeto. El término "inhibir", como se usa en el presente documento, significa disminuir, retrasar o prevenir. Para desarrollar un sistema de modelo de dolor persistente, puede utilizarse un promotor/inductor de LTH, preferentemente en un animal, tal como *Aplysia*, que se cree que no siente dolor de una manera subjetiva.

Los ensayos de la presente solicitud utilizan un sistema modelo que comprende una neurona sensorial de ensayo ("TSN", *test sensory neuron*) en condiciones fisiológicas que al menos se aproximan al entorno *in vivo* en el que se encuentra de manera natural la neurona sensorial. La TSN comprende un cuerpo celular que contiene el núcleo, así como un segmento axonal, que constituye al menos una parte del axón de la TSN y, más preferentemente, que constituye el axón completo. En determinadas realizaciones no limitativas, la TSN es una SN de *Aplysia*. En otras realizaciones no limitativas, la TSN es una SN de vertebrado, preferentemente una SN de mamífero. La TSN puede conservarse aislada en un cultivo, como parte de un grupo de neuronas que pueden ser o no todas las SN, o como un nervio extraído o una sección extraída del mismo (por ejemplo, un segmento extirpado del nervio ciático de rata). En realizaciones alternativas, la TSN puede mantenerse *in vivo* en un animal. En otras realizaciones no limitativas adicionales, el segmento axonal puede contener al menos una ligadura.

La TSN está lesionada. Por ejemplo, y no como limitación, la lesión puede crearse mediante aplastamiento, corte y/o realizando una lesión química de la TSN utilizando métodos conocidos en la técnica. Otros métodos incluyen inducir una respuesta inflamatoria, isquemia, una reducción del suministro sanguíneo a las neuronas, e hiperglucemia.

En los ensayos de la solicitud, a la TSN se le administra un agente de ensayo, ya sea antes, junto con, o después de una lesión, ya sea en un medio de cultivo administrado por vía sistémica, inyectado localmente, o inyectado directamente o introducido de otra manera en la TSN. En realizaciones no limitativas, el agente de ensayo puede administrarse en un lugar concreto de la célula de la TSN, tal como el cuerpo celular o el axón. Preferentemente, los efectos del agente de ensayo sobre la TSN se comparan con valores comparables en una SN de control ("CSN"), tal

como una CSN lesionada. A partir de entonces, se realiza una de las siguientes etapas de evaluación. En realizaciones específicas no limitativas, las etapas de evaluación se realizan a las 48 horas de producirse la lesión.

5 El ensayo de la presente solicitud determina si el agente modula la actividad de la óxido nítrico sintasa ("NOS", que preferentemente es nNOS, pero también puede ser eNOS y/o iNOS) en una TSN lesionada, preferentemente en relación con la actividad de NOS en una CSN lesionada a la que no se la ha administrado un agente de ensayo. Una capacidad para inhibir el aumento de la actividad de NOS (preferentemente nNOS) asociada a una lesión en la NS indica que el agente de ensayo es un inhibidor de LTH. Una capacidad para promover un aumento adicional en la actividad de NOS en relación con los valores de control indica que el agente de ensayo es un promotor de LTH. La actividad NOS puede medirse, por ejemplo, y no como limitación, midiendo ya sea la cantidad de ARNm de nNOS, la cantidad de proteína nNOS, o la cantidad producida de óxido nítrico ("NO"). Por ejemplo, el ARNm de nNOS puede medirse mediante amplificación por PCR, utilizando cebadores tales como oligonucleótidos que tienen las SEQ ID NO: 15 y 16, mencionadas a continuación, o por hibridación *in situ*, utilizando una sonda oligonucleotídica complementaria marcada de forma detectable. Por ejemplo, la proteína nNOS puede medirse mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo (policlonal o monoclonal) específico para nNOS, marcado de manera detectable. Por ejemplo, la cantidad producida de NO puede medirse, y cuando la cantidad de material celular es suficiente, midiendo la conversión de L-[¹⁴C] arginina a L-[¹⁴C]-citrulina como se describe en Smith *et al.*, 2002.

20 El ensayo de la presente solicitud determina si el agente modula la actividad de la guanilil ciclasa ("GC") en una TSN lesionada, preferentemente en relación con la actividad de la GC en una CSN lesionada a la que no se la ha administrado el agente de ensayo. Una capacidad para inhibir el aumento en la actividad de GC asociada a una lesión de SN indica que el agente de ensayo es un inhibidor de LTH. Una capacidad para promover un aumento adicional en la actividad de GC en relación con los valores de control indica que el agente de ensayo es un promotor de LTH. La actividad de GC puede medirse, por ejemplo, y sin limitación, midiendo ya sea la cantidad de ARNm de GC, la cantidad de proteína GC o la cantidad producida de cGMP. Por ejemplo, el ARNm de GC puede medirse por amplificación mediante PCR, utilizando cebadores diseñados en función de la secuencia de ácido nucleico de GC, y la proteína de GC puede medirse mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo (policlonal o monoclonal) específico para GC marcado de manera detectable. Como un ejemplo no limitativo, cuando el volumen de material celular es apropiado, la actividad de GC puede medirse mediante una modificación del método expuesto en Mo *et al.*, 2004. Por ejemplo, puede llevarse a cabo la lisis de una TSN utilizando una concentración 2 veces mayor de tampón de lisis que contenga ditiotreitól 200 µM e inhibidor de proteasa sin EDTA, y la mezcla puede someterse a ultrasonido y mantenerse y conservarse en hielo. La TSN lisada puede someterse a ensayo en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) complementado con MgCl₂ 3 mM, EGTA 0,1 mM, albúmina de suero bovino al 0,05 % (p/v), 3-isobutil-1-metilxantina 1 mM, creatina fosfato 5 mM, creatina fosfoquinasa 200 µg/ml, GTP 300 µM, 1000 unidades/ml de superóxido dismutasa, ácido úrico 300 µM y cPTIO (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolino-1-oxil-3-óxido) 200 µM. Se añadió SPER/NO (N-4-1-3-aminopropil-2-hidroxi-2-nitrosodiazirino butil-1,3-propano-diamina) y se pueden retirar alícuotas inactivadas a diversos intervalos, y analizar el cGMP. Por ejemplo, cuando la cantidad de material celular es suficiente, la cantidad de cGMP producida puede medirse mediante un ensayo de quimioluminiscencia (HitHunter, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, N.J.).

40 El ensayo de la presente solicitud determina si el agente modula la actividad de la proteína quinasa G ("PKG") en una TSN lesionada, preferentemente en relación con la actividad PKG en una CSN lesionada a la cual no se la ha administrado el agente de ensayo. Una capacidad para inhibir el aumento en la actividad de PKG asociada a una lesión de SN indica que el agente de ensayo es un inhibidor de LTH. Una capacidad para promover un aumento adicional en la actividad de PKG en relación con valores de control indica que el agente de ensayo es un promotor de LTH. La actividad de PKG puede medirse, por ejemplo, y no como limitación, midiendo la actividad de la quinasa en un extracto de SN. Por ejemplo, la cantidad de actividad de PKG en un extracto de SN puede determinarse midiendo la capacidad del extracto para transferir ³²P de [³²P]-ATP al BPDEtido (Calbiochem, La Jolla, CA).

50 El ensayo de la presente invención determina si el agente modula el transporte de la proteína quinasa G ("PKG") en una TSN lesionada, preferentemente en relación con el transporte de PKG en una CSN lesionada a la que no se la ha administrado el agente de ensayo. Una capacidad para inhibir el transporte de PKG asociado a una lesión de SN indica que el agente de ensayo es un inhibidor de LTH. Una capacidad para promover un aumento adicional en el transporte de PKG en relación con los valores de control indica que el agente de ensayo es un promotor de LTH. El transporte de PKG puede medirse, por ejemplo, y no como limitación, determinando si un aumento en la actividad de PKG cambia con el tiempo desde la región de la SN que está lesionada hacia el cuerpo celular. Este aumento puede medirse mediante diversos métodos, incluyendo, entre otros, ensayos secuenciales de segmentos axonales, distales a proximales, para determinar la actividad de PKG (véase Figura 9). En otro ejemplo no limitativo, el segmento axonal puede estar ligado y el material axonal puede recogerse de regiones del axón a diferentes distancias relativas de la lesión y/o la ligadura donde, por ejemplo, la cantidad de PKG activada en la región de la lesión disminuye con el tiempo en relación con la cantidad de actividad de PKG en el lado de la ligadura orientada a la lesión (véase la Figura 4).

65 El ensayo de la presente solicitud determina si el agente modula la fosforilación de la proteína quinasa-erk activada por mitógeno ("MAPKerk") en una TSN lesionada, preferentemente en relación con la fosforilación de MAPKerk en una CSN lesionada a la que no se la ha administrado el agente de ensayo. Una capacidad para inhibir la fosforilación de MAPKerk asociada a una lesión en SN indica que el agente de ensayo es un inhibidor de LTH. Una capacidad para

promover un aumento adicional en la fosforilación de MAPKerk con respecto a los valores de control indica que el agente de ensayo es un promotor de LTH. La fosforilación de MAPKerk puede medirse determinando el nivel de actividad de MAPKerk en la fosforilación de su sustrato, o detectando la presencia de MAPKerk fosforilada utilizando un anticuerpo que se una selectivamente a la proteína fosforilada en lugar de a la proteína no fosforilada (por ejemplo, pero sin limitación el anticuerpo Ab^{pTyMapk}).

El ensayo de la presente solicitud determina si el agente modula la translocación de MAPKerk en el núcleo de una TSN lesionada, preferentemente con relación a la translocación de MPAKerk en el núcleo de una CSN lesionada a la cual no se la ha administrado el agente de ensayo. Una capacidad para inhibir la translocación de MAPKerk en el núcleo asociada a una lesión en SN indica que el agente de ensayo es un inhibidor de LTH. Una capacidad para promover un aumento adicional en la translocación de MAPKerk en el núcleo en relación con los valores de control indica que el agente de ensayo es un promotor de LTH. La translocación de MAPKerk en el núcleo puede medirse utilizando un anticuerpo específico de MAPKerk que mida la cantidad de MAPKerk en el núcleo de la SN utilizando técnicas de inmunohistoquímica de láser confocal.

5.3. Modulación de la ruta NO/cGMP/PKG

De acuerdo con la presente invención, la ruta NO/cGMP/PKG, y por lo tanto el desarrollo de LTH y de dolor persistente, puede modularse utilizando inhibidores desvelados en esta sección o promotores/inductores identificados o que tienen las propiedades expuestas en la sección 5.2 anterior. En realizaciones particulares, se puede administrar un inhibidor a una neurona sensorial que necesite dicho tratamiento en una cantidad eficaz para inhibir la LTH. Cuando la SN a la cual se la administra el inhibidor, es una SN *in vivo* en un sujeto animal, el inhibidor puede administrarse por vía sistémica (por ejemplo, por inyección intravenosa, administración oral, inhalación, etc.), puede inyectarse localmente (cerca del nervio dañado), puede aplicarse por vía tópica (por ejemplo, junto con un agente para mejorar la permeabilidad de la piel, tal como un compuesto químico o un estímulo eléctrico) o puede administrarse por cualquier otro medio conocido en la técnica, a excepción de la introducción en el sistema nervioso central, tal como la administración intratecal, que no se utilizaría para administrar un inhibidor a una SN. La cantidad de inhibidor a administrar puede determinarse utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, realizando estudios de respuesta a la dosis en uno o más sistemas modelo, tales como el sistema de *Aplysia* descrito anteriormente o un modelo de mamífero de dolor neuropático periférico, seguido de pruebas clínicas autorizadas en seres humanos. En cuanto a las concentraciones que se exponen a continuación, estas se refieren a la concentración a la que se expone la neurona sensorial o cualquiera de sus componentes, incluido el axón, el cuerpo celular o receptor.

En realizaciones relacionadas, a un sujeto que padece dolor crónico se le puede administrar una cantidad eficaz de un inhibidor. Preferentemente, el dolor crónico tiene un componente de hiperalgesia del sistema nervioso periférico (primario), donde el método inhibe el dolor mediado por el sistema nervioso periférico, pero en realizaciones específicas no limitativas, la presente invención también abarca el tratamiento de la hiperalgesia espinal como un componente de, o la base de (por ejemplo, dolor neuropático central crónico resultante de una lesión de la médula espinal) dolor crónico. Puede utilizarse cualquiera de los modos de administración anteriores, pero si debe tratarse un componente de hiperalgesia espinal, el inhibidor, que se dirige a una neurona que tiene su cuerpo celular en el sistema nervioso central y no en el ganglio de la raíz dorsal, debe administrarse por vía intratecal.

Una cantidad eficaz es una cantidad de inhibidor que disminuye el nivel de dolor percibido subjetivamente por el sujeto, preferentemente, en experimentos controlados, una cantidad determinada que es mayor que el efecto placebo. Por ejemplo, y no como limitación, en determinadas realizaciones de la invención, cuando el dolor percibido se puede cuantificar en una escala de 0 a 10, donde 0 significa que no hay dolor, 1-5 significa dolor leve progresivamente más intenso, 6-7 dolor moderado progresivamente más intenso, 8-9 dolor agudo progresivamente más intenso y 10 es el peor dolor posible, una cantidad eficaz de inhibidor puede disminuir la cuantificación del dolor percibido de la escala de dolor, en al menos 2 puntos, o en al menos 3 puntos.

La presente solicitud desvela un método para el tratamiento de dolor crónico en un sujeto, que comprende administrar, en el lugar en el que aparece el dolor, una cantidad eficaz de un inhibidor como se expone en el presente documento (como alternativa, denominado "inhibidor de LTH"), donde la administración puede ser por inyección local o aplicación tópica (por ejemplo, a través de una crema, una pomada o un dispositivo transdérmico, que puede ser un parche o puede ser un mecanismo, o un mecanismo que contenga o esté asociado de otra manera a un parche), y el lugar puede ser, como ejemplos no limitativos, un lugar donde hay una herida, un tejido que recubre una articulación inflamada o una zona dentro del dermatoma que está asociada al dolor percibido (por ejemplo, L4, L5, S1, C3, C4, C5, C6 o C7, véase más adelante).

5.3.1 Modulación de NOS

La presente solicitud desvela la inhibición de la ruta NO/cGMP/LTH, LTH y/o dolor persistente, mediante un método que comprende administrar, a una SN (que puede ser o no una SN *in vivo* en un sujeto), una cantidad eficaz de un inhibidor de NOS (preferentemente nNOS y/o eNOS y/o iNOS), tal como, pero sin limitación, L-NAME [clorhidrato de éster metílico de N^G-nitro-L-arginina], L-tiocitrulina, o un ácido nucleico antisentido o un ARNi que inhibe la expresión de NOS. Una molécula de ácido nucleico antisentido o un ARNi de este tipo puede hibridarse con la NOS diana en

condiciones de hibridación rigurosas, como se define más adelante.

5.3.2 Modulación de los niveles de NO

5 La presente solicitud desvela la inhibición de la ruta NO/cGMP/LTH, de LTH y/o de dolor persistente, mediante un método que comprende administrar, a una SN (que puede ser o no una SN *in vivo* en un sujeto), una cantidad eficaz de un agente que disminuye los niveles de NO, que incluye, entre otros, la quercetina (que es un depurador de NO (Griffiths *et al.*, 2003)).

10 5.3.3 Modulación de GC

La presente solicitud desvela la inhibición de la ruta NO/cGMP/LTH, de LTH y/o de dolor persistente, mediante un método que comprende administrar, a una SN (que puede ser o no una SN *in vivo* en un sujeto), una cantidad eficaz de un agente que inhibe el aumento en la actividad de GC, tal como, pero sin limitación, L-H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona ("ODQ"), o una molécula de ácido nucleico antisentido o un ARNi que inhibe la expresión de GC. Dicha una molécula de ácido nucleico antisentido o ARNi puede hibridarse con la GC diana en condiciones de hibridación rigurosas como se define más adelante.

20 5.3.4 Modulación de los niveles de cGMP

La presente solicitud desvela la inhibición de la ruta NO/cGMP/LTH, de LTH y/o de dolor persistente, mediante un método que comprende administrar, a una SN (que puede ser o no una SN *in vivo* en un sujeto), una cantidad eficaz de un agente que disminuye los niveles de cGMP, tal como, pero sin limitación, un agente que aumente la actividad fosfodiesterasa, preferentemente PDE5, tal como, pero sin limitación, la administración de la propia fosfodiesterasa (por ejemplo PDE5), o el activador de PDE5, Ant-cGMP-2'-O-antraniloil cGMP (guanósina 3', 5' monofosfato cíclico, 2'-O-antraniloil cGMP).

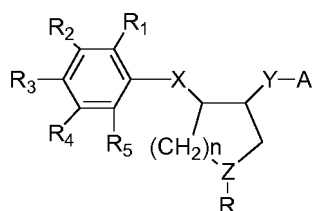
25 5.3.5 Modulación de la actividad de PKG

30 La presente solicitud desvela la inhibición de la ruta NO/cGMP/LTH, de LTH y/o de dolor persistente, mediante un método que comprende administrar, a una SN (que puede ser o no una SN *in vivo* en un sujeto), una cantidad eficaz de un agente que inhibe la actividad de PKG. El agente inhibe la PKG activada y/o su llegada desde el axón en un cuerpo celular neuronal.

35 El agente es un inhibidor peptídico de PKG. En Dostmann, 2000, se desvelan ejemplos no limitativos de inhibidores peptídicos de PKG, e incluyen un péptido que comprende las secuencias LRKKKKKH (SEQ ID NO: 26), LRAKKKKH (SEQ ID NO: 27), LRKAKKKH (SEQ ID NO: 28), LRKKAKKH (SEQ ID NO: 29), LRKKKAKH (SEQ ID NO: 30) o LRKKKKKH (SEQ ID NO: 31). En otras realizaciones, un inhibidor peptídico de PKG puede comprender una secuencia central, RKK o RKKK (SEQ ID NO: 32), y puede tener una longitud de entre aproximadamente 5 y 100, o de entre 5 y 40 50, o de entre 10 y 30, o de entre 10 y 20, aminoácidos.

Un inhibidor peptídico de PKG de acuerdo con la solicitud puede comprender además uno o más péptidos transportadores, uno o más péptidos portadores, o péptidos tanto transportadores como portadores, así como componentes peptídicos o no peptídicos adicionales que pueden mejorar el transporte, la eficacia y/o la estabilidad. Por lo tanto, la presente solicitud proporciona péptidos que comprenden inhibidor- Δ -portador, portador- Δ -inhibidor, inhibidor- Σ -transportador, transportador- Σ -inhibidor, portador- Δ -inhibidor- Σ -transportador y transportador- Σ -inhibidor- Δ -portador, siendo Δ y Σ péptidos enlazadores opcionales, siendo el portador un péptido portador, siendo el inhibidor un péptido inhibidor y siendo el transportador un péptido transportador, como se expone en el presente documento, en el que en realizaciones no limitativas el tamaño de todo el péptido tiene una longitud de entre 10 y 100, o de entre 10 y 50, o de entre 10 y 30, o de entre 10 y 20, aminoácidos. La presente solicitud desvela péptidos que comprenden LRKKKKKHXYGRKKRRQRRPP (SEQ ID NO: 33), YGRKKRRQRRPPXLRKKKKKH (SEQ ID NO: 34), LRKKKKKHXRQIKIWFQNRMMKWKK (SEQ ID NO: 35), RQIKIWFQNRMMKWKKXLRKKKKKH (SEQ ID NO: 36), LRKKKKKHZPKKKRK (SEQ ID NO: 37), PKKKRKZLRKKKKKH (SEQ ID NO: 38), YGRKKRRQRRPPXLRKKKKKHZPKKKRK (SEQ ID NO: 39), PKKKRKZLRKKKKKHXYGRKKRRQRRPP (SEQ ID NO: 40), RQIKIWFQNRMMKWKKXLRKKKKKHZPKKKRK (SEQ ID NO: 41), PKKKRKZLRKKKKKHXRQIKIWFQNRMMKWKK (SEQ ID NO: 42), siendo Δ y Σ moléculas enlazadores opcionales de entre 0 y 5, o de entre 0 y 10, o de entre 0 y 20, aminoácidos, cuyos péptidos pueden tener una longitud de entre 5 y 100, o de entre 5 y 50, o de entre 10 y 30, aminoácidos. La presente solicitud desvela inhibidores peptídicos que son al menos aproximadamente 90 o aproximadamente 94 por ciento homólogos a los péptidos citados anteriormente, según se determinó utilizando un programa informático estándar de evaluación de homología, tal como BLAST o FASTA, y que inhiben la PKG, y que pueden tener una longitud de entre aproximadamente 5 y 100, o de entre 5 y 50, o de entre 10 y 30, o de entre 10 y 20, aminoácidos. La concentración eficaz del inhibidor peptídico puede variar de entre 1 nanomolar y 10 micromolar.

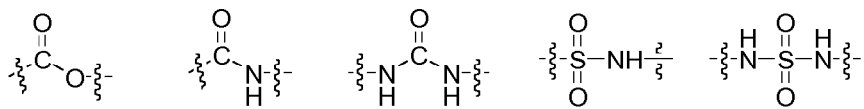
65 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un agente que tiene la fórmula I:



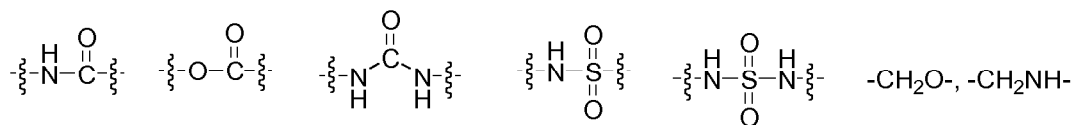
Fórmula I

en la que n es 1, 2 o 3; Z es N o CH;

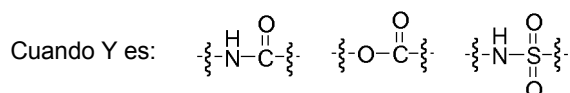
5 en la que X representa uno de los siguientes grupos funcionales:



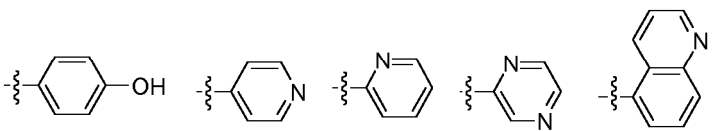
en la que Y representa uno de los siguientes grupos funcionales:



10 en la que A representa grupos arilo o heteroarilo no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino o halógeno, de manera que, donde A es un grupo arilo o heteroarilo,

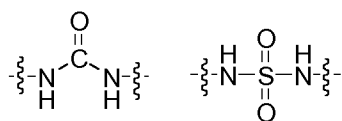


A es:

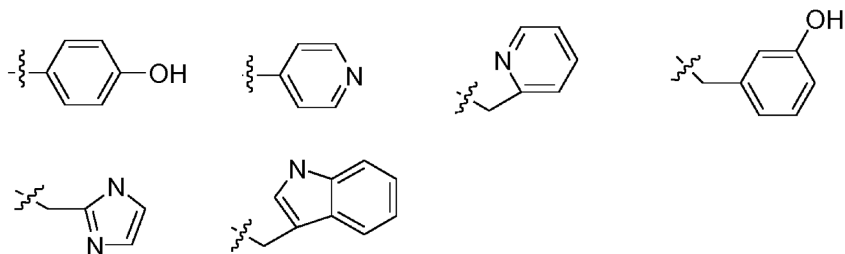


15 y

Cuando Y es:



A es:



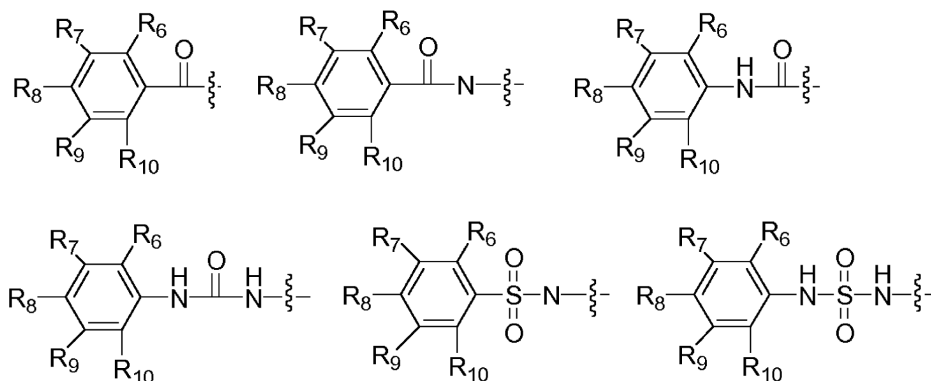
en la que R es hidrógeno, alquilo inferior, o amidino;

en la que R1, R2, R4, R5 es independientemente hidrógeno, hidroxilo, alcoxi inferior, amino o halógeno;

y

en la que R3 es alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, ariloxi, o un grupo seleccionado de los siguientes:

20



siendo R6-R10 independientemente hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno, trifluorometilo, carboxi, alcocarbonilo, amino, alquilamino, alquilcarbonilamino, alquilsulfonilamino (por ejemplo, CF₃SO₂NH-, CH₃SO₂NH-) y tetrazol;

5 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de dolor crónico en un sujeto que padece hiperalgnesia del sistema nervioso periférico, en el que el medicamento es para la administración a la neurona sensorial en un ganglio de la raíz dorsal.

10 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un agente de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de dolor crónico en un sujeto que padece hiperalgnesia del sistema nervioso periférico en el que el medicamento es para la administración a la neurona sensorial en un ganglio de la raíz dorsal.

15 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un agente de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de dolor crónico en el que el medicamento es para la administración al sistema nervioso central.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un agente de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de dolor crónico en el que el medicamento es para la administración al sistema nervioso central.

20 En una realización específica, no limitativa, el agente es balanol o una variante de balanol. Las variantes de balanol pueden seleccionarse del grupo que consiste en balanol-7R, 14-descarboxi-balanol, 10-desoxi-balanol, balanol ligado a un péptido transportador, una variante de balanol ligada a un péptido transportador, balanol ligado a un péptido portador, una variante de balanol ligada a un péptido portador, balanol ligado a un péptido transportador y a un péptido portador, y una variante de balanol ligada a un péptido transportador y a un péptido portador. En realizaciones no limitativas específicas, la concentración de balanol o de la variante de balanol administrada a la neurona, por ejemplo, a través de su axón, puede variar de entre aproximadamente 1 y 500 nM, o de entre aproximadamente 2 y 100 nM, dependiendo de la fuerza del compuesto.

30 En otra realización específica, no limitativa, el agente es Rp-8-pCPT-cGMPS. En una realización relacionada, el agente es Rp-8-pCPT-cGMPS conjugado con uno o más péptidos transportadores. En otra realización relacionada, el agente es Rp-8-pCPT-cGMPS conjugado con uno o más péptidos portadores. En otra realización adicional relacionada, el agente es Rp-8-pCPT-cGMPS conjugado con uno o más péptidos transportadores y con uno o más péptidos portadores (véase a continuación la definición de péptidos transportadores y portadores). En realizaciones específicas, no limitativas, la concentración de Rp-8-pCPT-cGMPS puede variar de entre 1 micromolar y 500 micromolar.

35 5.3.6 Modulación del transporte de PKG

40 La presente solicitud desvela la inhibición de la ruta NO/cGMP/LTH, de LTH y/o del dolor persistente, mediante un método que comprende administrar, a una SN (que puede ser o no una SN *in vivo* en un sujeto), una cantidad eficaz de un agente que inhibe el transporte de PKG.

45 En realizaciones no limitativas de la invención, un agente que inhibe el transporte de PKG puede comprender un péptido transportador, como se expone más adelante, en una cantidad eficaz para inhibir el sistema de transporte retrógrado axonal. En realizaciones específicas no limitativas, un agente que inhibe el transporte de PKG puede comprender una pluralidad de péptidos transportadores, por ejemplo, pero sin limitación, comprendidos en bucles de superficie de una molécula señuelo.

5.3.7 Modulación de la actividad MAPKerk

50 La presente solicitud desvela la inhibición de la ruta NO/cGMP/LTH, de LTH y/o del dolor persistente, mediante un método que comprende administrar, a una SN (que puede ser o no una SN *in vivo* en un sujeto), una cantidad eficaz de un agente que inhibe la activación (fosforilación) de MAPKerk. Dichas moléculas incluyen, pero sin limitación,

inhibidores de tirosina quinasa, tales como K252a y genisteína.

5.3.8 Modulación del transporte de MAPKerk

5 La presente solicitud desvela la inhibición de la ruta NO/cGMP/LTH, de LTH y/o del dolor persistente, mediante un método que comprende administrar, a una SN (que puede ser o no una SN *in vivo* en un sujeto), una cantidad eficaz de un agente que inhibe la translocación de MAPKerk en el núcleo, incluyendo, pero sin limitación, un antagonista de calcio tal como felopidina (Yang *et al.*, 2002), verapamil, diltiazem, nifedipina, etc. o apolipoproteína D (Sarjeant *et al.*, 2003).

10

5.3.9 Composiciones para el tratamiento del dolor

15 Las composiciones de la solicitud pueden comprender un agente inhibidor como se describe anteriormente, donde el agente inhibidor comprende opcionalmente una molécula portadora que facilita su translocación a través de una célula neuronal o membrana nuclear. Los ejemplos de moléculas portadoras que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación, la proteína tat del VIH-1 (YGRKKRRQRRPP; SEQ ID NO: 43) y péptidos que tienen una longitud de aproximadamente 9-30 o de aproximadamente 9-20 restos que comprenden en su secuencia central RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 44), el homeodominio Antennapedia de *Drosophila* (RQIKIWFQNRRMKWKK; SEQ ID NO: 45). Otras moléculas portadoras que pueden utilizarse pueden estar ampliamente comprendidas (contienen al menos un 60 por ciento, al menos un 70 por ciento, o al menos un 80 por ciento) de aminoácidos cargados positivamente, tales como arginina (Wendere *et al.*, 2000) y/o lisina (Mai *et al.*, 2002). La invención también incluye péptidos y péptidos derivatizados que son al menos aproximadamente 90 o aproximadamente 95 por ciento homólogos a los péptidos citados anteriormente, según se determina utilizando un programa informático estándar de evaluación de homología, tal como BLAST o FASTA. Opcionalmente, el agente inhibidor puede comprender de manera alternativa o adicional, un péptido transportador, como se describe a continuación.

20

La presente solicitud desvela dichos agentes inhibidores, ya sea en forma liofilizada o disueltos en un vehículo farmacéutico adecuado. En la solicitud se incluyen composiciones que comprenden más de un agente inhibidor.

30 La solicitud desvela una composición farmacéutica que comprende uno o más agentes inhibidores, como se expone anteriormente, junto con al menos un agente que promueve la captación del agente inhibidor en un nervio periférico. Los ejemplos de dichos agentes incluyen agentes potenciadores de la permeabilidad de la membrana, tales como dimetil sulfoxido y/o 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina.

35 La solicitud desvela una composición farmacéutica que comprende uno o más agentes inhibidores, como se expone anteriormente, junto con al menos un agente que trata una causa de dolor subyacente, que incluye, pero sin limitación, un agente antiinflamatorio (tal como aspirina, un agente antiinflamatorio no esteroideo, tal como ibuprofeno, o un corticosteroide).

40 La solicitud desvela una composición farmacéutica que comprende uno o más agentes inhibidores, como se expone anteriormente, junto con al menos un agente que tiene un efecto anestésico local, tal como lidocaína.

45 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo transdérmico que contiene una cantidad eficaz de un agente de acuerdo con la invención. En una realización específica, no limitativa, el agente de acuerdo con la invención está ligado a un péptido transportador. El dispositivo transdérmico puede ser un parche o un mecanismo que comprenda uno o más agentes inhibidores, como se expone anteriormente, y opcionalmente uno o más agentes adicionales que promueven la captación del agente en un nervio periférico, trata una causa de dolor subyacente y/o tiene un efecto anestésico local, donde se proporcionan ejemplos de compuestos en cada una de estas categorías anteriores. El dispositivo puede utilizar en general tecnología de parches transdérmicos conocida en la técnica, para facilitar la liberación sostenida de sus agentes terapéuticos a través de la piel de un sujeto. En realizaciones específicas no limitativas el dispositivo crea un potencial eléctrico que promueve la captación de uno o más agentes inhibidores en tejido local (iontoforesis), o mejora la transferencia de fármacos utilizando ultrasonido u ondas de radiofrecuencia (véase Bryan, 2004; Patentes de Estados Unidos N.º 5.405.614 y 4.708.716).

55 5.4 Modulación de las rutas del dolor utilizando los mecanismos de transporte retrógrado neuronal

La presente solicitud desvela un método para modular e inhibir específicamente las rutas del dolor, la percepción del dolor y la hiperalgesia primaria (sistema nervioso periférico), que comprende suministrar un compuesto inhibidor del dolor a un axón de un nervio sensorial, de tal manera que el compuesto inhibidor del dolor se transporta, de forma retrógrada a lo largo del axón, al cuerpo celular de la neurona sensorial en el ganglio de la raíz dorsal. El compuesto inhibidor del dolor no está limitado a los inhibidores de LTH expuestos en el presente documento, sino que puede ser cualquier inhibidor del dolor que actúe en las neuronas sensoriales, tales como inhibidores de prostaglandina (por ejemplo, inhibidores de COX-2), opioides de acción periférica, compuestos anestésicos, etc., ligados a un péptido transportador que facilita el transporte axonal retrógrado.

60

En un ejemplo no limitativo, el péptido transportador es PKKKRK (SEQ ID NO: 46) o un péptido o péptido derivatizado

65

que es al menos aproximadamente 80 por ciento homólogo al mismo según lo determinado utilizando un programa informático estándar de evaluación de homología, tal como BLAST o FASTA, y que facilita el transporte axonal. En otro ejemplo no limitativo, el péptido transportador es el péptido relacionado CTPPKKKRKV (SEQ ID NO: 47) (véase Ambron, 1992), o un péptido o péptido derivatizado que es al menos aproximadamente 70, o al menos aproximadamente 80 o al menos aproximadamente 90 por ciento homólogo al mismo según lo determinado utilizando un programa informático estándar de evaluación de homología tal como BLAST o FASTA y que facilita el transporte axonal. El péptido transportador tiene una longitud de entre 5 y 20 aminoácidos y comprende el péptido KKKRK (SEQ ID NO: 48), PKKKRK (SEQ ID NO: 46), PPKKKRK (SEQ ID NO: 49), TPPKKRK (SEQ ID NO: 50), o PKKKRKV (SEQ ID NO: 51).

Por ejemplo, el compuesto inhibidor del dolor (que comprende un agente que inhibe el dolor asociado a una neurona sensorial y a un péptido transportador; preferentemente un inhibidor de LTH como se expuso anteriormente) puede suministrarse a un receptor de dolor periférico en el sitio de la lesión o en el mismo dermatoma que el de la lesión, como axones sensoriales que surgen a lo largo del dermatoma que convergen en el mismo ganglio de la raíz dorsal. La Figura 11A-B presenta los dermatomas sensoriales (del Merck Manual of Diagnosis and Therapy, sección 14, capítulo 165, figura 165-2, que hace referencia a Keegan y Garrett FD, "Anatomical Record 102: 409-437, 1948, utilizado con permiso del Wistar Institute, Filadelfia, PA). Como ejemplos, el dolor de artritis asociado a los dedos se comunica a través de axones cuyos cuerpos celulares residen en los GRD (ganglios de la raíz dorsal) a nivel de C5-T1 y el dolor de rodilla se comunica a través de axones cuyos cuerpos celulares residen en los GRD a nivel de L3-S2.

Por consiguiente, la presente solicitud desvela un método de tratamiento para el dolor en un sujeto, en el que se determina que el dolor está asociado a un ganglio de la raíz dorsal a un nivel particular de la médula espinal, que comprende la aplicación tópica, en la piel que se encuentra dentro del dermatoma correspondiente al nivel de la médula espinal asociado al dolor, de un inhibidor del dolor que comprende un péptido transportador.

El compuesto inhibidor del dolor puede incluirse en una crema, pomada o dispositivo transdérmico (véase líneas anteriores), y aplicarse al dermatoma apropiado.

Por ejemplo, una persona que padece lumbalgia como resultado de la compresión del nervio que sale de un foramen óseo en la columna vertebral inferior (radiculopatía lumbar, sacra o lumbosacra), podría tratarse con un parche transdérmico que contuviese un compuesto inhibidor del dolor (que comprende un péptido transportador) y aplicarse al dermatoma correspondiente a nivel de la médula espinal a partir del cual se origina el nervio comprimido, que puede identificarse por los síntomas y la exploración física de la persona. Como ejemplo específico, dado que con frecuencia la radiculopatía involucra a los nervios provistos en los dermatomas L4, L5 y/o S1, se puede aplicar un parche transdérmico de acuerdo con la invención a la nalga del paciente. Como otro ejemplo específico, no limitativo, una persona con artritis con implicación de las articulaciones de los dedos, los dermatomas C6-C8 podrían llevar un parche de acuerdo con la invención en el antebrazo o en el hombro, por ejemplo, por encima de la espina escapular.

Este aspecto de la solicitud proporciona la ventaja de que trata el dolor a mismo tiempo que evita la administración sistémica de un compuesto antinociceptivo, lo que reduce sustancialmente el potencial de abuso de sustancias y evita los posibles efectos secundarios, tales como los asociados a los inhibidores de COX-2.

5.5 apPKG

La presente solicitud desvela adicionalmente moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína quinasa G, así como sus proteínas codificadas.

La presente solicitud desvela un ácido nucleico aislado que codifica una proteína quinasa G del género *Aplysia* (ap PKG) que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en el GenBank con el N.º de registro AY362340 y la SEQ ID NO: 10 en el presente documento. La presente solicitud desvela una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en el GenBank con el N.º de registro AY362340 y la SEQ ID NO: 9 en el presente documento, así como moléculas de ácido nucleico que son al menos 85, al menos 90 o al menos 95 por ciento homólogas a las mismas, donde la homología se determina mediante un programa informático estándar de determinación de homología, tal como BLAST o FASTA. La presente solicitud desvela moléculas de ácido nucleico aisladas que se hibridan, en condiciones rigurosas, con una molécula de ácido nucleico que tiene la SEQ ID NO: 9, y que codifican una molécula que tiene actividad proteína quinasa. En el presente documento, las condiciones rigurosas se definen como hibridación con ADN unido a un filtro en NaHPO₄ 0,5 M, dodecil sulfato sódico (SDS) al 7 %, EDTA 1 mM a 65 °C y lavando en SSC 0,1x/SDS al 0,1 % a 68 °C (Ausubel G- M. *et al.*, eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & sons, Inc., Nueva York, pág. 2.10.3).

Los ácidos nucleicos de la solicitud pueden incluirse en una molécula de vector, que puede ser un fago, un plásmido, un fagémido o un virus.

Los ácidos nucleicos de la solicitud pueden unirse operativamente a un elemento promotor para crear un casete de expresión.

CellFectin (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los clones víricos positivos se identificaron por su capacidad para dirigir la expresión de la proteína apropiada, como se reveló mediante inmunotransferencia de extractos de células enteras de células Sf9 transfectadas recogidas 3 d después de la transfección, utilizando un anticuerpo contra la etiqueta de histidina de la proteína. Para la expresión proteica de apPKG, se infectaron células Sf9 con el baculovirus recombinante a una multiplicidad de infección superior a 10. Después de 72 h, se recogieron las células y la apPKG-His recombinante se purificó en resina de níquel - ácido nitriloacético (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para expresar VASP (fosfoproteína estimulada por vasodilatadores, siglas del inglés *vasodilator-stimulated phosphoprotein*), la región codificante de VASP se obtuvo primero mediante amplificación por PCR a partir de ADNc de cerebro de ratón con los siguientes cebadores: 5'-gtcgtgggacccccatgatagcgagacggatcatctgt (SEQ ID NO: 13) y 5'-atcttgattcctcgagggtcaaggagaacccccgctt (SEQ ID NO: 14). El producto de la PCR se subclonó en los sitios EcoRI y BamHI de pGEX3X (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) y se confirmó posteriormente mediante secuenciación. La construcción resultante, pGEXVASP, contenía una etiqueta de epítipo GST (glutación S-transferasa) C-terminal. Las proteínas de fusión VASP-GST, Elk1-GST, MEKK1C (MAP quinasa 1C)-GST, MEK1 (MAP quinasa quinasa 1)-GST y ERK1-GST, se expresaron en células DH5 α de *Escherichia coli* y se purificaron como se describe en la técnica (Sung *et al.*, 1996).

Transferencias Northern. El ARN total se extrajo de varios tejidos y se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturante; después, el gel se transfirió a una membrana de nailon. La transferencia resultante se hibridó con apPKG marcada con radioactividad y ADNc ribosómico 5S como se ha descrito anteriormente en la técnica (Alberino *et al.*, 1994; Sung *et al.*, 2001).

RT-PCR de células individuales. Las SN individuales se transfirieron a 500 μ l de Reactivo Tri (Molecular Research Center, Cincinnati, OH), y el ARN total se aisló de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc de cada muestra se sintetizó utilizando, como cebadores, hexámeros al azar y transcriptasa inversa (SuperScript II). Para amplificar fragmentos específicos mediante PCR (40 ciclos), se utilizaron partes alícuotas (2 μ l) de cada muestra, utilizando conjuntos de cebadores específicos para lo siguiente: (1) óxido nítrico sintasa (NOS) neuronal (número de registro de GenBank AAK83069), 5'-gtaccctcacaggacgagtc (SEQ ID NO: 15) y 5'-tccttggacctctctgtgtg (SEQ ID NO: 16) (nt 3610-4049); (2) sensorina A neuropéptido específico de SN (número de registro de GenBank X56770), 5'-aacagaaacagctcttcccc (SEQ ID NO: 17) y 5'-tcttgactcaccactgcc (SEQ ID NO: 18) (nt 43-331); y (3) actina específica de neuronas (número de registro de GenBank U01352), 5'-cagagagaagatgacccag (SEQ ID NO: 19) y 5'-gggtaagagaagcaagaaag (SEQ ID NO: 20) (nt 416-1298).

Ensayos de quinasa. La actividad PKG *in vitro* se midió como se describe en la técnica (Pohler *et al.*, 1995). En resumen, se incubaron 100 ng de His-apPKG con 5 μ g de diversos péptidos en un tampón que contenía lo siguiente (en mM): Tris-HCl 25, pH 7,5, 5 β -glicerol fosfato, 2 DTT, Na₃VO₄ 0,1 y MgCl₂ 10. La reacción se inició añadiendo [γ -³²P]ATP 10 μ M. Se dejó proseguir la incubación durante 20 min a temperatura ambiente y finalizó con EDTA 50 mM (concentración final). Los péptidos marcados se capturaron en filtros P81 (Whatman, Maidstone, Reino Unido). Los filtros se lavaron con ácido fosfórico al 0,5 % y se secaron, y el fosfopéptido-³²P unido se detectó mediante recuento por centello líquido. Para los recuentos del fondo, todos los valores obtenidos sin el sustrato. Para evaluar la actividad de apPKG endógena se utilizaron 5 μ g de extracto de ganglios o axoplasma en el tampón de quinasa (citado anteriormente) con 5 μ g de inhibidor de PKA en presencia o en ausencia de cGMP 1 μ M. La actividad de ERK se sometió a ensayo como se describe en la técnica (Sung *et al.*, 2001). En resumen, las proteínas y el ATP 500 μ M se incubaron en tampón de quinasa durante 20 min a temperatura ambiente. Las mezclas de reacción se resolvieron en geles de poliácridamida con SDS al 10 % y se sometieron a transferencia Western con los anticuerpos (Ab)pTpYmapk, AbpYmapk, AbpTmapk o AbpElk1.

Hibridación *in situ*. En primer lugar se aislaron ganglios de animales, se desvainaron y se fijaron durante 3 h en paraformaldehído al 4 % en PBS, a pH de 7,4. Después, los ganglios se lavaron varias veces en PBS 1X y se sometieron a digestión con proteinasa K 80 μ g/ml (Ambion, Austin, TX) en PBS 1 μ durante 30 min a temperatura ambiente (TA). Después de diversos lavados en PBS 1X, los ganglios se fijaron de nuevo durante 20 min con paraformaldehído al 4 % y después se lavaron varias veces más en PBS 1X. Después de tratamiento con HCl de trietanolamina al 1,32 %, a pH de 8,0 (10 min a TA) y anhídrido acético al 0,24 % en HCl de trietanolamina al 1,32 %, a pH de 8,0 (20 min a TA), y diversos lavados con PBS 1X, los ganglios se prehibridaron en tampón Hyb (formamida al 50 %, SSC 5X, solución de Denhardt 5X, ARNt de levadura 0,25 mg/ml y ADN de esperma de salmón 0,5 mg/ml) a 60 °C durante 2 h, y después se hibridaron durante una noche a 60 °C con tampón Hyb reciente que contenía ARNc antisentido o en sentido marcado con digoxigenina (DIG) (1 μ g/ml). Después de la hibridación, los ganglios se lavaron primero durante 30 min en tampón Hyb reciente a 68 °C y después en SSC 0,2X a 68 °C durante 1 h. Después de alcanzar el equilibrio en PBST (PBS 1X y Triton X-100 al 0,1 %), los ganglios se bloquearon en PBST con suero de oveja al 10 %, durante 30 min a TA, y después se incubaron con anticuerpo anti-DIG (1:5000) acoplado a fosfatasa alcalina (Roche, Indianápolis, IN) en PBST 1X que contenía suero de oveja al 1 % durante una noche a 4 °C. Las señales de hibridación se visualizaron con cloruro de nitroazul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (Roche).

Transferencia Western. Las muestras proteicas se resolvieron en geles de poliácridamida con SDS al 10 % y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Keene, NH); las transferencias se exploraron con diversos anticuerpos primarios específicos de genes y anticuerpos secundarios apropiados conjugados con peroxidasa de rábano picante. La inmunoreactividad se detectó utilizando el sistema de

quimioluminiscencia Pico-tag (Pierce, Rockford, IL).

Immunocitoquímica. Los ganglios, los nervios o las células cultivadas, se fijaron en PBS con paraformaldehído al 4 %, a un pH de 7,4. El anticuerpo primario se diluyó en TBS complementado con Triton X-100 al 0,1-0,5 % en TBS y suero de cabra al 5 % y se incubó durante una noche a una temperatura de 4 °C. Después de varios lavados, se aplicó un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 594 o 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia confocal (microscopio confocal LSM510; Zeiss, Oberkochen, Alemania) y se tomaron imágenes.

Cultivo de células. Las SN se aislaron de los ganglios pleurales de animales de 50-80 gm y se sembraron en placas recubiertas con poli-L-lisina que contenían medio L15 y hemolinfa al 50 % (Dagan y Levitan, 1981; Glanzman *et al.*, 1989). Los cultivos se mantuvieron a 18 °C durante hasta 7 d. El medio se cambió cada 2 d. Los fármacos se retiraron con lavado 1 h antes de realizar los ensayos electrofisiológicos.

Electrofisiología. Antes de iniciar cada registro, la hemolinfa se reemplazó con una mezcla 1:1 de agua de mar artificial y medio de cultivo (sin hemolinfa; pH 7,6). Para la estimulación intracelular y el registro se utilizaron técnicas estándar (Ambron *et al.*, 1996). El umbral del pico del pericarion se midió con una serie estándar de pulsos de despolarización de 20 ms. El disparo repetitivo se cuantificó contando el número de picos generado por una serie de pulsos de despolarización de 2 s a 1, 2, 3, 4 y 5 nA, o pulsos de despolarización de 1 s a 2,5 veces la corriente para el umbral de 20 ms. La amplitud del pico se midió desde la línea inicial hasta el pico del potencial de acción y la duración del pico fue la amplitud del potencial de acción a la mitad de su altura máxima.

Marcaje de proteínas con fluorescencia. Las proteínas BSA, apPKG y ERK1 se marcaron utilizando un kit de marcaje de proteínas con Alexa Fluor 546 (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones de fabricante.

Microinyección de SN. Con un extractor programable Sutter se prepararon pipetas de microinyección. La proteína marcada con Alexa Fluor 546 (0,75 µg/µl en Tris-HCl 10 mM, pH 7,3, NaCl 100 mM y colorante verde rápido 0,05 %) se microinyectó en las SN cultivadas aplicando presión de aire positiva en condiciones definidas (libras por pulgada cuadrada y duración) y utilizando un sistema Picospritzer (Sung *et al.*, 2000).

Materiales. La PKG 1α bovina recombinante, la guanosina 3', 5'-monofosforotioato cíclico, el 8-(4-clorofeniltio)-, el isómero de Rp (Rp-8-pCPT-cGMPS), la adenosina 3', 5'-monofosforotioato cíclico, el isómero de Rp (Rp-cAMPS), la 1-H[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), la L-tiocitulina, el clorhidrato de éster metílico de N^ϵ-nitro-L-arginina (L-NAME), el inhibidor 6-22 amida de la proteína quinasa A y el sustrato BPDETido de PKG, se adquirieron en Calbiochem (La Jolla, CA). Los péptidos A, C y D y la proteína MAPK p42, se obtuvieron en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los siguientes anticuerpos se obtuvieron y utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante: anti-fosfo-VASP (Ser239) de UpstateCell Signaling Solutions (Lake Placid, NY), anticuerpos policlonales contra MAPK fosforilada (Ab^{pT_{mapk}}) y fosfo-EIκI (Ser³⁸³; Ab^{pEIκI}) de Cell Signaling Technology (Beverly, MA), y anti-pY MAPK (Ab^{pY_{mapk}}), anti-pT MAPK (Ab^{pT_{mapk}}) y α-actina de Sigma (St. Louis, MO).

6.2. Resultados

Las SN de *Aplysia* contienen una PKG neuronal de tipo I

Para investigar el papel de la ruta de PKG en la inducción de LTH, se clonó una PKG de *Aplysia* (número de registro de GenBank AY363240). El ADNc de apPKG contiene una fase de lectura abierta que codifica una supuesta proteína de 733 aa. De acuerdo con todas las PKG conocidas, la quinasa de *Aplysia* contiene dos dominios de unión a nucleótidos cíclicos en tándem y un dominio catalítico C terminal (Fig. 1A, parte superior). La proteína prevista codificada por la secuencia de apPKG es muy similar a las proteínas quinasas dependientes de cGMP conocidas con más de 50 % de identidad de aminoácidos con las PKG de *Drosophila* y con las isoformas de PKG de tipo I y II de mamífero (Fig. 1A, parte inferior). Sin embargo, parece estar más estrechamente relacionada con la DG1 de *Drosophila* (Fig. 1B).

Para determinar el patrón de expresión de apPKG, se exploró una transferencia Northern de ARN total de varios tejidos de animales adultos con un fragmento de 283 pb marcado con ³²P correspondiente a las bases 209-492 del ADNc. La sonda detectó un solo transcrito de 3,0 kb que se expresó en los ganglios, pero no en los músculos ni en los órganos genitales (Fig. 1C). Una sonda marcada con ³²P para el ARN ribosómico 5S detectó un transcrito de 0,19 kb en todos los tejidos (Fig. 1C).

Para localizar la fuente del mensaje, la sonda de apPKG se utilizó para generar ribosondas en sentido y antisentido para la hibridación *in situ*. La sonda antisentido detectó altos niveles de expresión de ARNm de apPKG en el grupo SN y en la mayoría de las neuronas en los ganglios pedales y pleurales (Fig. 1D, panel de la izquierda). La sonda en sentido produjo un marcaje insignificante (Fig. 1D, panel de la derecha).

Las propiedades catalíticas de apPKG se investigaron después expresando primero el ADNc de apPKG en un sistema de baculovirus/Sf9. Cuando las células se cultivaron en presencia de suero se produjo una apPKG recombinante

inactivada etiquetada con His y cuando las células se privaron de suero se produjo una apPKG constitutivamente activa. Ambas formas de apPKG recombinante se purificaron mediante cromatografía de afinidad.

La apPKG inactiva se activó con 8-Br-cGMP 100 nM y BPDEtido rápidamente fosforilado, un sustrato peptídico para todas las PKG de tipo I (Glass y Krebs, 1982) (Fig. 2A). La comparación de la apPKG activa con la PKG soluble bovina de tipo 1 α recombinante, mostró que ambas quinasas fosforilaron fácilmente diversos sustratos peptídicos de PKG (Fig. 2B). Significativamente, ninguna quinasa fosforiló el péptido C, que es el sustrato preferido de la PKG de tipo II unida a membrana (Hall *et al.*, 1999) (Fig. 2B). También se examinó la proteína VASP, cuya serina en la posición 239 se reconoce específicamente por las PKG solubles de tipo I (Smolenski *et al.*, 1998) y se encontró que las quinasas tanto de bovino como de *Aplysia* fosforilaron este sitio (Fig. 2C). Estos estudios determinan que la apPKG es un miembro de la familia de PKG solubles de tipo I.

La apPKG se localiza en axones donde se activa por una lesión nerviosa y se transporta de manera retrógrada al cuerpo celular de las SN

Los nervios periféricos p5-p9 de *Aplysia* inervan la región media de la pared corporal y la cola y contienen axones de las SN (Walters *et al.*, 1983a,b; Billy y Walters, 1989). Para determinar si la apPKG está en los axones, se generó un anticuerpo policlonal de conejo, Ab^{apPKG}, contra un péptido ubicado en el extremo N (aminoácidos 18-128) de la proteína. El anticuerpo Ab^{apPKG} se purificó por afinidad y se utilizó para explorar transferencias Western. El Ab^{apPKG} reconoció polipéptidos de 80 y 100 kDa en los extractos de ganglios pedales y pleurales, pero no en tejido muscular o genital así como la proteína recombinante de 80 kDa purificada por afinidad (Fig. 3A). Se cree que la banda de 100 kDa es la forma dominante de apPKG, porque es más abundante y tiene una mayor afinidad por el cGMP que el componente de 80 kDa. Ambas bandas también fueron reconocidas por un anticuerpo comercial que se generó contra la PKG de tipo I α humana (restos de aminoácidos 657-671: 50 % de identidad con la apPKG). La apPKG contiene secuencias consenso de varias quinasas y otras enzimas y el componente de 100 kDa podría contener una o más modificaciones postraduccionales.

Para determinar si la apPKG estaba presente en los axones, el axoplasma se extruyó de los nervios p5-p9. La figura 3A muestra que ambos polipéptidos estaban presentes. Las SN tienen axones en los nervios p5-p9, y la inmunocitoquímica con AbapPKG tiñó esencialmente todas las SN en el grupo (Fig. 3B). Para determinar los efectos de la lesión nerviosa en la apPKG axonal, los nervios p5-p9 de un lado se aplastaron, con lo que se axotomizaron los axones en cada nervio. En varios momentos después, se evaluó la actividad de apPKG en los ganglios pedal y pleural ipsilateral (mismo lado) y contralateral (lado opuesto), que incluía el grupo de cuerpos celulares de la SN. Como se muestra en la Figura 4A, antes de que apareciera una actividad significativa de apPKG en el ganglio pleural ipsilateral, hubo un retraso de aproximadamente 16 h después del aplastamiento del nervio. Después, la actividad aumentó durante al menos 24 h, pero no fue significativamente diferente a la de la línea basal a las 48 h. Se detectó poca o ninguna actividad de apPKG en el ganglio pleural de control contralateral (Fig. 4A). Significativamente, la actividad de apPKG en los cuerpos celulares de las neuronas del ganglio pedal ipsilateral se mantuvo en el nivel basal durante las 48 h posteriores a la axotomía (Fig. 4A), lo que indica que la activación de apPKG es selectiva para las neuronas en el ganglio pleural.

El largo retraso antes de que apareciera actividad de apPKG en los cuerpos celulares es coherente con la idea que la quinasa es una señal de lesión positiva. Además, la apPKG contiene una secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization sequence*) que puede proporcionar acceso al sistema de transporte retrógrado (Ambron y Walters, 1996; Schmied y Ambron, 1997; Hanz *et al.*, 2003). Para investigar esta posibilidad se utilizó un protocolo estándar de ligamiento - aplastamiento (Ambron *et al.*, 1995; Johanson *et al.*, 1995) (Fig. 4B). Los nervios p5-p9 se aplastaron unilateralmente y se colocó una ligadura en cada nervio proximal al sitio de aplastamiento. Las proteínas que se transportaron lejos del sitio de aplastamiento (hacia los cuerpos celulares) se acumulan en el axoplasma detrás de la ligadura donde se pueden recoger. Veinticuatro h después, se eliminaron los segmentos nerviosos de 0,5 cm de la siguiente manera; (1) proximal al sitio de aplastamiento (Ap), (2) distal a la ligadura en los nervios aplastados (el sitio de Ap/Lig), y (3) distal a la ligadura en el lado de control (el sitio de Lig) (Fig. 4B, parte superior). Después, el axoplasma se extruyó de cada segmento, así como de los segmentos de los nervios p5-p9 de un animal que no recibió una lesión nerviosa. Cuando se examinaron las mismas cantidades de cada axoplasma para determinar la actividad de la apPKG, hubo un aumento de 10 veces en la actividad de apPKG en el axoplasma del segmento Ap/Lig en relación con la actividad basal en el axoplasma de animales sin lesión (Fig. 4B, parte inferior). Por el contrario, la actividad de apPKG en el segmento Ap fue solo tres veces mayor que la actividad basal, y la del segmento Lig en el nivel basal.

La acumulación de la actividad de apPKG en el sitio de Ap/Lig se confirmó mediante estudios inmunocitoquímicos en los que se utilizó Ab^{apPKG} para examinar la distribución de la proteína ap-PKG en nervios no lesionados y lesionados. La tinción de apPKG se distribuyó uniformemente a lo largo de los axones en nervios sin tratamiento previo (Fig. 4C, panel 1). Sin embargo, después del aplastamiento de los nervios, hubo una disminución en la tinción en el sitio de Ap (Fig. 4C, panel 3) y hubo un aumento significativo en las terminaciones de los axones en el sitio de Ap/Lig (panel 4). No hubo aumento en la tinción en el sitio de Lig (Fig. 4C, panel 2). La acumulación tanto de la proteína apPKG como de la actividad en el sitio de Ap/Lig en relación con los sitios de Ap y Lig confirma contundentemente que la apPKG es una señal de lesión positiva (Ambron *et al.*, 1995).

La ruta de la óxido nítrico-cGMP-PKG regula la inducción de LTH en las SN *in vitro*

5 Cuando las SN de *Aplysia* se axotomizan por extracción del ganglio y se disponen individualmente en cultivo, regeneran sus axones y exhiben una disminución en el umbral del pico y un aumento en el disparo repetitivo, que son dos características de la LTH (Ambron *et al.*, 1996; Bedi *et al.*, 1998; Sung y Ambron, 2004). Para examinar la aparición de esta LTH con mayor detalle, las propiedades eléctricas de las SN *in vitro* se registraron desde el segundo hasta el séptimo día y se compararon con los registros eléctricos de las SN dentro del grupo *in situ*. Aproximadamente el 10 % de las células analizadas *in vitro* no tenía un potencial de reposo suficiente o era reacio al disparo y no se incluyó en el estudio. La misma disminución se detectó en el umbral y el aumento en el disparo repetitivo como se informó anteriormente, y también se encontró que las SN axotomizadas exhibían una amplitud significativa de picos y un aumento en la amplitud del pico en relación con los controles (Fig. 5). Los cambios fueron significativos en el segundo día y persistieron hasta al menos el séptimo día. El hecho de que estos mismos cuatro cambios en las propiedades eléctricas se produzcan en las SN de los GRD de ratas hiperexcitables después de la axotomía (Abdulla y Smith, 2001), confirma el uso de las SN de *Aplysia* disociadas como un sistema modelo para estudios de alteraciones sensoriales que pueden contribuir al dolor neuropático.

15 Para investigar si la aparición de la LTH requiere actividad de apPKG, se eliminaron las SN del ganglio en presencia del inhibidor de la guanilil ciclasa soluble (sGC), ODQ, el inhibidor de la PKG, Rp-8-pCPT-cGMPS, o el inhibidor de la PKA, Rp-cAMPS. Este último se utilizó porque la PKA tiene propiedades en común con la PKG (Scott, 1991; Francis y Corbin, 1994) y se ha implicado en varias formas de plasticidad sináptica en las SN de *Aplysia* (Ghirardi *et al.*, 1992; Byrne y Kandel, 1996; Bedi *et al.*, 1998; Muller y Carew, 1998; Chain *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 1999; Sutton y Carew, 2000; Antonov *et al.*, 2003). Las células se dejaron regenerar posteriormente en presencia de los inhibidores *in vitro*, y al tercer día, sus propiedades electrofisiológicas se compararon con las de las SN que se extrajeron de los mismos ganglios al mismo tiempo, pero que no se habían expuesto a un fármaco. Se encontró que tanto Rp-8-pCPT-cGMPS como ODQ impidieron el aumento del disparo repetitivo (Fig. 6A) y la disminución en el umbral del pico (B). Por contra, el inhibidor de PKA no tuvo ningún efecto significativo en ninguno de los parámetros. Ni Rp-8-pCPT-cGMPS ni ODQ inhibieron la aparición de excitabilidad cuando se añadieron a SN cultivadas durante 2 d, lo que confirma los datos indicados en la Figura 4A que muestra que la activación de apPKG es transitoria. En estos experimentos no se evaluó ni la ampliación ni la amplitud de los picos.

20 Ninguno de estos tratamientos, que utilizaron concentraciones de los fármacos similares o incluso inferiores a las indicadas para las neuronas de mamíferos (Monfort *et al.*, 2002) y *Aplysia* (Lewin y Walters, 1999), afectaron al potencia de membrana en reposo. Significativamente, tampoco alteraron el grado o el patrón de crecimiento de las neuritas. En cambio, la exposición de las SN a U0126, un inhibidor selectivo de MEK, produjo graves defectos de crecimiento.

25 La inhibición de la LTH por los inhibidores de sGC y PKG indicó que la síntesis de cGMP y la activación de PKG se producen dentro de las neuronas sensoriales. Se sabe que la NO eleva la producción cGMP a través de sGC (Schlossmann *et al.*, 2003), y que la enzima NOS produce la NO (Bredt y Snyder, 1990; Moroz *et al.*, 1996). Para investigar la probabilidad de que se requiera la activación de NOS para la LTH, se utilizó RT-PCR para detectar los niveles celulares de ARNm de apn-NOS en SN individuales inmediatamente después de su eliminación del ganglio (0 h) o después de 16 h *in vitro*. Como se muestra en la Figura 6C (panel superior), cuatro de las cinco células expresaron cantidades significativas de ARNm de apn-NOS después de 16 h *in vitro*, mientras que no se detectó ninguna cantidad en las células de 0 h. En cambio, el ARNm de la sensorina A, neuropéptido específico de SN (Brunet *et al.*, 1991) y de la isoforma de actina específica de neuronas (Desflorseillers *et al.*, 1994), fue abundante en cada célula (Fig. 6C, segundo y tercer paneles, respectivamente).

30 La L-tiocitrulina es un inhibidor eficaz de apNOS, y se encontró que, como se indicó anteriormente, la exposición de las SN a este fármaco *in vitro* reducía notablemente la actividad máxima en relación con los controles no tratados (Fig. 6D). Otro inhibidor de NOS, L-NAME también redujo la LTH en las mismas condiciones, pero no fue tan eficaz como la L-tiocitrulina (Fig. 6D). Estos datos indican que la ruta NO-cGMP-PKG es necesaria para inducir la LTH en las SN.

La apMAPK somática se fosforila en su sitio de activación mediante la apPKG

35 La inducción de LTH en las neuronas sensoriales de *Aplysia* después de una lesión periférica, requiere la transcripción génica (Lewin y Walters, 1999) y podría efectuarse directamente por la apPKG si la quinasa se transloca al núcleo después de entrar en el cuerpo celular. La inmunotinción reveló un nivel constitutivo bajo de apPKG en algunos núcleos de las SN, pero no hubo aumento después de la axotomía (Fig. 3B). Esto sugirió que la apPKG contribuye a la inducción de LTH activando un factor que se importa al núcleo. Un miembro de ERK de la familia MAPK es un buen candidato para este factor, porque la LTH se puede inducir inyectando ERK1 recombinante en cuerpos celulares de SN (Sung *et al.*, 2001). Para evaluar si después de una lesión se activa la ERK, se aplastaron los nervios p5-p9 *in vivo* y se utilizó para producir transferencias Western de neuronas lesionadas y de control de los ganglios pleurales, que se exploraron con un anticuerpo (Ab^{pTp^ymapk}) que reconoce las ERK que se habían activado por fosforilación dual en el sitio de T-E-Y. El anticuerpo reconoció un solo polipéptido de 43 kDa que tenía poca actividad en las neuronas de los ganglios pleurales 4 u 8 h después de la lesión (Fig. 7A, panel superior). Sin embargo, a las 16 h, había más quinasa activa en el lado del aplastamiento en relación con el control contralateral, y el nivel continuó aumentando

durante al menos 48 h (Fig. 7A, panel superior).

Las neuronas de *Aplysia* contienen un homólogo de ERK2, apMAPK (Michael *et al.*, 1998), que entra en el núcleo después de una lesión *in vitro* (Martin *et al.*, 1997). La apMAPK tiene el mismo dominio catalítico y el sitio de activación de los aminoácidos T-E-Y de las ERK 1 y 2. Para determinar si la apMAPK era la quinasa activada después de una lesión, se exploró la misma transferencia con un anticuerpo, D8, que reconoce específicamente a la apMAPK (Martin *et al.*, 1997) y se encontró que el anticuerpo reconocía la quinasa activada por lesión de 43 kDa (Fig. 7A, panel inferior). El anticuerpo detecta la apMAPK tanto activa como inactiva, y hubo poca diferencia en la cantidad de proteína apMAPK total entre las muestras. El hallazgo de que la actividad de apMAPK comenzó a aumentar justo después de la llegada de la apPKG activa en el cuerpo celular (compárense las Figs. 4A, 7A) sugirió una relación entre la apPKG y la apMAPK. Esta idea se analizó preparando un lisado de neuronas del ganglio pleural y utilizando Ab^{pT_Ymapk} para controlar muestras para detectar la apMAPK activa. Se detectó poca fosfo-apMAPK endógena en el lisado (Fig. 7B, carril 1), pero la adición de apPKG activa u 8-Br-cGMP mejoró notablemente el nivel de ap-MAPK activa (carriles 2, 3) que fue reconocida por el anticuerpo D8. Sorprendentemente, la activación por U0126, un potente inhibidor de la quinasa MEK aguas arriba (Fig. 7B, carril 4). Curiosamente, la adición de apPKG activa aa axoplasma no activó la apMAPK (Fig. 7B, carriles 5, 6) (véase Análisis). Otro estudio con el lisado mostró que la ap-MAPK activada por apPKG fosforilaba a su sustrato fisiológico, Elk1, en la Ser³⁸³ apropiada (Fig. 7C, carril 3).

La activación de apMAPK en presencia de U0126 sugirió que la apPKG activa a la apMAPK directamente y por lo tanto la apPKG activa se incubó con ERK2 de mamífero recombinante. ERK2 fue un sustituto de apMAPK. Sin embargo, ambas quinasas contienen el sitio de aminoácidos T-E-Y diana. Al igual que en lisado, apPKG activó ERK2 para fosforilar Elk1 (Fig. 7C, carril 6). Cuando se repitió el experimento, la ERK2 activada fue reconocida por Ab^{pT_YMAPK}, lo que indica que estaba doblemente fosforilada (Fig. 7D, parte superior, carril 2). La activación fue específica, porque se redujo en presencia de BPDEtido (Fig. 7D, parte superior, carril 3). ERK2 se activa al máximo cuando los aminoácidos T e Y están fosforilados, aunque las PKG son serina/treonina quinasas. Por tanto, es relevante, que la ERK2 bacteriana recombinante tiene un nivel de actividad bajo que es atribuible a la presencia de un fosfato en la fracción Y (Cha y Shapiro, 2001). De hecho, el anticuerpo contra ERKpY185 reconoció el sustrato ERK2 recombinante en una transferencia Western (Fig. 7D, central). No hubo aumento en la fosforilación de Y cuando ERK2 se incubó con apPKG (Fig. 7D, central, carril 2). Sin embargo, cuando se exploró una transferencia por duplicado con un anticuerpo contra ERKpT183, hubo un aumento en la fosforilación de la T en presencia de apPKG (Fig. 7D, parte inferior, carril 2). Este anticuerpo reacciona específicamente con la treonina monofosforilada y las ERK doblemente fosforiladas. Este resultado indica que la ap-PKG puede activar completamente a ERK2 mediante la fosforilación de ERK2 que ya contiene un fosfato en Y-185.

A continuación se examinó si la incubación de apPKG y ERK2 recombinante producía una ERK2 activa con actividad enzimática comparable a la producida por MEK1, que produce la quinasa activada al máximo. La actividad de ERK2 se midió mediante la fosforilación de Elk1 en Ser³⁸³, y MEK1 se activó mediante la subunidad catalítica de MEK1 (Xu *et al.*, 1995). Como se esperaba, apPKG produjo una ERK2 con actividad similar a la producida por MEK1 (Fig. 7E). Este resultado indica que, además de MEK1, PKG es un activador de ERK2.

Debido a que PKG fosforila T183 en ERK2 que ya tiene un fosfato en Y185 (Fig. 7D), una pregunta esencial es si la apMAPK monofosforilada en Y está disponible para la fosforilación por apPKG después de la axotomía. Esta pregunta se respondió aplastando primero p5-p9 *in vivo*. Después, las muestras se transfirieron y se exploraron con un anticuerpo contra ERKpY185. De hecho, la apMAPKpY estuvo presente en las neuronas de los ganglios pleurales 8 h después de la lesión, y su expresión aumentó en el lado del aplastamiento en relación con el control contralateral a las 16 h (Fig. 7F, panel superior). La apMAPKpY no se detectó en dos animales analizados que no había recibido tratamiento previo (Fig. 7F, panel superior). La exploración de la transferencia con un anticuerpo que detecta la apMAPK tanto activa como inactiva, mostró que había poca diferencia en la cantidad de proteína apMAPK total entre las muestras (Fig. 7F, panel inferior). Por lo tanto, la presencia de apMAPKpY en el pericarion 16 h después de la lesión, junto con la llegada de apPKG desde el sitio de aplastamiento (Fig. 4A), debería dar como resultado la activación completa de la apMAPK.

El nivel de apMAPK en el núcleo de SN *in vitro* se reduce cuando se inhibe la actividad de apPKG

La evidencia anterior indica que la apPKG no entra el núcleo de las SN en respuesta al aplastamiento de nervios *in vivo* (Fig. 3B). Sin embargo, las PKG de tipo I tienen una NLS (secuencia de localización nuclear) supuesta (Gudi *et al.*, 1997) y la apPKG tiene un tramo corto de aminoácidos cargados positivamente (453KCLKKKHI) en el dominio de unión a ATP que podría funcionar como una NLS. La importación de proteínas en el núcleo de las neuronas de *Aplysia* se evaluó fácilmente inyectando directamente afines marcados con fluorescencia en el cuerpo celular (Ambron *et al.*, 1992; Schmied *et al.*, 1993; Gunstream *et al.*, 1995). Por lo tanto, se inyectó apPKG recombinante marcada con Alexa en el pericarion de las SN después de 2 d *in vitro*, se cortaron las neuritas para iniciar una respuesta de lesión, y, 30 min después, se examinaron las células mediante microscopía de fluorescencia. Toda la proteína marcada permaneció en el citoplasma (Fig. 8A). Como era de esperar, el BSA marcado con Alexa también permaneció en el citoplasma después de la inyección (Ambron *et al.*, 1992; Schmied *et al.*, 1993; Gunstream *et al.*, 1995). En cambio, la ERK1 de vertebrado recombinante activa marcada con Alexa inyectada, que se importa al núcleo en una variedad de tipos de células (Karin, 1994), entró rápidamente en el núcleo donde se distribuyó en parches distintos (Fig. 8A).

Se han observado parches similares después de la importación de otras proteínas en los núcleos de *Aplysia* (Ambron *et al.*, 1992; Schmied *et al.*, 1993; Gunstream *et al.*, 1995).

La incapacidad de la apPKG para entrar en el núcleo de las SN de *Aplysia* es coherente con la idea de que contribuye a la inducción de LTH al promover la importación nuclear de apMAPK. Si es así, la inhibición de la ruta apPKG debería bloquear la entrada de apMAPK inducida por la axotomía en el núcleo. Por lo tanto, las SN se expusieron *in vitro*, ya sea al bloqueador de PKG, Rp-8-pCPTcGMPS, o al bloqueador PKA, Rp-cAMPS, en las condiciones que inducen la LTH (Fig. 6A). En el tercer día, las células se fijaron, se permeabilizaron y se expusieron al anticuerpo D8 para visualizar LA ap-MPAK. La microscopía confocal mostró que las células no tratadas y las expuestas a Rp-cAMPS tenían los mismos niveles de tinción nuclear (Fig. 8B). En cambio, hubo una reducción drástica en la tinción nuclear en las células tratadas con Rp-8-pCPTcGMPS (Fig. 8B). Por lo tanto, tanto la inducción de LTH como la presencia de ap-MAPK en el núcleo dependen de la actividad de apPKG.

6.3. Análisis

El dolor neuropático persistente en seres humanos después de una lesión nerviosa es física y psicológicamente debilitante. Debido a que un componente importante de este dolor es a menudo la LTH que aparece en las neuronas aferentes primarias, es importante comprender cómo la axotomía induce la LTH. Una LTH con propiedades similares aparece en las SN nociceptivas de *Aplysia* después de la axotomía, y se aprovecharon las ventajas experimentales de estas neuronas para definir una ruta de señalización responsable de la inducción de LTH. Una gran sorpresa fue que esta ruta involucra la fosforilación de apMAPK por PKG. Esta es una alternativa a la cascada de MAP quinasa tradicional y sugiere que, después de producirse una lesión nerviosa, la PKG y la MAPK tienen papeles exclusivos.

La apPKG es una señal de lesión positiva en las SN

Se clonó una PKG de tipo I de *Aplysia* cuyo ARNm se encuentra en las SN y en otras neuronas en el ganglio pleural (Fig. 1D). Cuando los nervios periféricos se aplastaron *in vivo*, la actividad de apPKG apareció en los cuerpos celulares de las neuronas de los ganglios pleurales, pero solo después de un retraso de aproximadamente 16 h (Fig. 4A). Un retraso similar en la respuesta a la lesión nerviosa se ha atribuido a señales de lesión positivas (Schmied *et al.*, 1993; Sung *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2003). Las transferencias Western exploradas con Ab^{apPKG} mostraron que la apPKG está presente en el axoplasma extruido de los nervios periféricos (Fig. 3A). Además, como las proteínas se transportan de forma retrógrada a lo largo de los axones de *Aplysia* a una velocidad de 1,5 mm/h (Ambron *et al.*, 1992; Schmied *et al.*, 1993; Gunstream *et al.*, 1995), el retraso es coherente con el transporte de la apPKG desde el sitio del aplastamiento, que se localizó a 2 cm del ganglio. Cuando se colocó una ligadura proximal al sitio del aplastamiento, se descubrió que la apPKG activada y la proteína apPKG total se acumulaban en el lado distal de la ligadura, en relación con el sitio del aplastamiento (Fig. 4B, C). Estos hallazgos determinan que la apPKG es una señal de lesión positiva.

El mecanismo responsable del transporte inducido por lesión no se conoce. Aunque la apPKG contiene varios sitios posibles de miristoilación que podrían unirse a las vesículas después de la lesión, se encontró que la apPKG era soluble después del fraccionamiento subcelular. Hanz *et al.* (2003) han demostrado que las proteínas que contienen una NLS se transportan de forma retrógrada a través de dineína e importinas en el nervio ciático de rata, y que la apPKG se puede transportar utilizando un mecanismo similar.

La aparición de la LTH en las SN de *Aplysia* axotomizadas *in vitro* depende de NOS, sGC, apPKG y apMAPK

La LTH que aparece en las SN (Fig. 5) y en las SN nociceptivas de mamíferos después de una lesión nerviosa (Abdulla y Smith, 2001) tiene propiedades electrofisiológicas similares. Si esta congruencia refleja mecanismos conservados, entonces la LTH podría ser inducida por rutas comunes en ambos tipos de células. Las SN se examinaron *in vitro* y se encontró que la reducción inducida por axotomía en el umbral del pico y el aumento en la hiperexcitabilidad fueron bloqueados por Rp-8-pCPT-cGMPS, ODO y L-tiocitrulina, inhibidores de apPKG, sGC y NOS, respectivamente (Fig. 6A,B,D). Además, Rp-8-pCPT-cGMPS también causó una reducción de casi el triple en el nivel de apMAPK en el núcleo de las NS (Fig. 8B). Estos hallazgos apuntaron a una relación directa entre la activación de NOS y apPKG, la entrada de apMAPK en el núcleo y la inducción de LTH. El hallazgo de que la expresión de ARNm de NOS en las SN aumentó después de la lesión (Fig. 6C), implica que el nivel de la proteína NOS podría ser la etapa limitante de velocidad en la ruta. La expresión de ARNm de NOS neuronal (nNOS) y de proteína también aumenta en las neuronas de los GRD (ganglios de la raíz dorsal) después de cortar sus axones periféricos (Verge *et al.*, 1992; Fiallos-Estrada *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993).

El cAMP y la PKA también se han implicado en la inducción y el mantenimiento de LTH (Scholz y Byrne, 1988; Goldsmith y Abrams, 1992; Bedi *et al.*, 1998), y en este caso esto fue una preocupación porque la PKA y la PKG tienen propiedades en común. Sin embargo, se encontró que la exposición de las SN a Rp-cAMPS, un inhibidor de PKA permeable a la membrana, no impidió la inducción de LTH ni bloqueó la entrada de apMAPK en el núcleo. Esto confirma hallazgos anteriores de que los inhibidores de la PKA no pudieron bloquear la LTH inducida por estimulación nociva (Lewin y Walters, 1999).

La activación de apPKG y de ap-MAPK a través de una lesión fue interesante, porque sugería un posible vínculo entre estas dos quinasas (Zaragoza *et al.*, 2002). De hecho, cuando se añadió apPKG activa a un lisado neuronal, no solo activó a la ap-MAPK (Fig. 7B), sino que lo hizo a través de una ruta que no requería MEK, el activador aguas arriba ubicuo de las ERK. Esta respuesta fue fisiológicamente relevante, porque la apMAPK activada fosforiló su sustrato nuclear Elk1 en la Ser383 (Fig. 7C), que es esencial para la actividad transcripcional (Marais *et al.*, 1993; Whitmarsh *et al.*, 1995). Cuando la apPKG activa se incubó con ERK2 recombinante de vertebrado, que tiene el mismo sitio de activación T-E-Y que la apMAPK, se estableció una interacción directa entre las quinasas. Se encontró que la ERK2 estaba activada (Fig. 7C) y doblemente fosforilada (D, parte superior). El último hallazgo indicó que la ERK2 estaba completamente activa, y se confirmó con otro estudio en el que las mismas cantidades de ap-PKG o de MEK1 activaron a la ERK2 a niveles comparables (Fig. 7E).

Los indicios de que la apPKG produce una ERK2 activada al máximo, crean una paradoja, porque las PKG son serina-treonina quinasas que no pueden fosforilar la tirosina. Sin embargo, dado que la ERK2 recombinante ya contiene fosfotirosina-185 (Fig. 7D, en el centro), la fosforilación de la treonina-183 por la apPKG (Fig. 7D, parte inferior) debe producir una ERK2 completamente activada. La fosforilación de apMAPKpY por apPKG es llamativa, porque la ERK2pY185 se había detectado en células de vertebrados (Yao *et al.*, 2000; Cha y Shapiro, 2001; Zhou y Zhang, 2002), y la confirmación indica que la expresión de apMAPKpY aumenta en las neuronas de *Aplysia* después de una lesión nerviosa (Fig. 7F). La apMAPKpY podría producirse por una fosfatasa que elimina el fosfato de la apMAPK doblemente fosforilada, o por una tirosina quinasa activada por lesión que fosforila la tirosina en el sitio de aminoácidos T-E-Y. La posibilidad de que la inducción de LTH requiera la convergencia de apPKG y de una tirosina quinasa en apMAPK conferiría más control sobre esta ruta. Esto es razonable dado que la LTH altera radicalmente la función de las neuronas lesionadas y conduce a cambios significativos en el comportamiento del animal.

La apMAPK también está presente en el axoplasma, pero no se activa por una lesión nerviosa (Sung *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2003), lo cual es paradójico, dado que la lesión activa a la apPKG axoplasmática. Una explicación sería que las dos quinasas están ubicadas en diferentes axones. Sin embargo, cuando se añadió apPKG activa al axoplasma extruido de los nervios periférico, la apMAPK no se activó en las mismas condiciones que causaron su activación en el pericarion (Fig. 7B). Evidentemente, hay un mecanismo en el axón que protege a la apMAPK de la apPKG. Sin embargo, estas observaciones significan que, después de su activación en el axón por una lesión, la apPKG debe transportarse de nuevo al pericarion para influir en los acontecimientos nucleares a través de apMAPK.

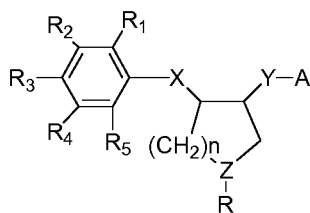
Con respecto a la ruta molecular descrita en el presente documento, queda la posibilidad de que la lesión del nervio pueda causar la translocación de apMAPK o la activación de PKG somática por otras rutas también. Una ruta de señalización NO-cGMP-PKG-MAPK también podría ser importante para la LTH inducida por la inflamación que se desarrolla alrededor de un sitio de lesión nerviosa, tanto en mamíferos (Millan, 1999; Zimmermann, 2001) como en *Aplysia* (Clatworthy *et al.*, 1995; Clatworthy y Grose, 1999; Farr *et al.*, 1999, 2001). ¿Cómo podría la apMAPK nuclear regular la LTH?, la apMAPK puede fosforilar a CREB2 (proteína 2 de unión a elementos de respuesta a cAMP), un represor del sitio de elementos de respuesta a cAMP (CRE, *cAMP response element*) Bartsch *et al.*, 1995; Michael *et al.*, 1998), C/EBP (CCAAT/proteína de unión al potenciador), un factor de transcripción que se une al sitio de elementos de respuesta a estrógenos (ERE, *estrogen response element*) (Alberini *et al.*, 1994) y Elk1, un factor de transcripción que regula el sitio de elementos de respuesta al suero (SER, *serum response element*) (Lin *et al.*, 2003). La unión a los tres sitios aumenta después de una lesión nerviosa, pero con evoluciones temporales diferentes. Por lo tanto, la unión de C/EBP y CREB a ERE y CRE, respectivamente, es rápida, pero con una vida relativamente corta (Dash *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 2001), mientras que la unión de Elk1 a SER es bifásica, con una fase temprana que dura algunas pocas horas y una segunda fase que persiste durante semanas (Lin *et al.*, 2003). CREB se fosforila en las neuronas de GRD en respuesta a una actividad intensa (Ji y Woolf, 2001), y el sitio CRE es necesario para la respuesta de la LTH frente a estímulos nocivos en las SN de *Aplysia* (Lewin y Walters, 1999). Estas consideraciones apuntan a CREB2 y C/EBP como dianas de apMAPK durante la inducción inicial de la LTH en las SN. La persistencia de la LTH durante semanas puede estar mediada por la fosforilación de Elk1 mediante apMAPK. Esta ruta es selectiva, porque la inhibición de NOS, sGC o PKG, impidió la aparición de LTH en las SN disociados, pero no bloqueó el crecimiento. Si el vínculo entre esta ruta y la LTH representa una relación fundamental y ampliamente conservada, entonces las intervenciones terapéuticas que se dirigen a esta ruta pueden utilizarse para mitigar el dolor persistente después de una lesión nerviosa sin bloquear la regeneración del axón.

7. Ejemplo: Bloqueo de la actividad de PKG en la rata

La FIG. 9 muestra que la activación de PKG puede bloquearse en el sitio de la lesión utilizando un inhibidor de PKG, Rp-8-pCPT-cGMPs ("RP-G"). El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera. Utilizando un protocolo estándar, se anestesió a una rata, y el nervio ciático se expuso y se lesionó en ausencia o en presencia de RP-G, o de un inhibidor de PKA, Rp-8-pCPT-cAMPS ("RP-A"). Cuatro horas más tarde, el nervio se seccionó como se muestra en el esquema del gráfico anterior en la FIG. 9, y cada segmento se analizó para determinar la actividad de PKG. En ausencia de inhibidor (barras negras), la PKG activa se había transportado hacia los cuerpos celulares y se enriqueció en P3. RP-A (barras grises) no cambió este patrón. En cambio, RP-G (barras blancas) anuló la actividad.

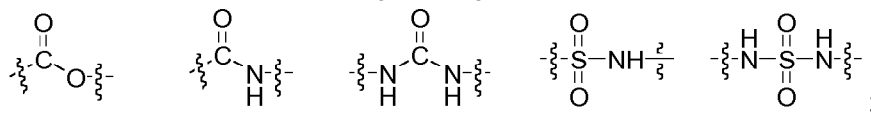
Esta solicitud proporciona, entre otras cosas, las siguientes cláusulas:

1. Un método de tratamiento de dolor crónico en un sujeto que padece hiperalgesia del sistema nervioso periférico, que comprende administrar, a una neurona sensorial en un ganglio de la raíz dorsal del sujeto, una cantidad eficaz de un agente que disminuye la actividad de la proteína quinasa G.
- 5 2. Un método de tratamiento de dolor crónico en un sujeto que padece hiperalgesia del sistema nervioso periférico, que comprende administrar, a una neurona sensorial en un ganglio de la raíz dorsal del sujeto, una cantidad eficaz de un inhibidor peptídico de la actividad de la proteína quinasa G.
3. El método de la cláusula 2, en el que el inhibidor peptídico comprende la secuencia peptídica RKK.
- 10 4. El método de la cláusula 2, en el que el inhibidor peptídico comprende la secuencia peptídica RKKK.
5. El método de la cláusula 2, 3 o 4, en el que el inhibidor peptídico comprende un péptido portador.
- 15 6. El método de la cláusula 5, en el que el péptido portador se selecciona del grupo que consiste en YGRKKRRQRRRPP, RKKRRQRRR y RQIKIWFQNRRMKWKK.
7. El método de la cláusula 2, 3 o 4, en el que el inhibidor peptídico comprende un péptido transportador.
8. El método de la cláusula 7, en el que el péptido transportador comprende la secuencia PKKKRK.
- 20 9. El método de la cláusula 5, en el que el péptido inhibidor comprende un péptido transportador.
10. El método de la cláusula 9, en el que el péptido transportador comprende la secuencia PKKKRK.
- 25 11. Un método de tratamiento de dolor crónico en un sujeto que padece hiperalgesia del sistema nervioso periférico, que comprende administrar, a una neurona sensorial en un ganglio de la raíz dorsal del sujeto, una cantidad eficaz de un agente que tiene la fórmula I:

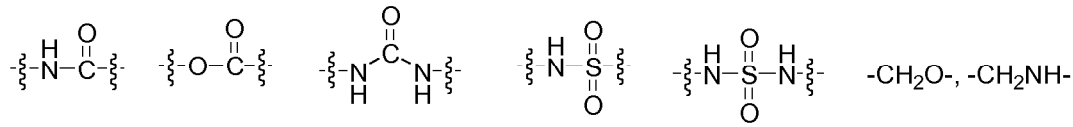


30 **Fórmula I**

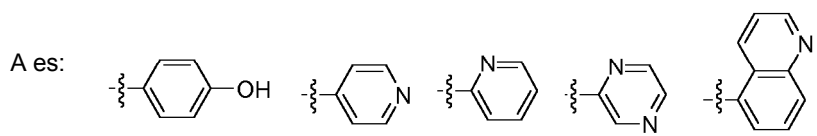
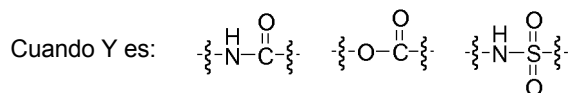
en la que n es 1, 2 o 3; Z es N o CH;
 en la que X representa uno de los siguientes grupos funcionales:



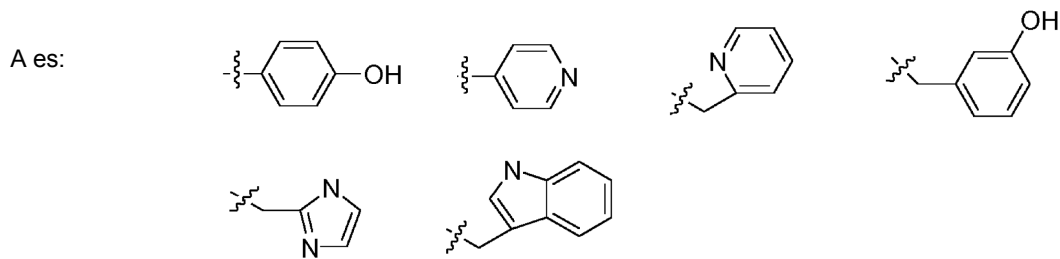
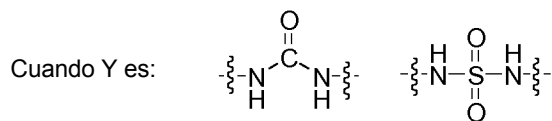
35 en la que Y representa uno de los siguientes grupos funcionales:



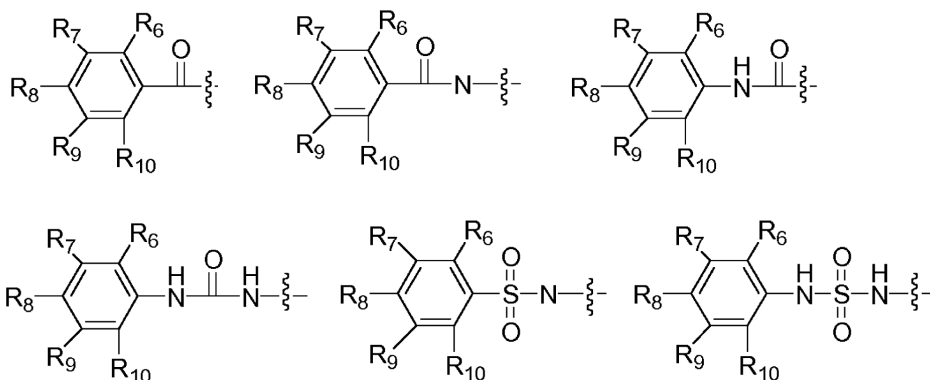
en la que A representa grupos arilo o heteroarilo no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino o halógeno, de manera que, donde A es un grupo arilo o heteroarilo,



y



5 en la que R es hidrógeno, alquilo inferior, o amidino;
 en la que R1, R2, R4, R5 es independientemente hidrógeno, hidroxilo, alcoxi inferior, amino o halógeno;
 y
 en la que R3 es alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, ariloxi, o un grupo seleccionado de los siguientes:



10 siendo R6-R10 independientemente hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno, trifluorometilo, carboxi, alcocarbonilo, amino, alquilamino, alquilcarbonilamino, alquilsulfonilamino (por ejemplo, CF₃SO₂NH-, CH₃SO₂NH-) y tetrazol.

12. El método de la cláusula 11, en el que el agente es balanol.

15 13. El método de la cláusula 11, en el que el agente es una variante de balanol.

14. El método de la cláusula 13, en el que la variante de balanol se selecciona del grupo que consiste en balanol-7R, 14-descarboxi-balanol, 10-desoxi-balanol, balanol unido a un péptido transportador, una variante de balanol unida a un péptido transportador, balanol unido a un péptido portador, una variante de balanol unida a un péptido portador, balanol unido a un péptido transportador y un péptido portador y una variante de balanol unida a un péptido transportador y un péptido portador.

15. El método de la cláusula 1, en el que el agente es Rp-8-pCPT-cGMPS.

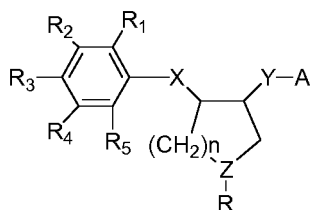
25 16. El método de cláusula 1, en el que el agente es Rp-8-pCPT-cGMPS unido a un péptido transportador.

17. El método de cláusula 1, en el que el agente es una molécula de ácido nucleico antisentido o ARNi que inhibe la expresión de la proteína quinasa G.

30 18. Un método de tratamiento de dolor crónico en un sujeto que padece hiperalgesia del sistema nervioso periférico, que comprende administrar, a una neurona sensorial en un ganglio de la raíz dorsal del sujeto, una cantidad eficaz de un agente que inhibe la óxido nítrico sintasa neuronal seleccionado del grupo que consiste en clorhidrato de éster metílico de N^o-nitro-L-arginina, L-tiocitrulina y un ácido nucleico antisentido o ARNi que inhibe la expresión de nNOS.

35 19. Un método de tratamiento de dolor crónico en un sujeto que padece hiperalgesia del sistema nervioso periférico, que comprende administrar, a una neurona sensorial en un ganglio de la raíz dorsal del sujeto, una cantidad eficaz de un agente que disminuye la óxido nítrico celular.

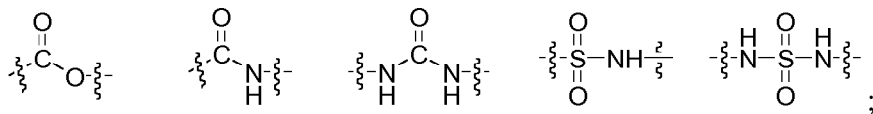
20. El método de la cláusula 19, en el que el agente es quercetina.
21. Un método de tratamiento de dolor crónico en un sujeto que padece hiperalgesia del sistema nervioso periférico, que comprende administrar, a una neurona sensorial en un ganglio de la raíz dorsal del sujeto, una cantidad eficaz de un agente que inhibe la guanilil ciclasa seleccionado del grupo que consiste en 1-H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona y una molécula de ácido nucleico antisentido o ARNi que inhibe la expresión de la guanilil ciclasa.
22. Un método de tratamiento de dolor crónico en un sujeto que padece hiperalgesia del sistema nervioso periférico, que comprende administrar, a una neurona sensorial en un ganglio de la raíz dorsal del sujeto, una cantidad eficaz de un agente que disminuye el guanosín monofosfato cíclico celular.
23. El método de la cláusula 22, en el que el agente es una fosfodiesterasa.
24. El método de la cláusula 23, en el que la fosfodiesterasa es PDE5.
25. El método de la cláusula 22, que es un agente que aumenta la actividad fosfodiesterasa.
26. El método de la cláusula 25, en el que el agente es Ant-cGMP-2'-O-antraniloil cGMP.
27. Un método de tratamiento de dolor crónico en un sujeto que padece hiperalgesia del sistema nervioso periférico, que comprende administrar, a una neurona sensorial en un ganglio de la raíz dorsal del sujeto, una cantidad eficaz de un agente que inhibe la translocación de la proteína quinasa erk activada por mitógeno en el núcleo.
28. El método de la cláusula 27, en el que el agente es un bloqueador del canal de calcio.
29. El método de la cláusula 28, en el que el agente es felodopina.
30. Un método de inhibición de la hiperexcitabilidad de larga duración en una neurona sensorial, que comprende administrar, a la neurona sensorial, una cantidad eficaz de un agente que disminuye la actividad de la proteína quinasa G.
31. Un método de inhibición de la hiperexcitabilidad de larga duración en una neurona sensorial, que comprende administrar, a la neurona sensorial, una cantidad eficaz de un inhibidor peptídico de la actividad de la proteína quinasa G.
32. El método de la cláusula 31, en el que el inhibidor peptídico comprende la secuencia peptídica RKK.
33. El método de la cláusula 32, en el que el inhibidor peptídico comprende la secuencia peptídica RKKK.
34. El método de la cláusula 31, 32 o 33, en el que el inhibidor peptídico comprende un péptido portador.
35. El método de la cláusula 34, en el que el péptido portador se selecciona del grupo que consiste en YGRKKRRQRRRPP, RKKRRQRRR y RQIKIWFQNRRMKWKK.
36. El método de la cláusula 31, 32 o 33, en el que el inhibidor peptídico comprende un péptido transportador.
37. El método de la cláusula 36, en el que el péptido transportador comprende la secuencia PKKKRK.
38. El método de la cláusula 34, en el que el inhibidor peptídico comprende un péptido transportador.
39. el método de la cláusula 38, en el que el péptido transportador comprende la secuencia PKKKRK.
40. Un método de inhibición de la hiperexcitabilidad de larga duración en una neurona sensorial, que comprende administrar, a la neurona sensorial, una cantidad eficaz de un agente que tiene la fórmula I:



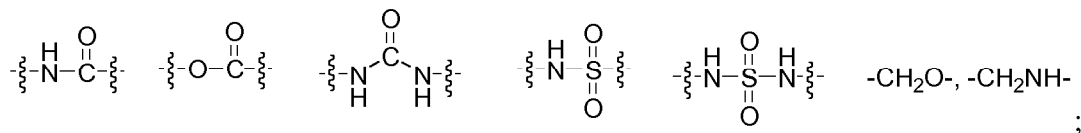
Fórmula I

en la que n es 1, 2 o 3; Z es N o CH;

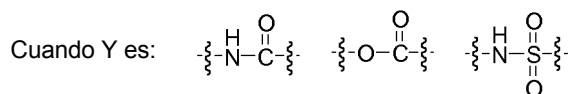
en la que X representa uno de los siguientes grupos funcionales:



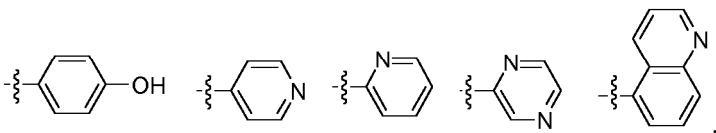
en la que Y representa uno de los siguientes grupos funcionales:



5 en la que A representa grupos arilo o heteroarilo no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino o halógeno, de manera que, donde A es un grupo arilo o heteroarilo,

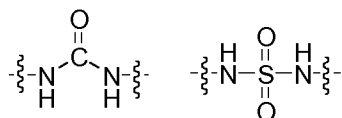


A es:

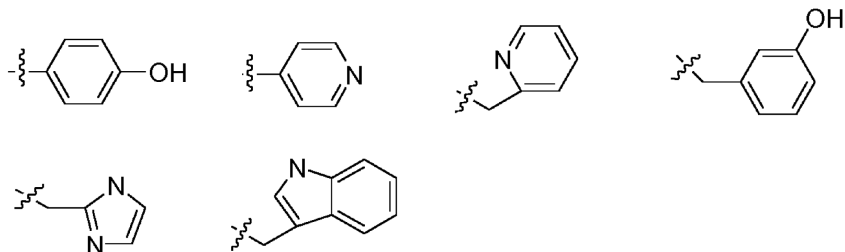


10 y

Cuando Y es:



A es:

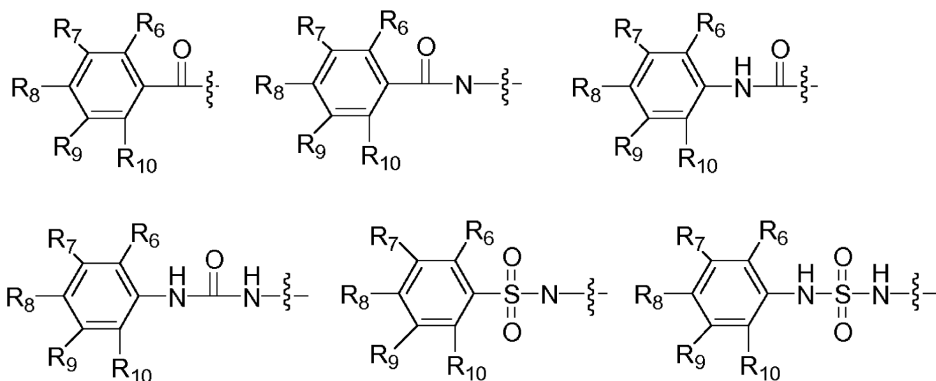


en la que R es hidrógeno, alquilo inferior, o amidino;

en la que R1, R2, R4, R5 es independientemente hidrógeno, hidroxilo, alcoxi inferior, amino o halógeno;

y

15 en la que R3 es alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, ariloxi, o un grupo seleccionado de los siguientes:



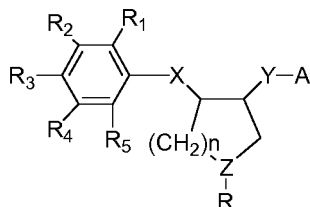
siendo R6-R10 independientemente hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno, trifluorometilo,

carboxi, alcoxycarbonilo, amino, alquilamino, alquilcarbonilamino, alquilsulfonilamino (por ejemplo, CF₃SO₂NH-, CH₃SO₂NH-) y tetrazol.

- 5 41. El método de la cláusula 40, en el que el agente es balanol.
42. El método de la cláusula 40, en el que el agente es una variante de balanol.
- 10 43. El método de la cláusula 42, en el que la variante de balanol se selecciona del grupo que consiste en balanol-7R, 14-descarboxi-balanol, 10-desoxi-balanol, balanol unido a un péptido transportador, una variante de balanol unida a un péptido transportador, balanol unido a un péptido portador, una variante de balanol unida a un péptido portador, balanol unido a un péptido transportador y un péptido portador y una variante de balanol unida a un péptido transportador y un péptido portador.
- 15 44. El método de la cláusula 30, en el que el agente es Rp-8-pCPT-cGMPS.
45. El método de cláusula 30, en el que el agente es Rp-8-pCPT-cGMPS unido a un péptido transportador.
- 20 46. El método de cláusula 30, en el que el agente es una molécula de ácido nucleico antisentido o ARNi que inhibe la expresión de la proteína quinasa G.
- 25 47. Un método de inhibición de la hiperexcitabilidad de larga duración en una neurona sensorial, que comprende administrar, a la neurona sensorial, una cantidad eficaz de un agente que inhibe la óxido nítrico sintasa neuronal seleccionado del grupo que consiste en clorhidrato de éster metílico de N^G-nitro-L-arginina, L-tiocitrulina y un ácido nucleico antisentido o ARNi que inhibe la expresión de nNOS.
- 30 48. Un método de inhibición de la hiperexcitabilidad de larga duración en una neurona sensorial, que comprende administrar, a la neurona sensorial, una cantidad eficaz de un agente que disminuye la óxido nítrico celular.
- 35 49. El método de la cláusula 8, en el que el agente es quercetina.
- 50 50. Un método de inhibición de la hiperexcitabilidad de larga duración en una neurona sensorial, que comprende administrar, a la neurona sensorial, una cantidad eficaz de un agente que inhibe la guanilil ciclasa seleccionado del grupo que consiste en L-H[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona y una molécula de ácido nucleico antisentido o ARNi que inhibe la expresión de la guanilil ciclasa.
- 55 51. Un método de inhibición de la hiperexcitabilidad de larga duración en una neurona sensorial, que comprende administrar, a la neurona sensorial, una cantidad eficaz de un agente que disminuye el guanosín monofosfato cíclico celular.
- 60 52. El método de la cláusula 51, en el que el agente es una fosfodiesterasa.
53. El método de la cláusula 52, en el que la fosfodiesterasa es PDE5.
- 45 54. El método de la cláusula 51, que es un agente que aumenta la actividad fosfodiesterasa.
- 50 55. El método de la cláusula 54, en el que el agente es Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico, 2'-O-antraniloil cGMP.
56. Un método de inhibición de la hiperexcitabilidad de larga duración en una neurona sensorial, que comprende administrar, a la neurona sensorial, una cantidad eficaz de un agente que inhibe la translocación de la proteína quinasa-erk activada por mitógeno en el núcleo.
57. El método de la cláusula 56, en el que el agente es un bloqueador del canal de calcio.
58. El método de la cláusula 57, en el que el agente es felodopina.
- 55 59. Un método de tratamiento de dolor en un sujeto, en el que se determina que el dolor está asociado a un ganglio de la raíz dorsal a un nivel particular de la médula espinal, que comprende la aplicación tópica, en la piel que se encuentra dentro del dermatoma correspondiente al nivel de la médula espinal asociado al dolor, de un inhibidor del dolor que comprende un péptido transportador.
- 60 60. El método de la cláusula 59, en el que el inhibidor del dolor que comprende un péptido transportador, comprende además un agente antiinflamatorio.
- 65 61. El método de la cláusula 59, en el que el inhibidor del dolor que comprende un péptido transportador, comprende además un opioide.
62. El método de la cláusula 59, en el que el inhibidor del dolor que comprende un péptido transportador, comprende

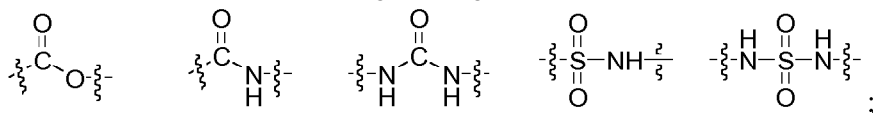
además un inhibidor de proteína quinasa G.

- 5 63. El método de la cláusula 59, en el que el inhibidor del dolor que comprende un péptido transportador, comprende además un inhibidor de óxido nítrico sintasa.
64. El método de la cláusula 59, en el que el inhibidor del dolor que comprende un péptido transportador, comprende además un inhibidor de guanilato ciclasa.
- 10 65. El método de la cláusula 59, en el que el inhibidor del dolor que comprende un péptido transportador, comprende además un inhibidor de MAPKerK quinasa.
66. El método de la cláusula 59, en el que el inhibidor del dolor que comprende un péptido transportador, comprende además un bloqueador del canal de calcio.
- 15 67. El método de la cláusula 59, en el que el inhibidor del dolor comprende una pluralidad de péptidos transportadores.
68. El método de una cualquiera de las cláusulas 60-67, en el que el inhibidor del dolor está incluido en un parche transdérmico.
- 20 69. El método de una cualquiera de las cláusulas 60-67, en el que el inhibidor del dolor está incluido en un dispositivo transdérmico.
70. Un dispositivo transdérmico que contiene un inhibidor de proteína quinasa G.
- 25 71. El dispositivo transdérmico de la cláusula 70, en el que el inhibidor peptídico comprende la secuencia peptídica RKK.
72. El dispositivo transdérmico de la cláusula 70, en el que el inhibidor peptídico comprende la secuencia peptídica RKKK.
- 30 73. El dispositivo transdérmico de la cláusula 70, 71 o 72, en el que el inhibidor peptídico comprende un péptido portador.
- 35 74. El dispositivo transdérmico de la cláusula 73, en el que el péptido portador se selecciona del grupo que consiste en YGRKKRRQRRRPP, RKKRRQRRR y RQIKIWFQNRRMKWKK.
75. El dispositivo transdérmico de la cláusula 70, 71 o 72, en el que el inhibidor peptídico comprende un péptido transportador.
- 40 76. El dispositivo transdérmico de la cláusula 75, en el que el péptido transportador comprende la secuencia PKKKRK.
77. El dispositivo transdérmico de la cláusula 73, en el que el inhibidor peptídico comprende un péptido transportador.
- 45 78. El dispositivo transdérmico de la cláusula 77, en el que el péptido transportador comprende la secuencia PKKKRK.
79. Un dispositivo transdérmico que contiene una cantidad eficaz de un agente que tiene la fórmula I:

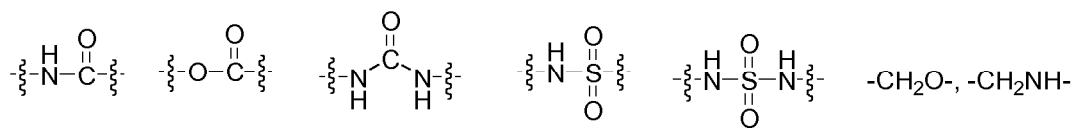


Fórmula I

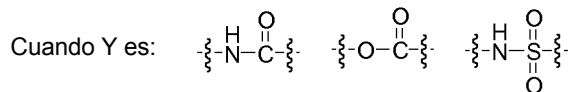
- 50 en la que n es 1, 2 o 3; Z es N o CH;
en la que X representa uno de los siguientes grupos funcionales:



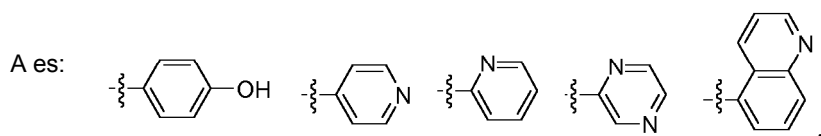
en la que Y representa uno de los siguientes grupos funcionales:



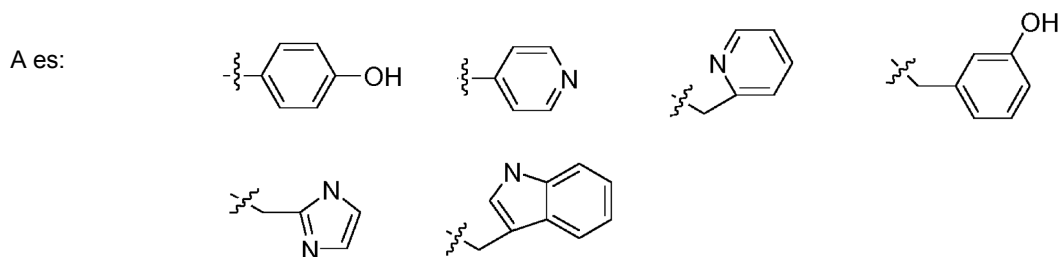
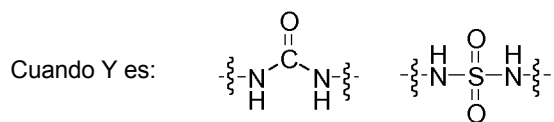
en la que A representa grupos arilo o heteroarilo no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino o halógeno, de manera que, donde A es un grupo arilo o heteroarilo,



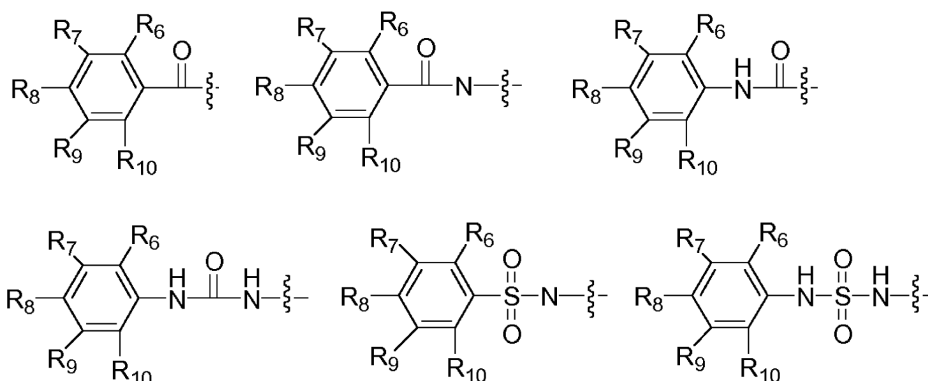
5



y



- 10 en la que R es hidrógeno, alquilo inferior, o amidino;
 en la que R1, R2, R4, R5 es independientemente hidrógeno, hidroxilo, alcoxi inferior, amino o halógeno;
 en la que R3 es alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, ariloxi, o un grupo seleccionado de los siguientes:



- 15 siendo R6-R10 independientemente hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno, trifluorometilo, carboxi, alcoxycarbonilo, amino, alquilamino, alquilcarbonilamino, alquilsulfonilamino (por ejemplo, CF₃SO₂NH-, CH₃SO₂NH-) y tetrazol.

80. El dispositivo transdérmico de la cláusula 79, en el que el agente es balanol.

- 20 81. El dispositivo transdérmico de la cláusula 79, en el que el agente es una variante de balanol.

82. El dispositivo transdérmico de la cláusula 81, en el que la variante de balanol se selecciona del grupo que consiste

en balanol-7R, 14-descarboxi-balanol, 10-desoxi-balanol, balanol unido a un péptido transportador, una variante de balanol unida a un péptido transportador, balanol unido a un péptido portador, una variante de balanol unida a un péptido portador, balanol unido a un péptido transportador y un péptido portador y una variante de balanol unida a un péptido transportador y un péptido portador.

5 83. El dispositivo transdérmico de la cláusula 79, 80, 81 u 82, en el que el compuesto de fórmula I está unido a un péptido transportador.

10 84. Un método de determinación de si un agente de ensayo es un inhibidor de hiperexcitabilidad de larga duración, que comprende las siguientes etapas:

- (i) proporcionar una neurona sensorial de ensayo que comprende un segmento axonal;
 - (ii) crear una lesión en el segmento axonal;
 - 15 (iii) administrar el agente de ensayo a la neurona sensorial de ensayo ya sea antes, junto con, o después de la creación de la lesión de acuerdo con la etapa (ii); y
 - (iv) determinar si el agente de ensayo inhibe un aumento en el nivel de actividad de la óxido nítrico sintetasa en la neurona sensorial de ensayo lesionada,
- en el que una inhibición de un aumento en el nivel de actividad de la óxido nítrico sintetasa en la neurona sensorial de ensayo lesionada, indica que el agente de ensayo es un inhibidor de hiperexcitabilidad de larga duración.

20 85. Un método de determinación de si un agente de ensayo es un inhibidor de hiperexcitabilidad de larga duración, que comprende las siguientes etapas:

- (i) proporcionar una neurona sensorial de ensayo que comprende un segmento axonal;
 - 25 (ii) crear una lesión en el segmento axonal;
 - (iii) administrar el agente de ensayo a la neurona sensorial de ensayo ya sea antes, junto con, o después de la creación de la lesión de acuerdo con la etapa (ii); y
 - (iv) determinar si el agente de ensayo inhibe un aumento en el nivel de actividad de la guanil ciclasa en la neurona sensorial de ensayo lesionada,
- 30 en el que una inhibición de un aumento en la actividad de la guanilil ciclasa en la neurona sensorial de ensayo lesionada, indica que el agente de ensayo es un inhibidor de hiperexcitabilidad de larga duración.

35 86. Un método de determinación de si un agente de ensayo es un inhibidor de hiperexcitabilidad de larga duración, que comprende las siguientes etapas:

- (i) proporcionar una neurona sensorial de ensayo que comprende un segmento axonal;
 - (ii) crear una lesión en el segmento axonal;
 - (iii) administrar el agente de ensayo a la neurona sensorial de ensayo ya sea antes, junto con, o después de la creación de la lesión de acuerdo con la etapa (ii); y
 - 40 (iv) determinar si el agente de ensayo inhibe un aumento en el nivel de actividad de la proteína quinasa G en la neurona sensorial de ensayo lesionada,
- en el que una inhibición de un aumento en la actividad de la proteína quinasa G en la neurona sensorial de ensayo lesionada, indica que el agente de ensayo es un inhibidor de hiperexcitabilidad de larga duración.

45 87. Un método de determinación de si un agente de ensayo es un inhibidor de hiperexcitabilidad de larga duración, que comprende las siguientes etapas:

- (i) proporcionar una neurona sensorial de ensayo que comprende un segmento axonal;
 - (ii) crear una lesión en el segmento axonal;
 - 50 (iii) administrar el agente de ensayo a la neurona sensorial de ensayo ya sea antes, junto con, o después de la creación de la lesión de acuerdo con la etapa (ii); y
 - (iv) determinar si el agente de ensayo inhibe el transporte de la proteína quinasa G en la neurona sensorial de ensayo lesionada,
- en el que la inhibición del transporte de proteína quinasa G en la neurona sensorial lesionada, indica que el agente de ensayo es un inhibidor de hiperexcitabilidad de larga duración.

55 88. Un método de determinación de si un agente de ensayo es un inhibidor de hiperexcitabilidad de larga duración, que comprende las siguientes etapas:

- (i) proporcionar una neurona sensorial de ensayo que comprende un segmento axonal;
 - 60 (ii) crear una lesión en el segmento axonal;
 - (iii) administrar el agente de ensayo a la neurona sensorial de ensayo ya sea antes, junto con, o después de la creación de la lesión de acuerdo con la etapa (ii); y
 - (iv) determinar si el agente de ensayo inhibe un aumento en la fosforilación de MPAKerk en la neurona sensorial de ensayo lesionada,
- 65 en el que la inhibición de la fosforilación de MAPKerk en la neurona sensorial lesionada, indica que el agente de ensayo es un inhibidor de hiperexcitabilidad de larga duración.

89. Un método de determinación de si un agente de ensayo es un inhibidor de la hiperexcitabilidad de larga duración, que comprende las siguientes etapas:

- 5 (i) proporcionar una neurona sensorial de ensayo que comprende un segmento axonal;
 (ii) crear una lesión en el segmento axonal;
 (iii) administrar el agente de ensayo a la neurona sensorial de ensayo ya sea antes, junto con, o después de la creación de la lesión de acuerdo con la etapa (ii); y
 (iv) determinar si el agente de ensayo inhibe la translocación de MAPKerk en el núcleo de la neurona sensorial lesionada,
 10 en el que la inhibición de la translocación de MAPKerk en el núcleo de la neurona sensorial lesionada indica que el agente de ensayo es un inhibidor de hiperexcitabilidad de larga duración.

90. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una molécula de ácido nucleico que es al menos 90 por ciento homóloga a una molécula de ácido nucleico que tiene la SEQ ID NO: 9.

15 91. La molécula de ácido nucleico aislada de la cláusula 90, en la que la molécula de ácido nucleico que es al menos 90 por ciento homóloga a una molécula de ácido nucleico que tiene la SEQ ID NO: 9, está unida operativamente a un elemento promotor.

20 92. La molécula de ácido nucleico aislada de la cláusula 90, que está incluida en un vector.

93. La molécula de ácido nucleico aislada de la cláusula 91, que está incluida en un vector.

25 94. Una proteína aislada que es al menos 90 por ciento homóloga a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y que tiene actividad proteína quinasa.

95. Un método de tratamiento de dolor crónico en un sujeto, que comprende administrar, en el sistema nervioso central del sujeto, una cantidad eficaz de un inhibidor peptídico de la actividad proteína quinasa G.

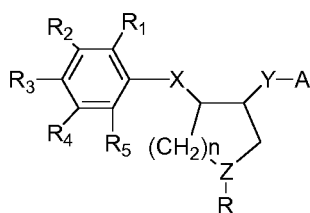
30 96. El método de la cláusula 95, en el que el inhibidor peptídico comprende la secuencia peptídica RKK.

97. El método de la cláusula 95, en el que el inhibidor peptídico comprende la secuencia peptídica RKKK.

35 98. El método de la cláusula 95, 96 o 97, en el que el inhibidor peptídico comprende un péptido portador.

99. El método de la cláusula 89, en el que el péptido portador se selecciona del grupo que consiste en YGRKKRRRQRRRPP, RKKRRQRRR y RQIKIWFQNRRMKWKK.

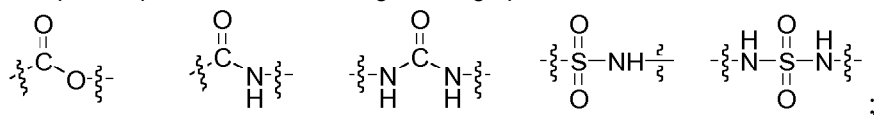
40 100. Un método de tratamiento de dolor crónico en un sujeto, que comprende administrar, en el sistema nervioso central del sujeto, una cantidad eficaz de un agente que tiene la fórmula I:



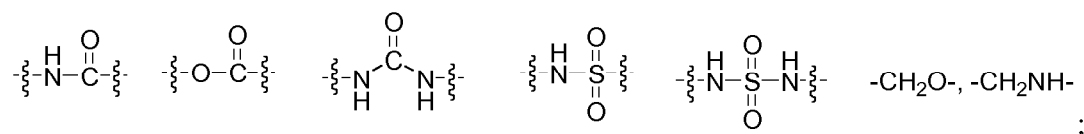
Fórmula I

en la que n es 1, 2 o 3; Z es N o CH;

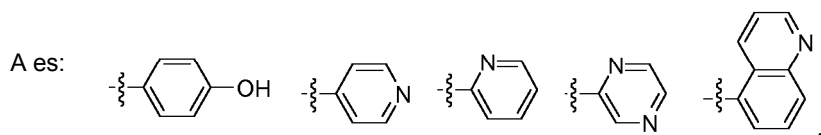
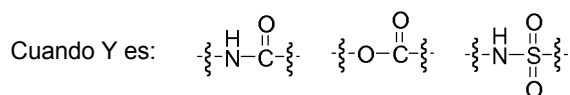
45 en la que X representa uno de los siguientes grupos funcionales:



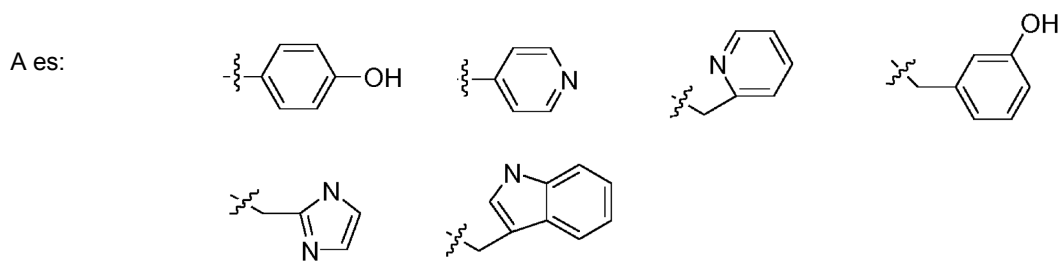
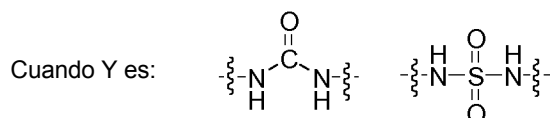
en la que Y representa uno de los siguientes grupos funcionales:



50 en la que A representa grupos arilo o heteroarilo no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino o halógeno, de manera que, donde A es un grupo arilo o heteroarilo,

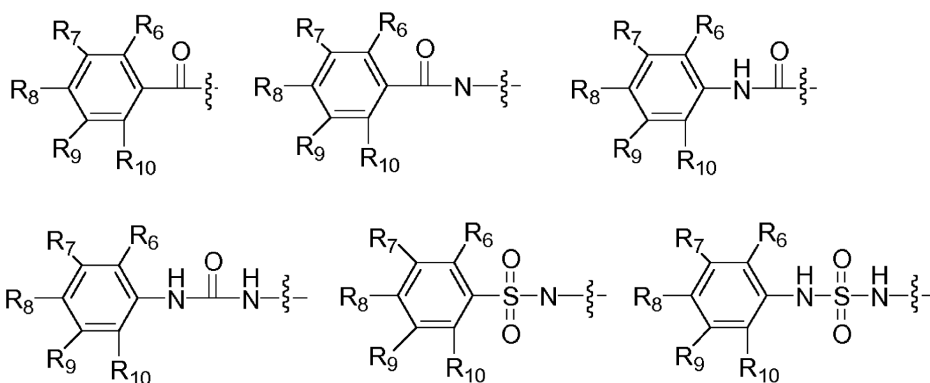


5 y



en la que R es hidrógeno, alquilo inferior, o amidino;
 en la que R1, R2, R4, R5 es independientemente hidrógeno, hidroxilo, alcoxi inferior, amino o halógeno;
 y
 en la que R3 es alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, ariloxi, o un grupo seleccionado de los siguientes:

10



siendo R6-R10 independientemente hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno, trifluorometilo, carboxi, alcocarbonilo, amino, alquilamino, alquilcarbonilamino, alquilsulfonilamino (por ejemplo, CF₃SO₂NH-, CH₃SO₂NH-) y tetrazol.

15

101. El método de la cláusula 100, en el que el agente es balanól.

102. El método de la cláusula 100, en el que el agente es una variante de balanól.

20

103. El método de la cláusula 102, en el que la variante de balanól se selecciona del grupo que consiste en balanól-7R, 14-descarboxi-balanól, 10-desoxi-balanól, balanól unido a un péptido portador y una variante de balanól unida a un péptido portador.

25

104. El método de la cláusula 95, en el que el agente es Rp-8-pCPT-cGMPS unido a un péptido portador.

105. El método de cláusula 95, en el que el agente es una molécula de ácido nucleico antisentido o ARNi que inhibe

la expresión de la proteína quinasa G.

8. Referencias

- 5 Abdulla F A, Smith P A (2001) Axotomy- and autotomy-induced changes in the excitability of rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 85: 630-643.
- Alberini C M, Ghirardi M, Metz R, Kandel E R (1994) C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell* 76: 1099-1114.
- 10 Ambron R T, Walters E T (1996) Priming events and retrograde injury signals. A new perspective on the cellular and molecular biology of nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 13: 61-79.
- Ambron R T, Schmied R, Huang C, Smedman M (1992) A signal sequence mediates the retrograde transport of proteins from the axon periphery to the cell body and then into the nucleus. *J Neurosci* 12: 2813-2818.
- 15 Ambron R T, Dulin M F, Zhang X P, Schmied R, Walters E T (1995) Axoplasm enriched in a protein mobilized by nerve injury induces memory like alterations in *Aplysia* neurons. *J Neurosci* 15: 3440-3446.
- Ambron RT, Zhang XP, Gunstream JD, Povelones M, Walters ET (1996) Intrinsic injury signals enhance growth, survival, and excitability of *Aplysia* neurons. *J Neurosci* 16: 7469-7477.
- 20 Antonov I, Antonova I, Kandel ER, Hawkins RD (2003) Activity-dependent presynaptic facilitation and hebbian LTP are both required and interact during classical conditioning in *Aplysia*. *Neuron* 37: 135-147.
- 25 Bartsch D, Ghirardi M, Skehel PA, Karl KA, Herder SP, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1995) *Aplysia* CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell* 83: 979-992.
- 30 Bedi SS, Salim A, Chen S, Glanzman DL (1998) Long-term effects of axotomy on excitability and growth of isolated *Aplysia* sensory neurons in cell culture: potential role of cAMP. *J Neurophysiol* 79: 1371-1383.
- Billy AJ, Walters ET (1989) Long-term expansion and sensitization of mechanosensory receptive fields in *Aplysia* support an activity-dependent model of whole-cell sensory plasticity. *J Neurosci* 9: 1254-1262.
- 35 Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 682-685.
- Brunet JF, Shapiro E, Foster SA, Kandel ER, Iino Y (1991) Identification of a peptide specific for *Aplysia* sensory neurons by PCR-based differential screening. *Science* 252: 856-859.
- 40 Bryan J (2004) Transdermal drug delivery may be a common technique in the future. *Pharmaceutical J*. 273: 292-293.
- Byrne JH, Kandel ER (1996) Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci* 16: 425-435.
- 45 Cha H, Shapiro P (2001) Tyrosine-phosphorylated extracellular signal regulated kinase associates with the Golgi complex during G2/M phase of the cell cycle: evidence for regulation of Golgi structure. *J Cell Biol* 153: 1355-1367.
- Chain DG, Casadio A, Schacher S, Hegde AN, Valbrun M, Yamamoto N, Goldberg AL, Bartsch D, Kandel ER, Schwartz JH (1999) Mechanisms for generating the autonomous cAMP-dependent protein kinase required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* 22: 147-156.
- 50 Chen Y, Devor M (1998) Ectopic mechanosensitivity in injured sensory axons arises from the site of spontaneous electrogenesis. *Eur J Pain* 2: 165-178.
- 55 Clatworthy AL, Grose E (1999) Immune-mediated alterations in nociceptive sensory function in *Aplysia californica*. *J Exp Biol* 202: 623-630.
- Clatworthy AL, Illich PA, Castro GA, Walters ET (1995) Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 184: 5-8.
- 60 Crown ED, Ye Z, Johnson KM, XU GY, AcAdoo DJ, Westlund KN, Hulsebosch CE (2005) Upregulation of the phosphorylated form of CREB in spinothalamic tract cells following spinal cord injury: relation to central neuropathic pain. *Neurosci Lett* 384: 139-144.
- 65 Dagan D, Levitan IB (1981) Isolated identified *Aplysia* neurons in cell culture. *J Neurosci* 1: 736-740.

- Dale N, Schacher S, Kandel ER (1988) Long-term facilitation in *Aplysia* involves increase in transmitter release. *Science* 239: 282-285.
- 5 Dash PK, Tian LM, Moore AN (1998) Sequestration of cAMP response element-binding proteins by transcription factor decoys causes collateral elaboration of regenerating *Aplysia* motor neuron axons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8339-8344.
- 10 DesGroseillers L, Auclair D, Wickham L, Maalouf M (1994) A novel actin cDNA is expressed in the neurons of *Aplysia californica*. *Biochim Biophys Acta* 1217: 322-324.
- Farr M, Mathews J, Zhu DF, Ambron RT (1999) Inflammation causes a long-term hyperexcitability in the nociceptive sensory neurons of *Aplysia*. *Learn Mem* 6: 331340.
- 15 Farr M, Zhu DF, Povelones M, Valcich D, Ambron RT (2001) Direct interactions between immunocytes and neurons after axotomy in *Aplysia*. *J Neurobiol* 46: 89-96,
- Fiallos-Estrada CE, Kummer W, Mayer B, Bravo R, Zimmermann M, Herdegen T (1993) Long-lasting increase of nitric oxide synthetase immunoreactivity, NADPH-diaphorase reaction and c-JUN co-expression in rat dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve transection. *Neurosci Lett* 150: 169-173.
- 20 Francis SH, Corbin JD (1994) Structure and function of cyclic nucleotide dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* 56: 237-272.
- 25 Ghirardi M, Braha O, Hochner B, Montarolo PG, Kandel ER, Dale N (1992) Roles of PKA and PKC in facilitation of evoked and spontaneous transmitter release at depressed and nondepressed synapses in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 9: 479-489.
- Glanzman DL, Kandel ER, Schacher S (1989) Identified target motor neuron regulates neurite outgrowth and synapse formation of *Aplysia* sensory neurons *in vitro*. *Neuron* 3: 441-450.
- 30 Glass DB, Krebs EG (1982) Phosphorylation by guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase of synthetic peptide analogs of a site phosphorylated in histone H2B. *J Biol Chem* 257: 1196-1200.
- 35 Goldsmith BA, Abrams TW (1992) cAMP modulates multiple K⁺ currents, increasing spike duration and excitability in *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11481-11485.
- Gracely RH, Lynch SA, Bennett GJ (1992) Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. *Pain* 51: 175-194.
- 40 Griffiths C, Wykes V, Bellamy TC, Garthwaite J. (2003) A new and simple method for delivering clamped nitric oxide concentrations in the physiological range: application to activation of guanylyl cyclase-coupled nitric oxide receptors. *Mol Pharmacol*. 64(6): 1349-56.
- 45 Gudi T, Lohmann SM, Pilz RB (1997) Regulation of gene expression by cyclic GMP-dependent protein kinase requires nuclear translocation of the kinase: identification of a nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 17: 5244-5254.
- Gunstream JD, Castro GA, Walters ET (1995) Retrograde transport of plasticity signals in *Aplysia* sensory neurons following axonal injury. *J Neurosci* 15: 439-448.
- 50 Hall KU, Collins SP, Gamm DM, Massa E, DePaoli-Roach AA, Uhler MD (1999) Phosphorylation-dependent inhibition of protein phosphatase-1 by G-substrate. A Purkinje cell substrate of the cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 274: 3485-3495.
- Hanz S, Perlson E, Willis D, Zheng JQ, Massarwa R, Huerta JJ, Koltzenburg M, Kohler M, van-Minnen J, Twiss JL, Fainzilber M (2003) Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron* 40: 1095-1104.
- 55 Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US92/07124, Publicación No. W093/03730.
- 60 Ji RR, Woolf CJ (2001) Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis* 8: 1-10.
- Johanson SO, Crouch MF, Hendry IA (1995) Retrograde axonal transport of signal transduction proteins in rat sciatic nerve. *Brain Res* 690: 55-63.
- 65 Karin M (1994) Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 6: 415-424.

- Kim YI, Na HS, Kim SH, Han HC, Yoon YW, Sung B, Nam HJ, Shin SL, Hong SK (1998) Cell type-specific changes of the membrane properties of peripherally-axotomized dorsal root ganglion neurons in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 86: 301-309.
- 5 LaMotte RH, Shain CN, Simone DA, Tsai EFP (1991) Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. *J Neurophysiol* 66: 190-211.
- Lee JH, Orice RH, Williams FG, Mayer B, Beitz AJ (1993) Nitric oxide synthase is found in some spinothalamic neurons and in neuronal processes that appose spinal neurons that express Fos induced by noxious stimulation. *Brain Res* 10 608: 324-333.
- Lewin MR, Walters ET (1999) Cyclic GMP pathway is critical for inducing long-term sensitization of nociceptive sensory neurons. *Nat Neurosci* 2: 18-23.
- 15 Liao X, Gunstream JD, Lewin MR, Ambron RT, Walters ET (1999) Activation of protein kinase A contributes to the expression but not the induction of long-term hyperexcitability caused by axotomy of *Aplysia* sensory neurons. *J Neurosci* 19: 12471256.
- Lin H, Bao J, Sung YJ, Walters ET, Ambron RT (2003) Rapid electrical and delayed molecular signals regulate the serum response element after nerve injury: convergence of injury and learning signals. *J Neurobiol* 57: 204-220.
- 20 Mai *et al.* (2002) Efficiency of protein transduction is cell type-dependent and is enhanced by dextran sulfate. *J Biol Chem* 277: 30208-30218.
- 25 Marais R, Wynne J, Treisman R (1993) The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73: 381-393.
- Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad M, Casadio A, Zhu H, Kandel ER (1997) MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* 18: 899-912.
- 30 Michael D, Martin KC, Seger R, Ning MM, Baston R, Kandel ER (1998) Repeated pulses of serotonin required for long-term facilitation activate mitogen-activated protein kinase in sensory neurons of *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1864-1869,
- 35 Mo E, Amin H, Bianco IH, Garthwaite J. (2004) Kinetics of a cellular nitric oxide/cGMP/phosphodiesterase-5 pathway. *J Biol Chem.* 279(25): 26149-58.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57: 1-164.
- 40 Monfort P, Munoz MD, Kosenko E, Felipe V (2002) Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase. *J Neurosci* 22: 10116-10122.
- Moroz LL, Chen D, Gillette MU, Gillette R (1996) Nitric oxide synthase activity in the molluscan CNS. *J Neurochem* 66: 873-876.
- 45 Muller U, Carew TJ (1998) Serotonin induces temporally and mechanistically distinct phases of persistent PKA activity in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 21: 1423-1434.
- Palecek J, Paleckova V, Willis WD (2003) Fos expression in spinothalamic and postsynaptic dorsal column neurons following noxious visceral and cutaneous stimuli. *Pain* 104: 249-257.
- 50 Park SY, Choi JY, Kim RU, Lee YS, Cho HJ, Kim DS (2003) Down regulation of voltage-gated potassium channel a gene expression by axotomy and neurotrophins in rat dorsal root ganglia. *Mol Cells* 16: 256-259.
- 55 Sarjeant JM, Lawrie A, Kinnear C, Yablonsky S, Leung W, Massaelli H, Prichett W, Veinrot IP, Rossart E, Rabinovitch M (2003) Apolipoprotein D inhibits platelet derived growth factor BB-induced vascular proliferation [sic] by preventing translocation of phosphorylated signal regulated kinase 1/2 to the nucleus. *Arterioscler. Throm. Vase. Biol.* 23: 2172-2177.
- 60 Pohler D, Butt E, Meissner J, Muller S, Lohse M, Walter U, Lohmann SM, Jarchau T (1995) Expression, purification, and characterization of the cGMP-dependent protein kinases I and II using the baculovirus system. *FEBS Lett* 374: 419-425.
- Schlossmann I, Feil R, Hofmann F (2003) Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med* 35: 21-27.
- 65

- Schmied R, Ambron RT (1997) Anuclear localization signal targets proteins to the retrograde transport system, thereby evading uptake into organelles in *Aplysia* axons. *J Neurobiol* 33: 151-160.
- 5 Schmied R, Huang CC, Zhang XP, Ambron DA, Ambron RT (1993) Endogenous axoplasmic proteins and proteins containing nuclear localization signal sequences use the retrograde axonal transport/nuclear import pathway in *Aplysia* neurons. *J Neurosci* 13: 4064-4071,
- Scholz KP, Byrne JH (1988) Intracellular injection of cAMP induces a long term reduction of neuronal K⁺ currents. *Science* 240: 1664-1666.
- 10 Scott JD (1991) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Pharmacol Ther* 50: 123-145.
- Setyawan J, Koide K, Diller TC, Bunnage ME, Taylor SS, Nicolaou KC, Brunton LL (1999) Inhibition of protein kinases by balanol: specificity within the serine/threonine protein kinase subfamily. *Mol Pharmacol*. 56(2): 370-6.
- 15 Smith AR, Visioli F, Hagen TM (2002) Vitamin C matters: increased oxidative stress in cultured human aortic endothelial cells without supplemental ascorbic acid. *FASEB J* 10.1096/fj.01-0825fje.
- Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Honig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H, Walter U (1998) Analysis and regulation of vasodilator stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation *in vitro* and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem* 273: 20029-20035.
- 20 Study RE, Kral MG (1996) Spontaneous action potential activity in isolated dorsal root ganglion neurons from rats with a painful neuropathy. *Pain* 65: 235-242.
- 25 Sung YJ, Ambron RT (2004) Pathways that elicit long-term changes in gene expression in nociceptive neurons following nerve injury: contributions to neuropathic pain. *Neurol Res* 26: 195-203.
- Sung YJ, Hwang MC, Hwang YW (1996) The dominant negative effects of H-Ras harboring a Gly to Ala mutation at position 60. *J Biol Chem* 271: 30537-30543.
- 30 Sung YJ, Conti J, Currie JR, Brown WT, Denman RB (2000) RNAs that interact with the fragile X syndrome RNA binding protein FMRP. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 973-980.
- 35 Sung YJ, Povelones M, Ambron RT (2001) RISK-1: a novel MAPK homologue in axoplasm that is activated and retrogradely transported after nerve injury. *J Neurobiol* 47: 67-79.
- Sung YJ, Dolzhanskaya N, Nolin SL, Brown T, Currie JR, Denman RB (2003) The fragile X mental retardation protein FMRP binds elongation factor 1A mRNA and negatively regulates its translation *in vivo*. *J Biol Chem* 278: 15669-15678.
- 40 Sung YJ and Ambron, RT (March 22, 2004) Pathways that elicit long-term changes in gene expression in nociceptive neurons following nerve injury: contributions to neuropathic pain. *Neurological Research* 26: 195-203.
- Sung, YJ, Walters, ET and Ambron, RT (25 de agosto de 2004) A neuronal isoform of protein Iknase G couples mitogen-activated protein kinase nuclear import to axotomy-induced long-term hyperexcitability in *Aplysia* sensory neurons. *J. Neurosci.* 24(34): 7583-7595.
- 45 Sutton MA, Carew TJ (2000) Parallel molecular pathways mediate expression of distinct forms of intermediate-term facilitation at tail sensory motor synapses in *Aplysia*. *Neuron* 26: 219-231.
- 50 Ungless MA, Gasull X, Walters ET (2002) Long-term alteration of S-type potassium current and passive membrane properties in *Aplysia* sensory neurons following axotomy. *J Neurophysiol* 87: 2408-2420.
- Patente de Estados Unidos 4.708.716 de Sibalis, D. Transdermal drug applicator. Presentada el 16 de septiembre de 1985 y publicada el 24 de noviembre de 1987.
- 55 Patente de Estados Unidos No. 5.405.614 de D'Angelo, JP y Schur, H. Electronic transdermal drug delivery system. Presentada el 11 de enero de 1993 y publicada el 11 de abril de 1995.
- Patente de Estados Unidos No. 6.476.007 de Tao, Y y Johns, RA. Isoform-specific inhibition for treatment of pain and reduction of anesthetic threshold. Presentada el 8 de diciembre de 2000 y publicada el 5 de noviembre de 2002.
- 60 Urban MO y Gebhart GF (1999) Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7687-7692.
- Urban MO y Gebhart GF (1998) The glutamate synapse: a target in the pharmacological management of hyperalgesic pain states. *Prog Brain Res* 116: 407420.
- 65

- Verge VM, Xu Z, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T (1992) Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11617-11621.
- 5 Wall PD, Devor M (1983) Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. *Pain* 17: 321-339.
- Walters ET (1994) Injury-related behavior and neuronal plasticity: an evolutionary perspective on sensitization, hyperalgesia, and analgesia. *Int Rev Neurobiol* 36: 325-427.
- 10 Walters ET, Byrne JH, Carew TJ, Kandel ER (1983a) Mechanoafferent neurons innervating tail of *Aplysia*. I. Response properties and synaptic connections. *J Neurophysiol* 50: 1522-1542.
- 15 Walters ET, Byrne JH, Carew TJ, Kandel ER (1983b) Mechanoafferent neurons innervating tail of *Aplysia*. II. Modulation by sensitizing stimulation. *J Neurophysiol* 50: 1543-1559.
- Walters ET, Alizadeh H, Castro GA (1991) Similar neuronal alterations induced by axonal injury and learning in *Aplysia*. *Science* 253: 797-799.
- 20 Walters ET, Bodnarova M, Billy AJ, Dulin MF, Diaz-Rios M, Miller MW, Moroz LL (2004) Somatotopic organization and functional properties of mechanosensory neurons expressing sensorin-A mRNA in *Aplysia californica*. *J Comp Neurol* 471: 219-240.
- 25 Wang H, Sun H, Della Penna K, Benz RJ, Xu J, Gerhold DL, Holder DJ, Koblan KS (2002) Chronic neuropathic pain is accompanied by global changes in gene expression and shares pathobiology with neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 114: 529-546.
- Waxman SG, Kocsis JD, Black JA (1994) Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol* 72: 466-470.
- 30 Wenderet *et al.* (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13003-13008.
- 35 Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ (1995) Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 269: 403-407.
- Woolf CJ (1983) Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306: 686-688.
- 40 Xu S, Robbins D, Frost J, Dang A, Lange-Carter C, Cobb MH (1995) MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogenactivated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6808-6812.
- Yang Z, Madinova A, Kozai T, Joch H, Aebi U, Luscher TF (2002) Felodipine inhibits nuclear translocation of p42/44 mitogen-activated protein kinase and human smooth muscle growth. *Cardiovasc. Res.* 53(1): 227-231.
- 45 Yao Z, Dolginov Y, Hanoch T, Yung Y, Ridner G, Lando Z, Zharhary D, Seger R (2000) Detection of partially phosphorylated forms of ERK by monoclonal antibodies reveals spatial regulation of ERK activity by phosphatases. *FEBS Lett* 468: 37-42.
- Zaragoza C, Soria E, Lopez E, Browning D, Balbin M, Lopez-Otin C, Lamas S (2002) Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. *Mol Pharmacol* 62: 927-935.
- 50 Zhang H, Xie W, Xie Y (2005) Spinal cord injury triggers sensitization of wide dynamic range dorsal horn neurons in segments rostral to injury. 2 de agosto de 2005 *Brain Res*, epub antes de imprimir. PMID 16083864.
- 55 Zhang JM, Donnelly DF, Song XJ, Lamotte RH (1997) Axotomy increases the excitability of dorsal root ganglion cells with unmyelinated axons. *J Neurophysiol* 78: 2790-2794.
- Zhang JM, Song XJ, LaMotte RH (1999) Enhanced excitability of sensory neurons in rats with cutaneous hyperalgesia produced by chronic compression of the dorsal root ganglion. *J Neurophysiol* 82: 3359-3366.
- 60 Zhang X, Verge V, Wiesenfeld-Hallin Z, Ju G, Bredt D, Synder SH, Hokfelt T (1993) Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 335: 563-575.
- 65 Zhou B, Zhang ZY (2002) The activity of the extracellular signal-regulated kinase 2 is regulated by the differential phosphorylation in the activation loop. *J. Biol Chem* 277: 13889-13899.

Zimmermann M (2001) Pathobiology of neuropathic pain. Eur J Pharmacol 429: 23-37.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Trustees of Columbia University in the City of New York
 Ambron, Richard
 Sung, Ying-Ju
 Landry, Donald W
 Deng, Shi-Xian
 <120> Nueva ruta del dolor neuronal

<130> 070050.3090

10 <140> A asignar
 <141> 21-03-2006

<150> 60/713.435
 <151> 01-09-2005

15 <150> 60/664.071
 <151> 21-03-2005

<160> 59
 <170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> y= t o c

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> y= t o c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(6)
 <223> y= t o c

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n= a o c o g o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n=inosina

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n= a o c o g o t

	<p><400> 1 tayaaytgya cnmgnacngc</p>	20
	<p><210> 2 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
5	<p><220> <223> Oligonucleótido sintético</p>	
	<p><220> <221> misc_feature <222> (3)..(3) <223> r= g o a</p>	
10	<p><220> <221> misc_feature <222> (6)..(6) <223> r= g o a</p>	
	<p><220> <221> misc_feature <222> (9)..(9) <223> n= a o c o g o t</p>	
15	<p><220> <221> misc_feature <222> (15)..(15) <223> n= a o c o g o t</p>	
	<p><220> <221> misc_feature <222> (18)..(18) <223> y= t o c</p>	
20	<p><400> 2 ccrcaraang tccangtytt</p>	20
	<p><210> 3 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
25	<p><220> <223> Oligonucleótido sintético</p>	
	<p><400> 3 cgccctgtcca gcacccatag cg</p>	22
	<p><210> 4 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
30	<p><220> <223> Oligonucleótido sintético</p>	
35	<p><400> 4 gggtgaccgc tttcacggag g</p>	21
	<p><210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
40		

	<p><220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 5 cggcaagggtt ctgctgcgcc</p>	20
5	<p><210> 6 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 6 ggacgcgagg ggatacgtc</p>	19
10	<p><210> 7 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
15	<p><220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 7 ggtggaggag atagcggcgg ttctgtgaac gcc</p>	33
20	<p><210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
	<p><220> <223> Oligonucleótido sintético <400> 8 ggaggagtga gggtcagatc c</p>	21
25	<p><210> 9 <211> 2202 <212> ADN <213> <i>Aplysia californica</i></p>	
30	<p><220> <221> CDS <222> (1)..(2202) <223> ARNm de PKG de <i>Aplysia californica</i>, ficha técnica (CDS, <i>Core Data Sheet</i>) completa</p>	
	<p><400> 9 atg ggc aac ggt gcc agt tcg aac acg cac ttc acc ata gac ggt gag Met Gly Asn Gly Ala Ser Ser Asn Thr His Phe Thr Ile Asp Gly Glu</p>	48

ES 2 696 598 T3

1	5				10				15							
tcg Ser	atg Met	gac Asp	ggt Val 20	cac His	aaa Lys	gtc Val	aag Lys	gcg Ala 25	ttg Leu	gtc Val	cca Pro	gag Glu	ctc Leu 30	cgg Arg	cat His	96
gag Glu	ctc Leu	aga Arg 35	cgg Arg	cgg Arg	gat Asp	aag Lys	atc Ile 40	atc Ile	gag Glu	cag Gln	tac Tyr	gac Asp 45	tcg Ser	caa Gln	gtg Val	144
cga Arg	cag Gln 50	aag Lys	gac Asp	gag Glu	ttg Leu	ctg Leu 55	aaa Lys	gaa Glu	aaa Lys	gaa Glu	gcg Ala 60	gag Glu	atc Ile	gct Ala	cgc Arg	192
ctc Leu 65	aaa Lys	gaa Glu	gag Glu	ggt Val	cac His 70	aag Lys	ctg Leu	aaa Lys	tcg Ser	ggt Val 75	ctg Leu	cag Gln	ctc Leu	aaa Lys	gtg Val 80	240
gac Asp	acg Thr	ctg Leu	aaa Lys	gcc Ala 85	cag Gln	gag Glu	agt Ser	aag Lys	cca Pro 90	gac Asp	ctc Leu	ctg Leu	tcc Ser	act Thr 95	atc Ile	288
gac Asp	gaa Glu	aac Asn	cag Gln 100	gcc Ala	gag Glu	cct Pro	act Thr	gct Ala 105	cct Pro	cgt Arg	ggc Gly	cct Pro	gct Ala 110	aaa Lys	aag Lys	336
cag Gln	ggt Gly	gtg Val 115	tcg Ser	gga Gly	gag Glu	agc Ser	ccc Pro 120	agc Ser	tca Ser	aag Lys	acc Thr	ctg Leu 125	ggc Gly	tat Tyr	gtg Val	384
gat Asp	cta Leu 130	aca Thr	cac His	cac His	gaa Glu	aag Lys 135	gat Asp	ttc Phe	aaa Lys	tcg Ser	aaa Lys 140	cag Gln	cta Leu	atc Ile	aaa Lys	432
gac Asp 145	gcc Ala	atc Ile	ttg Leu	agc Ser	aac Asn 150	gag Glu	ttc Phe	atc Ile	aaa Lys 155	gtg Val	cta Leu	gcg Ala	gcc Ala	acg Thr	cag Gln 160	480
ctc Leu	cgg Arg	gag Glu	atc Ile 165	atc Ile	gac Asp	tgc Cys	atg Met	tac Tyr 170	gag Glu	aag Lys	cgc Arg	gtg Val	ccc Pro	aag Lys 175	gcg Ala	528
tgc Cys	tac Tyr	att Ile 180	atc Ile	aag Lys	gga Gly	gga Gly	gag Glu	cgg Arg 185	ggc Gly	gag Glu	cat His	ctc Leu	tat Tyr 190	gtc Val	tgc Cys	576
gca Ala	gat Asp	ggt Gly 195	ctc Leu	ctg Leu	gag Glu	gtg Val	cat His 200	aag Lys	gag Glu	gac Asp	aag Lys	agg Arg 205	ctg Leu	gga Gly	gaa Glu	624
atc Ile	aag Lys 210	tcc Ser	ggg Gly	ggc Gly	ctc Leu	ttc Phe 215	ggc Gly	gag Glu	ctc Leu	gcc Ala	ata Ile 220	ctg Leu	tac Tyr	aac Asn	tgt Cys	672
aag Lys 225	cgg Arg	acc Thr	gcc Ala	tcc Ser	gtg Val 230	aaa Lys	gcg Ala	gtc Val	acc Thr	cac His 235	act Thr	acg Thr	cta Leu	tgg Trp	gtg Val 240	720
ctg Leu	gac Asp	agg Arg	cga Arg	gtg Val 245	ttc Phe	cag Gln	gcc Ala	att Ile	atg Met 250	atg Met	aaa Lys	acc Thr	gga Gly	cta Leu 255	cag Gln	768
agg Arg	agg Arg	gag Glu	gag Glu	aat Asn	atg Met	gcc Ala	ttc Phe	ctc Leu	aaa Lys	agc Ser	gtg Val	cct Pro	ttg Leu	ctc Leu	aaa Lys	816

ES 2 696 598 T3

260			265			270										
aac Asn	ctg Leu	cct Pro 275	tcc Ser	gac Asp	aaa Lys	ctg Leu	gcc Ala 280	aag Lys	atg Met	tct Ser	gat Asp	gtc Val 285	cta Leu	gaa Glu	tac Tyr	864
gat Asp	ttc Phe 290	ttc Phe	cac His	gag Glu	aac Asn	gaa Glu 295	tat Tyr	atc Ile	atc Ile	aga Arg	gaa Glu 300	ggg Gly	gca Ala	gct Ala	ggt Gly	912
gac Asp 305	acg Thr	ttc Phe	ttc Phe	atc Ile	ctg Leu 310	aac Asn	aag Lys	gga Gly	gag Glu	gtc Val 315	aag Lys	gtc Val	acc Thr	cag Gln	aaa Lys 320	960
att Ile	gca Ala	ggt Gly	cat His	gca Ala 325	gag Glu	cct Pro	aaa Lys	gaa Glu	gtg Val 330	cgc Arg	cga Arg	cta Leu	aag Lys	agg Arg 335	ggt Gly	1008
gat Asp	tac Tyr	ttt Phe	gga Gly 340	gaa Glu	aaa Lys	gcg Ala	tta Leu	tta Leu 345	agt Ser	gaa Glu	gat Asp	agg Arg 350	agg Arg	aca Thr	gcc Ala	1056
aac Asn	gtg Val	atc Ile 355	gct Ala	cta Leu	cct Pro	cct Pro	ggt Gly 360	ggt Val	gaa Glu	tgt Cys	ctc Leu	acc Thr 365	gtg Val	gac Asp	aga Arg	1104
gag Glu	tct Ser 370	ttc Phe	acc Thr	cag Gln	ttt Phe	gtc Val 375	ggt Gly	gac Asp	ctc Leu	aac Asn	gaa Glu 380	ctt Leu	cgc Arg	aac Asn	aaa Lys	1152
gac Asp 385	tat Tyr	ggc Gly	gac Asp	gaa Glu	gcc Ala 390	cgg Arg	gga Gly	gca Ala	gaa Glu	cgg Arg 395	cgt Arg	agc Ser	ggc Gly	agc Ser	gac Asp 400	1200
agt Ser	acc Thr	gta Val	tcc Ser	cca Pro 405	gtg Val	tcg Ser	gag Glu	cga Arg	cca Pro 410	gtg Val	gcc Ala	aaa Lys	gag Glu	ttt Phe 415	gag Glu	1248
aat Asn	tgc Cys	tcc Ser	ctg Leu 420	gac Asp	gac Asp	cta Leu	cag Gln	ctg Leu 425	gtc Val	acc Thr	act Thr	ctg Leu 430	ggc Gly 430	atg Met	gga Gly	1296
ggc Gly	ttc Phe	gga Gly 435	cgt Arg	ggt Val	gag Glu	ctg Leu	ggt Val 440	cag Gln	ctg Leu	agt Ser	aaa Lys	gaa Glu 445	aag Lys	ggc Gly	aaa Lys	1344
acg Thr	ttc Phe 450	gcc Ala	ctg Leu	aaa Lys	tgt Cys	ctg Leu 455	aag Lys	aag Lys	aag Lys	cac His	atc Ile 460	gtg Val	gag Glu	acg Thr	agg Arg	1392
cag Gln 465	cag Gln	gag Glu	cac His	atc Ile	tac Tyr 470	tcg Ser	gag Glu	aag Lys	aag Lys	atc Ile 475	atg Met	atg Met	gag Glu	gcg Ala	gac Asp 480	1440
tct Ser	cct Pro	ttc Phe	ata Ile	acg Thr 485	aag Lys	ctc Leu	cac His	aag Lys	acc Thr 490	ttc Phe	cgc Arg	gac Asp	cgg Arg	aag Lys 495	tac Tyr	1488
gtg Val	tac Tyr	atg Met	ttg Leu 500	atg Met	gag Glu	gtg Val	tgt Cys	ctg Leu 505	ggc Gly	ggg Gly	gag Glu	ctg Leu	tgg Trp 510	acc Thr	att Ile	1536
ctc Leu	aga Arg	gac Asp	agg Arg	ggt Gly	aac Asn	ttt Phe	gac Asp	gac Asp	ttg Leu	acg Thr	gca Ala	agg Arg	ttc Phe	tgc Cys	gtc Val	1584

ES 2 696 598 T3

515					520					525						
gcc	tgt	gtg	tta	gag	gct	ttc	tcc	tac	ctg	cat	gcc	aaa	gga	atc	att	1632
Ala	Cys	Val	Leu	Glu	Ala	Phe	Ser	Tyr	Leu	His	Ala	Lys	Gly	Ile	Ile	
	530					535				540						
tac	agg	gat	ctc	aaa	cca	gaa	aat	ctt	cta	ctg	gac	gcg	agg	gga	tac	1680
Tyr	Arg	Asp	Leu	Lys	Pro	Glu	Asn	Leu	Leu	Leu	Asp	Ala	Arg	Gly	Tyr	
545					550					555					560	
gtc	aaa	ttg	gtg	gac	ttc	ggg	ttc	gcc	aag	aag	atc	ggc	gtg	ggg	aag	1728
Val	Lys	Leu	Val	Asp	Phe	Gly	Phe	Ala	Lys	Lys	Ile	Gly	Val	Gly	Lys	
				565					570					575		
aag	acg	tgg	aca	ttc	tgc	ggc	acg	ccg	gag	tac	gtc	gct	ccg	gag	atc	1776
Lys	Thr	Trp	Thr	Phe	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Tyr	Val	Ala	Pro	Glu	Ile	
			580					585					590			
att	ctc	aac	aag	ggc	cac	gac	cac	tcg	gcc	gac	tac	tgg	tcg	ctg	ggt	1824
Ile	Leu	Asn	Lys	Gly	His	Asp	His	Ser	Ala	Asp	Tyr	Trp	Ser	Leu	Gly	
		595					600					605				
atc	ctc	atg	tat	gag	ctg	ctc	aat	gga	acg	ccc	ccg	ttc	tcc	ggg	tca	1872
Ile	Leu	Met	Tyr	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Pro	Pro	Phe	Ser	Gly	Ser	
	610					615					620					
gat	cct	atg	cgg	acg	tac	aac	atc	att	ctg	aag	ggc	atc	gac	cac	att	1920
Asp	Pro	Met	Arg	Thr	Tyr	Asn	Ile	Ile	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	His	Ile	
625					630					635					640	
gaa	ttc	ccc	aag	aaa	att	agc	cgc	agt	gca	cat	gta	ctt	atc	aag	aaa	1968
Glu	Phe	Pro	Lys	Lys	Ile	Ser	Arg	Ser	Ala	His	Val	Leu	Ile	Lys	Lys	
				645					650					655		
ctg	tgc	cga	gac	aac	ccc	atg	gaa	cga	ctg	gga	tat	ggg	aag	aat	gga	2016
Leu	Cys	Arg	Asp	Asn	Pro	Met	Glu	Arg	Leu	Gly	Tyr	Gly	Lys	Asn	Gly	
			660					665					670			
atc	agt	gac	att	agg	aag	aat	aag	tgg	ttc	caa	ggc	ttt	gac	tgg	gat	2064
Ile	Ser	Asp	Ile	Arg	Lys	Asn	Lys	Trp	Phe	Gln	Gly	Phe	Asp	Trp	Asp	
		675				680						685				
gga	tta	atg	gat	ctg	acc	ctc	act	cct	cca	att	gtg	ccc	aag	gtg	aaa	2112
Gly	Leu	Met	Asp	Leu	Thr	Leu	Thr	Pro	Pro	Ile	Val	Pro	Lys	Val	Lys	
	690					695					700					
aat	cct	aca	gat	aca	agt	aac	ttc	gat	tcc	tac	ccc	cgc	gac	atg	gat	2160
Asn	Pro	Thr	Asp	Thr	Ser	Asn	Phe	Asp	Ser	Tyr	Pro	Arg	Asp	Met	Asp	
705					710					715					720	
ata	gct	gca	gac	gag	tta	tcc	ggc	tgg	gac	att	gat	ttc	tga			2202
Ile	Ala	Ala	Asp	Glu	Leu	Ser	Gly	Trp	Asp	Ile	Asp	Phe				
				725					730							

<210> 10
 <211> 733
 <212> PRT
 <213> *Aplysia californica*

5

<400> 10

Met Gly Asn Gly Ala Ser Ser Asn Thr His Phe Thr Ile Asp Gly Glu
 1 5 10 15

ES 2 696 598 T3

Ser Met Asp Val₂₀ His Lys Val Lys Ala₂₅ Leu Val Pro Glu Leu₃₀ Arg His
 Glu Leu Arg₃₅ Arg Arg Asp Lys Ile₄₀ Ile Glu Gln Tyr Asp₄₅ Ser Gln Val
 Arg Gln₅₀ Lys Asp Glu Leu Leu₅₅ Lys Glu Lys Glu Ala₆₀ Glu Ile Ala Arg
 Leu Lys Glu Glu Val₇₀ His Lys Leu Lys Ser Val₇₅ Leu Gln Leu Lys Val₈₀
 Asp Thr Leu Lys Ala₈₅ Gln Glu Ser Lys Pro₉₀ Asp Leu Leu Ser Thr Ile
 Asp Glu Asn Gln₁₀₀ Ala Glu Pro Thr Ala₁₀₅ Pro Arg Gly Pro Ala₁₁₀ Lys Lys
 Gln Gly Val₁₁₅ Ser Gly Glu Ser Pro Ser Ser Lys Thr Leu₁₂₅ Gly Tyr Val
 Asp Leu₁₃₀ Thr His His Glu Lys₁₃₅ Asp Phe Lys Ser Lys₁₄₀ Gln Leu Ile Lys
 Asp Ala Ile Leu Ser Asn₁₅₀ Glu Phe Ile Lys Val₁₅₅ Leu Ala Ala Thr Gln₁₆₀
 Leu Arg Glu Ile Ile₁₆₅ Asp Cys Met Tyr Glu₁₇₀ Lys Arg Val Pro Lys₁₇₅ Ala
 Cys Tyr Ile Ile₁₈₀ Lys Gly Gly Glu Arg₁₈₅ Gly Glu His Leu Tyr₁₉₀ Val Cys
 Ala Asp Gly₁₉₅ Leu Leu Glu Val His₂₀₀ Lys Glu Asp Lys Arg₂₀₅ Leu Gly Glu
 Ile Lys₂₁₀ Ser Gly Gly Leu Phe₂₁₅ Gly Glu Leu Ala Ile₂₂₀ Leu Tyr Asn Cys
 Lys Arg Thr Ala Ser Val₂₃₀ Lys Ala Val Thr His₂₃₅ Thr Thr Leu Trp Val₂₄₀
 Leu Asp Arg Arg Val₂₄₅ Phe Gln Ala Ile Met₂₅₀ Met Lys Thr Gly Leu₂₅₅ Gln
 Arg Arg Glu Glu₂₆₀ Asn Met Ala Phe Leu₂₆₅ Lys Ser Val Pro Leu₂₇₀ Leu Lys

ES 2 696 598 T3

Asn Leu Pro Ser Asp Lys Leu Ala Lys Met Ser Asp Val Leu Glu Tyr
 275 280 285
 Asp Phe Phe His Glu Asn Glu Tyr Ile Ile Arg Glu Gly Ala Ala Gly
 290 295 300
 Asp Thr Phe Phe Ile Leu Asn Lys Gly Glu Val Lys Val Thr Gln Lys
 305 310 315 320
 Ile Ala Gly His Ala Glu Pro Lys Glu Val Arg Arg Leu Lys Arg Gly
 325 330 335
 Asp Tyr Phe Gly Glu Lys Ala Leu Leu Ser Glu Asp Arg Arg Thr Ala
 340 345 350
 Asn Val Ile Ala Leu Pro Pro Gly Val Glu Cys Leu Thr Val Asp Arg
 355 360 365
 Glu Ser Phe Thr Gln Phe Val Gly Asp Leu Asn Glu Leu Arg Asn Lys
 370 375
 Asp Tyr Gly Asp Glu Ala Arg Gly Ala Glu Arg Arg Ser Gly Ser Asp
 385 390 395 400
 Ser Thr Val Ser Pro Val Ser Glu Arg Pro Val Ala Lys Glu Phe Glu
 405 410 415
 Asn Cys Ser Leu Asp Asp Leu Gln Leu Val Thr Thr Leu Gly Met Gly
 420 425 430
 Gly Phe Gly Arg Val Glu Leu Val Gln Leu Ser Lys Glu Lys Gly Lys
 435 440 445
 Thr Phe Ala Leu Lys Cys Leu Lys Lys Lys His Ile Val Glu Thr Arg
 450 455 460
 Gln Gln Glu His Ile Tyr Ser Glu Lys Lys Ile Met Met Glu Ala Asp
 465 470 475 480
 Ser Pro Phe Ile Thr Lys Leu His Lys Thr Phe Arg Asp Arg Lys Tyr
 485 490 495
 Val Tyr Met Leu Met Glu Val Cys Leu Gly Gly Glu Leu Trp Thr Ile
 500 505 510
 Leu Arg Asp Arg Gly Asn Phe Asp Asp Leu Thr Ala Arg Phe Cys Val
 515 520 525

ES 2 696 598 T3

Ala Cys Val Leu Glu Ala Phe Ser Tyr Leu His Ala Lys Gly Ile Ile
 530 535 540

Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Leu Leu Leu Asp Ala Arg Gly Tyr
 545 550 555 560

Val Lys Leu Val Asp Phe Gly Phe Ala Lys Lys Ile Gly Val Gly Lys
 565 570 575

Lys Thr Trp Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Val Ala Pro Glu Ile
 580 585 590

Ile Leu Asn Lys Gly His Asp His Ser Ala Asp Tyr Trp Ser Leu Gly
 595 600 605

Ile Leu Met Tyr Glu Leu Leu Asn Gly Thr Pro Pro Phe Ser Gly Ser
 610 615 620

Asp Pro Met Arg Thr Tyr Asn Ile Ile Leu Lys Gly Ile Asp His Ile
 625 630 635 640

Glu Phe Pro Lys Lys Ile Ser Arg Ser Ala His Val Leu Ile Lys Lys
 645 650 655

Leu Cys Arg Asp Asn Pro Met Glu Arg Leu Gly Tyr Gly Lys Asn Gly
 660 665 670

Ile Ser Asp Ile Arg Lys Asn Lys Trp Phe Gln Gly Phe Asp Trp Asp
 675 680 685

Gly Leu Met Asp Leu Thr Leu Thr Pro Pro Ile Val Pro Lys Val Lys
 690 695 700

Asn Pro Thr Asp Thr Ser Asn Phe Asp Ser Tyr Pro Arg Asp Met Asp
 705 710 715 720

Ile Ala Ala Asp Glu Leu Ser Gly Trp Asp Ile Asp Phe
 725 730

<210> 11
 <211> 733
 <212> PRT
 <213> *Aplysia californica*

5

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(733)
 <223> secuencia deducida de aminoácidos de PKD de *Aplysia californica*

10

ES 2 696 598 T3

<400> 11

Met Gly Asn Gly Ala Ser Ser Asn Thr His Phe Thr Ile Asp Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Met Asp Val His Lys Val Lys Ala Leu Val Pro Glu Leu Arg His
 20 25 30

Glu Leu Arg Arg Arg Asp Lys Ile Ile Glu Gln Tyr Asp Ser Gln Val
 35 40 45

Arg Gln Lys Asp Glu Leu Leu Lys Glu Lys Glu Ala Glu Ile Ala Arg
 50 55 60

Leu Lys Glu Glu Val His Lys Leu Lys Ser Val Leu Gln Leu Lys Val
 65 70 75 80

Asp Thr Leu Lys Ala Gln Glu Ser Lys Pro Asp Leu Leu Ser Thr Ile
 85 90 95

Asp Glu Asn Gln Ala Glu Pro Thr Ala Pro Arg Gly Pro Ala Lys Lys
 100 105 110

Gln Gly Val Ser Gly Glu Ser Pro Ser Ser Lys Thr Leu Gly Tyr Val
 115 120 125

Asp Leu Thr His His Glu Lys Asp Phe Lys Ser Lys Gln Leu Ile Lys
 130 135 140

Asp Ala Ile Leu Ser Asn Glu Phe Ile Lys Val Leu Ala Ala Thr Gln
 145 150 155 160

Leu Arg Glu Ile Ile Asp Cys Met Tyr Glu Lys Arg Val Pro Lys Ala
 165 170 175

Cys Tyr Ile Ile Lys Gly Gly Glu Arg Gly Glu His Leu Tyr Val Cys
 180 185 190

Ala Asp Gly Leu Leu Glu Val His Lys Glu Asp Lys Arg Leu Gly Glu
 195 200 205

Ile Lys Ser Gly Gly Leu Phe Gly Glu Leu Ala Ile Leu Tyr Asn Cys
 210 215 220

Lys Arg Thr Ala Ser Val Lys Ala Val Thr His Thr Thr Leu Trp Val
 225 230 235 240

Leu Asp Arg Arg Val Phe Gln Ala Ile Met Met Lys Thr Gly Leu Gln

ES 2 696 598 T3

500					505					510					
Leu	Arg	Asp	Arg	Gly	Asn	Phe	Asp	Asp	Leu	Thr	Ala	Arg	Phe	Cys	Val
		515					520					525			
Ala	Cys	Val	Leu	Glu	Ala	Phe	Ser	Tyr	Leu	His	Ala	Lys	Gly	Ile	Ile
	530					535					540				
Tyr	Arg	Asp	Leu	Lys	Pro	Glu	Asn	Leu	Leu	Leu	Asp	Ala	Arg	Gly	Tyr
545					550					555					560
Val	Lys	Leu	Val	Asp	Phe	Gly	Phe	Ala	Lys	Lys	Ile	Gly	Val	Gly	Lys
				565					570					575	
Lys	Thr	Trp	Thr	Phe	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Tyr	Val	Ala	Pro	Glu	Ile
			580					585					590		
Ile	Leu	Asn	Lys	Gly	His	Asp	His	Ser	Ala	Asp	Tyr	Trp	Ser	Leu	Gly
		595					600					605			
Ile	Leu	Met	Tyr	Glu	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Pro	Pro	Phe	Ser	Gly	Ser
	610					615					620				
Asp	Pro	Met	Arg	Thr	Tyr	Asn	Ile	Ile	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	His	Ile
625					630					635					640
Glu	Phe	Pro	Lys	Lys	Ile	Ser	Arg	Ser	Ala	His	Val	Leu	Ile	Lys	Lys
				645					650					655	
Leu	Cys	Arg	Asp	Asn	Pro	Met	Glu	Arg	Leu	Gly	Tyr	Gly	Lys	Asn	Gly
			660					665					670		
Ile	Ser	Asp	Ile	Arg	Lys	Asn	Lys	Trp	Phe	Gln	Gly	Phe	Asp	Trp	Asp
		675					680					685			
Gly	Leu	Met	Asp	Leu	Thr	Leu	Thr	Pro	Pro	Ile	Val	Pro	Lys	Val	Lys
	690					695					700				
Asn	Pro	Thr	Asp	Thr	Ser	Asn	Phe	Asp	Ser	Tyr	Pro	Arg	Asp	Met	Asp
705					710					715					720
Ile	Ala	Ala	Asp	Glu	Leu	Ser	Gly	Trp	Asp	Ile	Asp	Phe			
				725					730						

<210> 12
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

	<400> 12	
	ttggcgccgc tcatgagagg atcgcacac catcaccatc acggcaacgg tgccagttcg	60
	aacacgcact tc	72
	<210> 13	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 13	
	gcaggctcta gagaaatcaa tgtcccagcc ggataactcg tc	42
	<210> 14	
	<211> 38	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 14	
	gtcgtgggat ccccatcgat agcgagacgg tcctctgt	38
	<210> 15	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 15	
	atcttgaatt cctcgagggt caaggagaac cccgctt	37
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(20)	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 16	
35	gtaccctcac aggacgagtc 20	
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	

	<p><400> 17 tccttggacc tctcttggtg</p>	20
	<p><210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
5	<p><220> <223> Oligonucleótido sintético</p>	
	<p><400> 18 aacagaaaca gtctttcccc</p>	20
	<p><210> 19 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
10	<p><220> <223> Oligonucleótido sintético</p>	
	<p><400> 19 tcttgactca ccaactgcc</p>	19
	<p><210> 20 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
15	<p><220> <223> Oligonucleótido sintético</p>	
	<p><400> 20 cagagagaag atgaccag</p>	19
	<p><210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
25	<p><220> <223> Oligonucleótido sintético</p>	
	<p><400> 21 gggtaagaga agcaagaaag</p>	20
	<p><210> 22 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial</p>	
30	<p><220> <223> Péptido sintético</p>	
35		

<400> 22

Arg Lys Ile Ser Ala Ser Gly Pro
1 5

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 23

Arg Lys Ile Ser Ala Ser Glu Phe Asp Arg Pro Leu Arg
1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 24

Arg Lys Arg Ser Arg Ala Glu
1 5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 25

Gln Lys Arg Pro Arg Arg Lys Asp Thr Pro
1 5 10

<210> 26

<211> 272

<212> PRT

<213> *Aplysia californica*

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(272)

<223> parte catalítica de PKG de *Aplysia californica*

25

<400> 26

ES 2 696 598 T3

Val Ala Lys Glu Phe Glu Asn Cys Ser Leu Asp Asp Leu Gln Leu Val
 1 5 10 15
 Thr Thr Leu Gly Met Gly Gly Phe Gly Arg Val Glu Leu Val Gln Leu
 20 25 30
 Ser Lys Glu Lys Gly Lys Thr Phe Ala Leu Lys Cys Leu Lys Lys Lys
 35 40 45
 His Ile Val Glu Thr Arg Gln Gln Glu His Ile Tyr Ser Glu Lys Lys
 50 55 60
 Ile Met Met Glu Ala Asp Ser Pro Phe Ile Thr Lys Leu His Lys Thr
 65 70 75 80
 Phe Arg Asp Arg Lys Tyr Val Tyr Met Leu Met Glu Val Cys Leu Gly
 85 90 95
 Gly Glu Leu Trp Thr Ile Leu Arg Asp Arg Gly Asn Phe Asp Asp Leu
 100 105 110
 Thr Ala Arg Phe Cys Val Ala Cys Val Leu Glu Ala Phe Ser Tyr Leu
 115 120 125
 His Ala Lys Gly Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Leu Leu
 130 135 140
 Leu Asp Ala Arg Gly Tyr Val Lys Leu Val Asp Phe Gly Phe Ala Lys
 145 150 155 160
 Lys Ile Gly Val Gly Lys Lys Thr Trp Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu
 165 170 175
 Tyr Val Ala Pro Glu Ile Ile Leu Asn Lys Gly His Asp His Ser Ala
 180 185 190
 Asp Tyr Trp Ser Leu Gly Ile Leu Met Tyr Glu Leu Leu Asn Gly Thr
 195 200 205
 Pro Pro Phe Ser Gly Ser Asp Pro Met Arg Thr Tyr Asn Ile Ile Leu
 210 215 220
 Lys Gly Ile Asp His Ile Glu Phe Pro Lys Lys Ile Ser Arg Ser Ala
 225 230 235 240
 His Val Leu Ile Lys Lys Leu Cys Arg Asp Asn Pro Met Glu Arg Leu
 245 250 255
 Gly Tyr Gly Lys Asn Gly Ile Ser Asp Ile Arg Lys Asn Lys Trp Phe
 260 265 270

<210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(8)
 <223> Péptido sintético
 5
 <400> 27
 Leu Arg Lys Lys Lys Lys Lys His
 1 5
 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 10
 <400> 28
 Leu Arg Ala Lys Lys Lys Lys His
 1 5
 <210> 29
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 29
 Leu Arg Lys Ala Lys Lys Lys His
 1 5
 <210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 30
 Leu Arg Lys Lys Ala Lys Lys His
 1 5
 <210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Péptido sintético
 30

<400> 31

Leu Arg Lys Lys Lys Ala Lys His
1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 32

Leu Arg Lys Lys Lys Lys Lys His
1 5

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 33

Arg Lys Lys Lys
1

<210> 34

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

20

<223> Péptido enlazador delta de 0 a 100 restos

<400> 34

Leu Arg Lys Lys Lys Lys Lys His Xaa Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg
1 5 10 15

Gln Arg Arg Arg Pro Pro
20

<210> 35

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Péptido enlazador delta de 0 a 100 restos

<400> 35

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Xaa Leu Arg
 1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys His
 20

<210> 36
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Péptido enlazador delta de 0 a 100 restos

10

<400> 36

Leu Arg Lys Lys Lys Lys His Xaa Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe
 1 5 10 15

Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 20 25

<210> 37
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Péptido enlazador delta de 0 a 100 restos

20

<400> 37

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

Xaa Leu Arg Lys Lys Lys Lys His
 20 25

<210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 5 <223> Péptido enlazador delta de 0 a 100 restos

<400> 38
 Leu Arg Lys Lys Lys Lys Lys His Glx Pro Lys Lys Lys Arg Lys
 1 5 10 15

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 15 <223> Péptido enlazador delta de 0 a 100 restos

<400> 39
 Pro Lys Lys Lys Arg Lys Glx Leu Arg Lys Lys Lys Lys Lys His
 1 5 10 15

<210> 40
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <22B> Péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Péptido enlazador delta de 0 a 100 restos

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 25 <223> Péptido enlazador épsilon de 0 a 100 restos

<400> 40
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Xaa Leu Arg
 1 5 10 15

Lys Lys Lys Lys Lys His Glx Pro Lys Lys Lys Arg Lys
 20 25

<210> 41
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Péptido enlazador épsilon de 0 a 100 restos

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Péptido enlazador delta de 0 a 100 restos

<400> 41

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Glx Leu Arg Lys Lys Lys Lys Lys His Xaa
 1 5 10 15

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro
 20 25

<210> 42
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa= péptido enlazador

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa= péptido enlazador

<400> 42

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

Xaa Leu Arg Lys Lys Lys Lys Lys His Glx Pro Lys Lys Lys Arg Lys
 20 25 30

<210> 43
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa= péptido enlazador

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa= péptido enlazador

ES 2 696 598 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Péptido enlazador delta de 0 a 100 restos

<400> 43

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Glx Leu Arg Lys Lys Lys Lys Lys His Xaa
 1 5 10 15

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 20 25 30

<210> 44
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 44

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro Pro
 1 5 10

10

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

15

<400> 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5

<210> 46
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 46

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 47
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 47

Pro Lys Lys Lys Arg Lys
1 5

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 48

Cys Thr Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5 10

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 49

Lys Lys Lys Arg Lys
1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 50

Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys
1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 51

Thr Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys
1 5

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 52

Pro Lys Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 53

<211> 768

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

5

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(768)

<400> 53

Met Ala Ala Gly Met Leu Thr Asp Arg Glu Arg Glu Ala Ile Val Ser

ES 2 696 598 T3

<222> (1)..(742)

<400> 54

Met Gln Ser Leu Arg Ile Ser Gly Cys Thr Pro Ser Gly Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Thr Pro Ser Pro Val Gly Leu Val Asp Pro Asn Phe Ile Val
 20 25 30
 Ser Asn Tyr Val Ala Ala Ser Pro Gln Glu Glu Arg Phe Ile Gln Ile
 35 40 45
 Ile Gln Ala Lys Glu Leu Lys Ile Gln Glu Met Gln Arg Ala Leu Gln
 50 55 60
 Phe Lys Asp Asn Glu Ile Ala Glu Leu Lys Ser His Leu Asp Lys Phe
 65 70 75 80
 Gln Ser Val Phe Pro Phe Ser Arg Gly Ser Ala Ala Gly Cys Ala Gly
 85 90 95
 Thr Gly Gly Ala Ser Gly Ser Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Pro Gly Thr Ala Thr Gly Ala Thr Arg Lys Ser Gly Gln Asn Phe Gln
 115 120 125
 Arg Gln Arg Ala Leu Gly Ile Ser Ala Glu Pro Gln Ser Glu Ser Ser
 130 135 140
 Leu Leu Leu Glu His Val Ser Phe Pro Lys Tyr Asp Lys Asp Glu Arg
 145 150 155 160
 Ser Arg Glu Leu Ile Lys Ala Ala Ile Leu Asp Asn Asp Phe Met Lys
 165 170 175
 Asn Leu Asp Leu Thr Gln Ile Arg Glu Ile Val Asp Cys Met Tyr Pro
 180 185 190
 Val Lys Tyr Pro Ala Lys Asn Leu Ile Ile Lys Glu Gly Asp Val Gly
 195 200 205
 Ser Ile Val Tyr Val Met Glu Asp Gly Arg Val Glu Val Ser Arg Glu

ES 2 696 598 T3

725

730

735

Gly Trp Asp Lys Asp Phe
740

<210> 55
<211> 671
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(671)
<400> 55

Met Ser Glu Leu Glu Glu Asp Phe Ala Lys Ile Leu Met Leu Lys Glu
1 5 10 15

Glu Arg Ile Lys Glu Leu Glu Lys Arg Leu Ser Glu Lys Glu Glu Glu
20 25 30

Ile Gln Glu Leu Lys Arg Lys Leu His Lys Cys Gln Ser Val Leu Pro
35 40 45

Val Pro Ser Thr His Ile Gly Pro Arg Thr Thr Arg Ala Gln Gly Ile
50 55 60

Ser Ala Glu Pro Gln Thr Tyr Arg Ser Phe His Asp Leu Arg Gln Ala
65 70 75 80

Phe Arg Lys Phe Thr Lys Ser Glu Arg Ser Lys Asp Leu Ile Lys Glu
85 90 95

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

Gln Glu Ile Val Asp Cys Met Tyr Pro Val Glu Tyr Gly Lys Asp Ser
115 120 125

Cys Ile Ile Lys Glu Gly Asp Val Gly Ser Leu Val Tyr Val Met Glu
130 135 140

Asp Gly Lys Val Glu Val Thr Lys Glu Gly Val Lys Leu Cys Thr Met
145 150 155 160

Gly Pro Gly Lys Val Phe Gly Glu Leu Ala Ile Leu Tyr Asn Cys Thr
165 170 175

Arg Thr Ala Thr Val Lys Thr Leu Val Asn Val Lys Leu Trp Ala Ile

ES 2 696 598 T3

180					185					190					
Asp	Arg	Gln 195	Cys	Phe	Gln	Thr	Ile 200	Met	Met	Arg	Thr	Gly 205	Leu	Ile	Lys
His	Thr 210	Glu	Tyr	Met	Glu	Phe 215	Leu	Lys	Ser	Val	Pro 220	Thr	Phe	Gln	Ser
Leu 225	Pro	Glu	Glu	Ile	Leu 230	Ser	Lys	Leu	Ala	Asp 235	Val	Leu	Glu	Glu	Thr 240
His	Tyr	Glu	Asn	Gly 245	Glu	Tyr	Ile	Ile	Arg 250	Gln	Gly	Ala	Arg	Gly 255	Asp
Thr	Phe	Phe	Ile 260	Ile	Ser	Lys	Gly	Thr 265	Val	Asn	Val	Thr	Arg 270	Glu	Asp
Ser	Pro	Ser 275	Glu	Asp	Pro	Val	Phe 280	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly 285	Lys	Gly	Asp
Trp	Phe 290	Gly	Glu	Lys	Ala	Leu 295	Gln	Gly	Glu	Asp	Val 300	Arg	Thr	Ala	Asn
Val 305	Ile	Ala	Ala	Glu	Ala 310	Val	Thr	Cys	Leu	Val 315	Ile	Asp	Arg	Asp	Ser 320
Phe	Lys	His	Leu	Ile 325	Gly	Gly	Leu	Asp	Asp 330	Val	Ser	Asn	Lys	Ala 335	Tyr
Glu	Asp	Ala	Glu 340	Ala	Lys	Ala	Lys	Tyr 345	Glu	Ala	Glu	Ala	Ala 350	Phe	Phe
Ala	Asn	Leu 355	Lys	Leu	Ser	Asp	Phe 360	Asn	Ile	Ile	Asp	Thr 365	Leu	Gly	Val
Gly	Gly 370	Phe	Gly	Arg	Val	Glu 375	Leu	Val	Gln	Leu	Lys 380	Ser	Glu	Glu	Ser
Lys 385	Thr	Phe	Ala	Met	Lys 390	Ile	Leu	Lys	Lys	Arg 395	His	Ile	Val	Asp	Thr 400
Arg	Gln	Gln	Glu	His 405	Ile	Arg	Ser	Glu	Lys 410	Gln	Ile	Met	Gln	Gly 415	Ala
His	Ser	Asp	Phe 420	Ile	Val	Arg	Leu	Tyr 425	Arg	Thr	Phe	Lys	Asp 430	Ser	Lys
Tyr	Leu	Tyr	Met	Leu	Met	Glu	Ala	Cys	Leu	Gly	Gly	Glu	Leu	Trp	Thr

<222> (1)..(762)

<400> 56

Met Gly Asn Gly Ser Val Lys Pro Lys His Ser Lys His Pro Asp Gly
1 5 10 15

His Ser Gly Asn Leu Thr Thr Asp Ala Leu Arg Asn Lys Val Thr Glu
20 25 30

Leu Glu Arg Glu Leu Arg Arg Lys Asp Ala Glu Ile Gln Glu Arg Glu
35 40 45

Tyr His Leu Lys Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Lys Gln Thr Val Ala
50 55 60

Ile Ala Glu Leu Thr Glu Glu Leu Gln Asn Lys Cys Ile Gln Leu Asn
65 70 75 80

Lys Leu Gln Asp Val Val His Met Gln Gly Gly Ser Pro Leu Gln Ala
85 90 95

Ser Pro Asp Lys Val Pro Leu Glu Val His Arg Lys Thr Ser Gly Leu
100 105 110

Val Ser Leu His Ser Arg Arg Gly Ala Lys Ala Gly Val Ser Ala Glu
115 120 125

Pro Thr Thr Arg Thr Tyr Asp Leu Asn Lys Pro Pro Glu Phe Ser Phe
130 135 140

Glu Lys Ala Arg Val Arg Lys Asp Ser Ser Glu Lys Lys Leu Ile Thr
145 150 155 160

Asp Ala Leu Asn Lys Asn Gln Phe Leu Lys Arg Leu Asp Pro Gln Gln
165 170 175

Ile Lys Asp Met Val Glu Cys Met Tyr Gly Arg Asn Tyr Gln Gln Gly
180 185 190

Ser Tyr Ile Ile Lys Gln Gly Glu Pro Gly Asn His Ile Phe Val Leu
195 200 205

Ala Glu Gly Arg Leu Glu Val Phe Gln Gly Glu Lys Leu Leu Ser Ser
210 215 220

Ile Pro Met Trp Thr Thr Phe Gly Glu Leu Ala Ile Leu Tyr Asn Cys

ES 2 696 598 T3

				485					490						495
His	Val	Tyr	Ser	Glu	Lys	Arg	Ile	Leu	Glu	Glu	Leu	Cys	Ser	Pro	Phe
			500					505					510		
Ile	Val	Lys	Leu	Tyr	Arg	Thr	Phe	Lys	Asp	Asn	Lys	Tyr	Val	Tyr	Met
		515					520					525			
Leu	Leu	Glu	Ala	Cys	Leu	Gly	Gly	Glu	Leu	Trp	Ser	Ile	Leu	Arg	Asp
	530					535					540				
Arg	Gly	Ser	Phe	Asp	Glu	Pro	Thr	Ser	Lys	Phe	Cys	Val	Ala	Cys	Val
545					550					555					560
Thr	Glu	Ala	Phe	Asp	Tyr	Leu	His	Arg	Leu	Gly	Ile	Ile	Tyr	Arg	Asp
				565					570					575	
Leu	Lys	Pro	Glu	Asn	Leu	Ile	Leu	Asp	Ala	Glu	Gly	Tyr	Leu	Lys	Leu
			580					585					590		
Val	Asp	Phe	Gly	Phe	Ala	Lys	Lys	Ile	Gly	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Trp
		595					600					605			
Thr	Phe	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Tyr	Val	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Leu	Asn
	610					615					620				
Lys	Gly	His	Asp	Phe	Ser	Val	Asp	Phe	Trp	Ser	Leu	Gly	Ile	Leu	Val
625					630					635				640	
Tyr	Glu	Leu	Leu	Thr	Gly	Asn	Pro	Pro	Phe	Ser	Gly	Val	Asp	Gln	Met
				645					650					655	
Met	Thr	Tyr	Asn	Leu	Ile	Leu	Lys	Gly	Ile	Glu	Lys	Met	Asp	Phe	Pro
			660					665					670		
Arg	Lys	Ile	Thr	Arg	Arg	Pro	Glu	Asp	Leu	Ile	Arg	Arg	Leu	Cys	Arg
		675					680					685			
Gln	Asn	Pro	Thr	Glu	Arg	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Asn	Gly	Ile	Asn	Asp
	690					695					700				
Ile	Lys	Lys	His	Arg	Trp	Leu	Asn	Gly	Phe	Asn	Trp	Glu	Gly	Leu	Lys
705					710					715				720	
Ala	Arg	Ser	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Arg	Glu	Leu	Lys	Gly	Pro	Ile
				725					730					735	
Asp	His	Ser	Tyr	Phe	Asp	Lys	Tyr	Pro	Pro	Glu	Lys	Gly	Met	Pro	Pro

ES 2 696 598 T3

740

745

750

Asp Glu Leu Ser Gly Trp Asp Lys Asp Phe
755 760

<210> 57
<211> 686
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(686)
<400> 57

Met Gly Thr Leu Arg Asp Leu Gln Tyr Ala Leu Gln Glu Lys Ile Glu
1 5 10 15

Glu Leu Arg Gln Arg Asp Ala Leu Ile Asp Glu Leu Glu Leu Glu Leu
20 25 30

Asp Gln Lys Asp Glu Leu Ile Gln Lys Leu Gln Asn Glu Leu Asp Lys
35 40 45

Tyr Arg Ser Val Ile Arg Pro Ala Thr Gln Gln Ala Gln Lys Gln Ser
50 55 60

Ala Ser Thr Leu Gln Gly Glu Pro Arg Thr Lys Arg Gln Ala Ile Ser
65 70 75 80

Ala Glu Pro Thr Ala Phe Asp Ile Gln Asp Leu Ser His Val Thr Leu
85 90 95

Pro Phe Tyr Pro Lys Ser Pro Gln Ser Lys Asp Leu Ile Lys Glu Ala
100 105 110

Ile Leu Asp Asn Asp Phe Met Lys Asn Leu Glu Leu Ser Gln Ile Gln
115 120 125

Glu Ile Val Asp Cys Met Tyr Pro Val Glu Tyr Gly Lys Asp Ser Cys
130 135 140

Ile Ile Lys Glu Gly Asp Val Gly Ser Leu Val Tyr Val Met Glu Asp
145 150 155 160

Gly Lys Val Glu Val Thr Lys Glu Gly Val Lys Leu Cys Thr Met Gly
165 170 175

Pro Gly Lys Val Phe Gly Glu Leu Ala Ile Leu Tyr Asn Cys Thr Arg

ES 2 696 598 T3

<222> (1)..(762)

<400> 58

Met Gly Asn Gly Ser Val Lys Pro Lys His Ala Lys His Pro Asp Gly
1 5 10 15

His Ser Gly Asn Leu Ser Asn Glu Ala Leu Arg Ser Lys Val Leu Glu
20 25 30

Leu Glu Arg Glu Leu Arg Arg Lys Asp Ala Glu Leu Gln Glu Arg Glu
35 40 45

Tyr His Leu Lys Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ala Lys Gln Thr Val Ala
50 55 60

Ile Ala Glu Leu Thr Glu Glu Leu Gln Ser Lys Cys Ile Gln Leu Asn
65 70 75 80

Lys Leu Gln Asp Val Ile His Val Gln Gly Gly Ser Pro Leu Gln Ala
85 90 95

Ser Pro Asp Lys Val Pro Leu Asp Val His Arg Lys Thr Ser Gly Leu
100 105 110

Val Ser Leu His Ser Arg Arg Gly Ala Lys Ala Gly Val Ser Ala Glu
115 120 125

Pro Thr Thr Arg Thr Tyr Asp Leu Asn Lys Pro Pro Glu Phe Ser Phe
130 135 140

Glu Lys Ala Arg Val Arg Lys Asp Ser Ser Glu Lys Lys Leu Ile Thr
145 150 155 160

Asp Ala Leu Asn Lys Asn Gln Phe Leu Lys Arg Leu Asp Pro Gln Gln
165 170 175

Ile Lys Asp Met Val Glu Cys Met Tyr Gly Glu Lys Leu Ser Thr Gly
180 185 190

Ser Tyr Val Ile Lys Gln Gly Glu Pro Gly Asn His Ile Phe Val Leu
195 200 205

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

ES 2 696 598 T3

725 730 735
 Asp His Ser Tyr Phe Asp Lys Tyr Pro Pro Glu Lys Gly Val Pro Pro
 740 745 750

Asp Glu Met Ser Gly Trp Asp Lys Asp Phe
 755 760

<210> 59
 <211> 762
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

5 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(762)
 <400> 59

Met Gly Asn Gly Ser Val Lys Pro Lys His Ser Lys His Pro Asp Gly
 1 5 10 15

Gln Ser Gly Asn Leu Ser Asn Glu Ala Leu Arg Ser Lys Val Ala Glu
 20 25 30

Leu Glu Arg Glu Val Lys Arg Lys Asp Ala Glu Leu Gln Glu Arg Glu
 35 40 45

Tyr His Leu Lys Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ala Lys Gln Thr Val Ala
 50 55 60

Ile Ala Glu Leu Thr Glu Glu Leu Gln Ser Lys Cys Ile Gln Leu Asn
 65 70 75 80

Lys Leu Gln Asp Val Ile His Val Gln Gly Gly Ser Pro Leu Gln Ala
 85 90 95

Ser Pro Asp Lys Val Pro Leu Asp Val His Arg Lys Thr Ser Gly Leu
 100 105 110

Val Ser Leu His Ser Arg Arg Gly Ala Lys Ala Gly Val Ser Ala Glu
 115 120 125

Pro Thr Ser Arg Thr Tyr Asp Leu Asn Lys Pro Pro Glu Phe Ser Phe
 130 135 140

Glu Lys Ala Arg Val Arg Lys Asp Ser Ser Glu Lys Lys Leu Ile Thr
 145 150 155 160

Asp Ala Leu Asn Lys Asn Gln Phe Leu Lys Arg Leu Asp Pro Gln Gln

ES 2 696 598 T3

				165					170						175
Ile	Lys	Asp	Met	Val	Glu	Cys	Met	Tyr	Gly	Arg	Asn	Tyr	Gln	Gln	Gly
			180					185					190		
Ser	Tyr	Ile	Val	Lys	Gln	Gly	Glu	Pro	Gly	Asn	His	Ile	Phe	Val	Leu
		195					200					205			
Ala	Glu	Gly	Arg	Leu	Glu	Val	Phe	Gln	Gly	Glu	Lys	Leu	Leu	Ser	Ser
	210					215					220				
Ile	Pro	Met	Trp	Thr	Thr	Phe	Gly	Glu	Leu	Ala	Ile	Leu	Tyr	Asn	Cys
225					230					235					240
Thr	Arg	Thr	Ala	Ser	Val	Lys	Ala	Ile	Thr	Asn	Val	Lys	Thr	Trp	Ala
				245					250						255
Leu	Asp	Arg	Glu	Val	Phe	Gln	Asn	Ile	Met	Arg	Arg	Thr	Ala	Gln	Ala
			260					265					270		
Arg	Asp	Glu	Glu	Tyr	Arg	Asn	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Ser	Leu	Leu	Lys
		275					280					285			
Asn	Leu	Pro	Glu	Asp	Lys	Leu	Thr	Lys	Ile	Ile	Asp	Cys	Leu	Glu	Val
	290					295					300				
Glu	Tyr	Tyr	Asp	Lys	Gly	Asp	Tyr	Ile	Ile	Arg	Glu	Gly	Glu	Glu	Gly
305					310					315					320
Ser	Thr	Phe	Phe	Ile	Leu	Ala	Lys	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Thr	Gln	Ser
				325					330						335
Thr	Glu	Gly	His	Asp	Gln	Pro	Gln	Leu	Ile	Lys	Thr	Leu	Gln	Lys	Gly
			340					345					350		
Glu	Tyr	Phe	Gly	Glu	Lys	Ala	Leu	Ile	Ser	Asp	Asp	Val	Arg	Ser	Ala
		355					360					365			
Asn	Ile	Ile	Ala	Glu	Glu	Asn	Asp	Val	Ala	Cys	Leu	Val	Ile	Asp	Arg
	370					375					380				
Glu	Thr	Phe	Asn	Gln	Thr	Val	Gly	Thr	Phe	Asp	Glu	Leu	Gln	Lys	Tyr
385					390					395					400
Leu	Glu	Gly	Tyr	Val	Ala	Thr	Leu	Asn	Arg	Asp	Asp	Glu	Lys	Arg	His
				405					410					415	
Ala	Lys	Arg	Ser	Met	Ser	Ser	Trp	Lys	Leu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ser	Leu

ES 2 696 598 T3

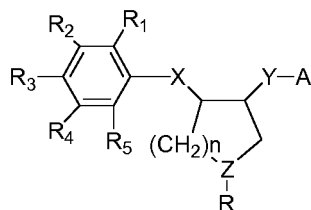
			420					425						430			
Glu	Met	Ile	Gln	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Arg	Phe	Ser	Ser	Thr	Ser		
		435					440					445					
Pro	Phe	Gln	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Ala	Thr	Leu	Gly	Val	Gly	Gly	Phe		
	450					455					460						
Gly	Arg	Val	Glu	Leu	Val	Lys	Val	Lys	Asn	Glu	Asn	Ile	Ala	Phe	Ala		
465					470					475							480
Met	Lys	Cys	Ile	Arg	Lys	Lys	His	Ile	Val	Asp	Thr	Lys	Gln	Gln	Glu		
				485					490					495			
His	Val	Tyr	Ser	Glu	Lys	Arg	Ile	Leu	Glu	Glu	Leu	Cys	Ser	Pro	Phe		
			500					505					510				
Ile	Val	Lys	Leu	Tyr	Arg	Thr	Phe	Lys	Asp	Asn	Lys	Tyr	Val	Tyr	Met		
		515					520					525					
Leu	Leu	Glu	Ala	Cys	Leu	Gly	Gly	Glu	Leu	Trp	Ser	Ile	Leu	Arg	Asp		
	530					535					540						
Arg	Gly	Ser	Phe	Asp	Glu	Pro	Thr	Ser	Lys	Phe	Cys	Val	Ala	Cys	Val		
545					550					555					560		
Thr	Glu	Ala	Phe	Asp	Tyr	Leu	His	Arg	Leu	Gly	Ile	Ile	Tyr	Arg	Asp		
				565					570					575			
Leu	Lys	Pro	Glu	Asn	Leu	Ile	Leu	Asp	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Lys	Leu		
			580					585					590				
Val	Asp	Phe	Gly	Phe	Ala	Lys	Lys	Ile	Gly	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Trp		
		595					600					605					
Thr	Phe	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Tyr	Val	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Leu	Asn		
	610					615					620						
Lys	Gly	His	Asp	Phe	Ser	Val	Asp	Phe	Trp	Ser	Leu	Gly	Ile	Leu	Val		
625					630					635					640		
Tyr	Glu	Leu	Leu	Thr	Gly	Asn	Pro	Pro	Phe	Ser	Gly	Ile	Asp	Gln	Met		
				645					650					655			
Met	Thr	Tyr	Asn	Leu	Ile	Leu	Lys	Gly	Ile	Glu	Lys	Met	Asp	Phe	Pro		
			660					665					670				
Arg	Lys	Ile	Thr	Arg	Arg	Pro	Glu	Asp	Leu	Ile	Arg	Arg	Leu	Cys	Arg		

ES 2 696 598 T3

	675						680						685		
Gln	Asn	Pro	Thr	Glu	Arg	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Asn	Gly	Ile	Asn	Asp
	690					695					700				
Ile	Lys	Lys	His	Arg	Trp	Leu	Asn	Gly	Phe	Asn	Trp	Glu	Gly	Leu	Lys
705					710					715					720
Ala	Arg	Ser	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	Arg	Arg	Glu	Leu	Ser	Gly	Pro	Ile
				725					730					735	
Asp	His	Ser	Tyr	Phe	Asp	Lys	Tyr	Pro	Pro	Glu	Lys	Gly	Val	Pro	Pro
			740					745					750		
Asp	Glu	Met	Ser	Gly	Trp	Asp	Lys	Asp	Phe						
		755					760								

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente que tiene la fórmula I



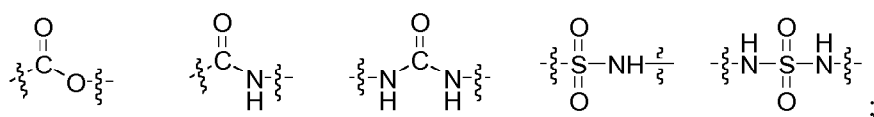
5

Fórmula I

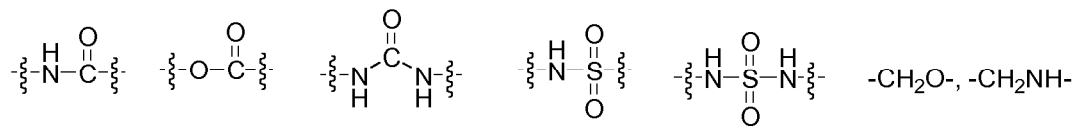
en la que n es 1, 2 o 3; Z es N o CH;

en la que X representa uno de los siguientes grupos funcionales:

10

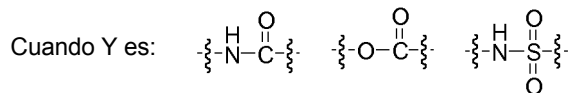


en la que Y representa uno de los siguientes grupos funcionales:

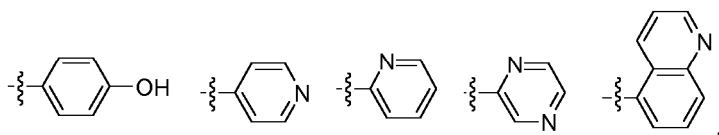


en la que A representa grupos arilo o heteroarilo no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino o halógeno, de manera que, donde A es un grupo arilo o heteroarilo,

15

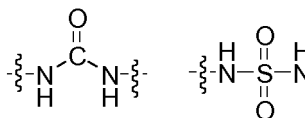


A es:

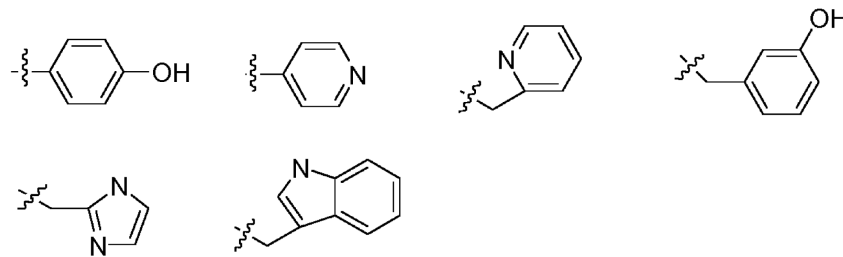


y

Cuando Y es:



A es:



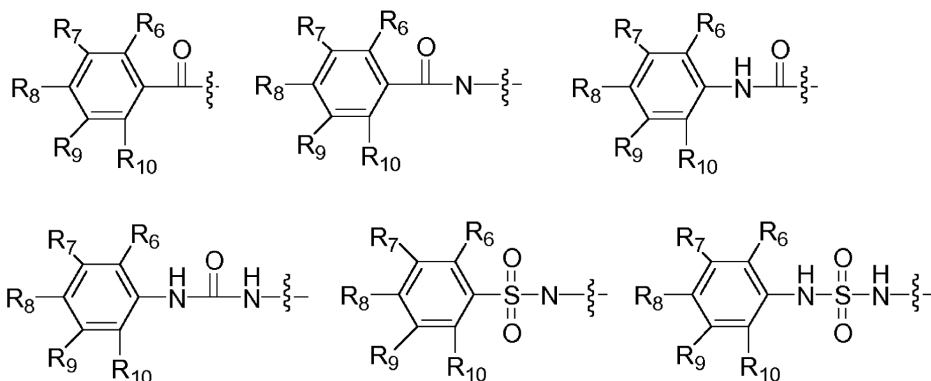
20

en la que R es hidrógeno, alquilo inferior, o amidino;

en la que R1, R2, R4, R5 es independientemente hidrógeno, hidroxilo, alcoxi inferior, amino o halógeno;

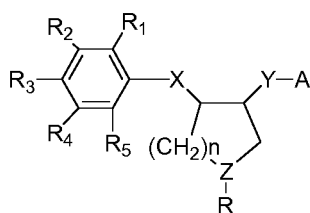
y

en la que R3 es alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, ariloxi, o un grupo seleccionado de los siguientes:



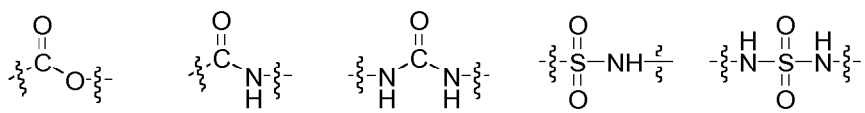
5 siendo R6-R10 independientemente hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno, trifluorometilo, carboxi, alcocarbonilo, amino, alquilamino, alquilcarbonilamino, alquilsulfonilamino (por ejemplo, CF₃SO₂NH-, CH₃SO₂NH-) y tetrazol;
 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de dolor crónico en un sujeto que padece hiperalgesia del sistema nervioso periférico en el que el medicamento es para la administración a la neurona sensorial en un ganglio de la raíz dorsal.

10 2. Un agente que tiene la fórmula I

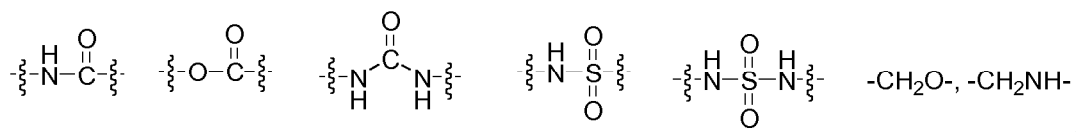


Fórmula I

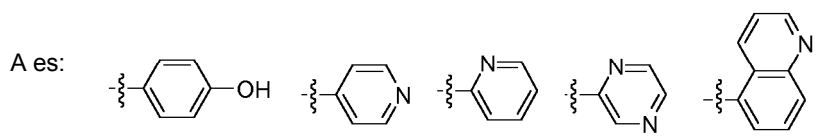
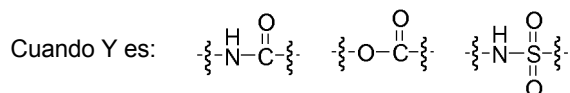
15 en la que n es 1, 2 o 3; Z es N o CH;
 en la que X representa uno de los siguientes grupos funcionales:



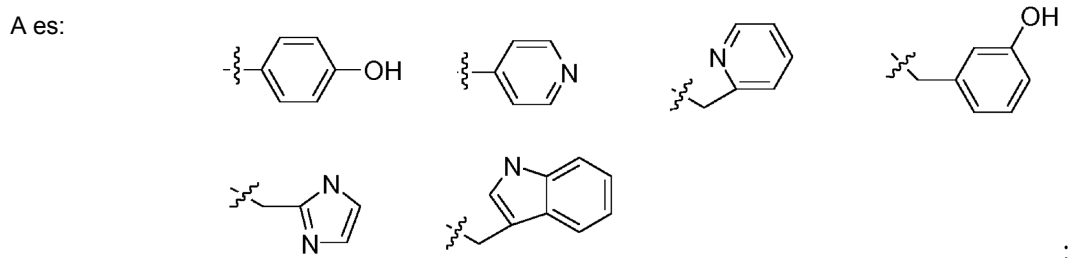
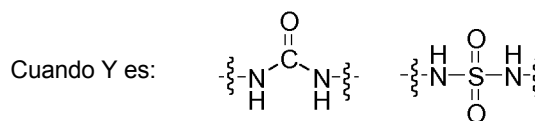
en la que Y representa uno de los siguientes grupos funcionales:



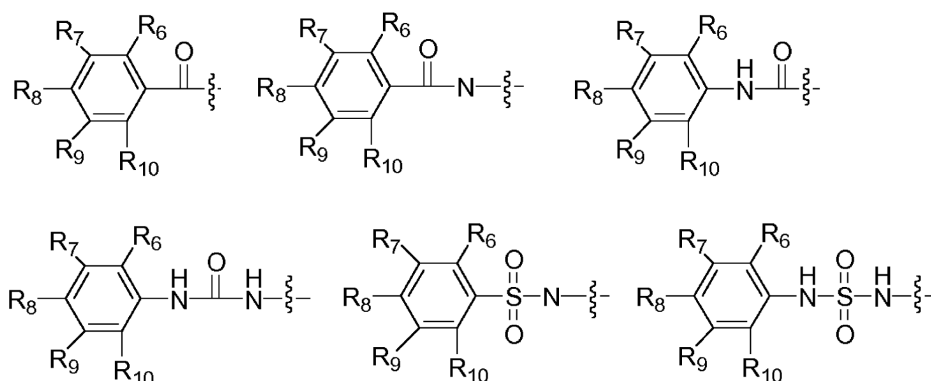
20 en la que A representa grupos arilo o heteroarilo no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino o halógeno, de manera que, donde A es un grupo arilo o heteroarilo,



25 y



en la que R es hidrógeno, alquilo inferior, o amidino;
 en la que R1, R2, R4, R5 es independientemente hidrógeno, hidroxilo, alcoxi inferior, amino o halógeno;
 y
 en la que R3 es alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, ariloxi, o un grupo seleccionado de los siguientes:



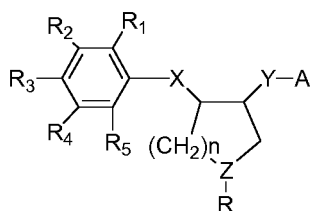
siendo R6-R10 independientemente hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno, trifluorometilo, carboxi, alcocarbonilo, amino, alquilamino, alquilcarbonilamino, alquilsulfonilamino (por ejemplo, CF₃SO₂NH-, CH₃SO₂NH-) y tetrazol;
 para su uso en el tratamiento de dolor crónico en un sujeto que padece hiperalgesia del sistema nervioso periférico en el que el medicamento es para la administración a la neurona sensorial en un ganglio de la raíz dorsal.

3. El uso de la reivindicación 1 o el agente de la reivindicación 2, en el que el agente es balanol.

4. El uso de la reivindicación 1 o el agente de la reivindicación 2, en el que el agente es una variante de balanol.

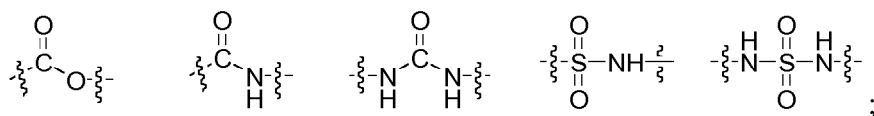
5. El uso o el agente de la reivindicación 4, en el que la variante de balanol se selecciona del grupo que consiste en balanol-7R, 14-descarboxi-balanol, 10-desoxi-balanol, balanol unido a un péptido transportador, una variante de balanol unida a un péptido transportador, balanol unido a un péptido portador, una variante de balanol unida a un péptido portador, balanol unido a un péptido transportador y un péptido portador y una variante de balanol unida a un péptido transportador y un péptido portador.

6. Un dispositivo transdérmico que contiene una cantidad eficaz de un agente que tiene la fórmula I:

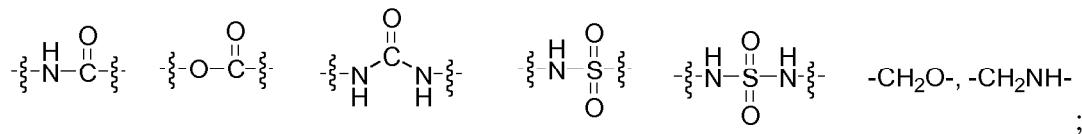


Fórmula I

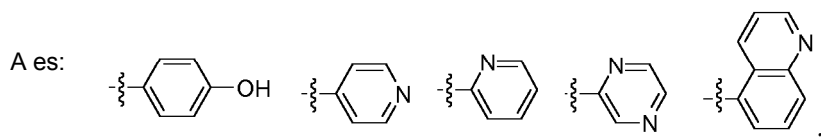
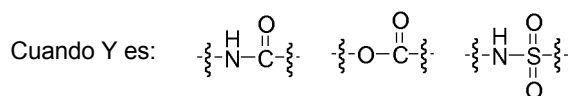
en la que n es 1, 2 o 3; Z es N o CH;
 en la que X representa uno de los siguientes grupos funcionales:



en la que Y representa uno de los siguientes grupos funcionales:

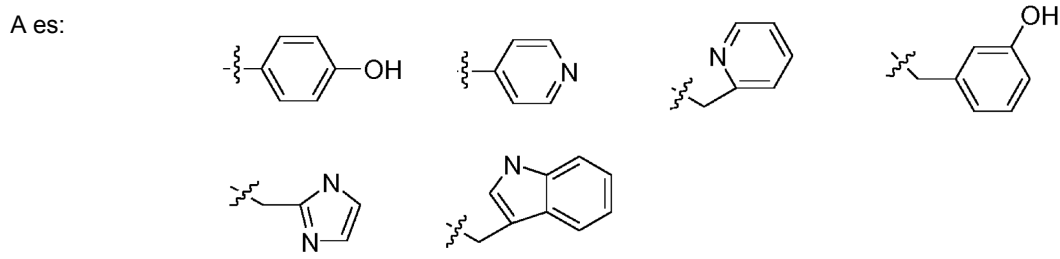
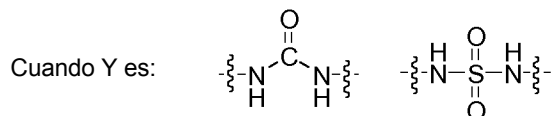


en la que A representa grupos arilo o heteroarilo no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino o halógeno, de manera que, donde A es un grupo arilo o heteroarilo,



y

10



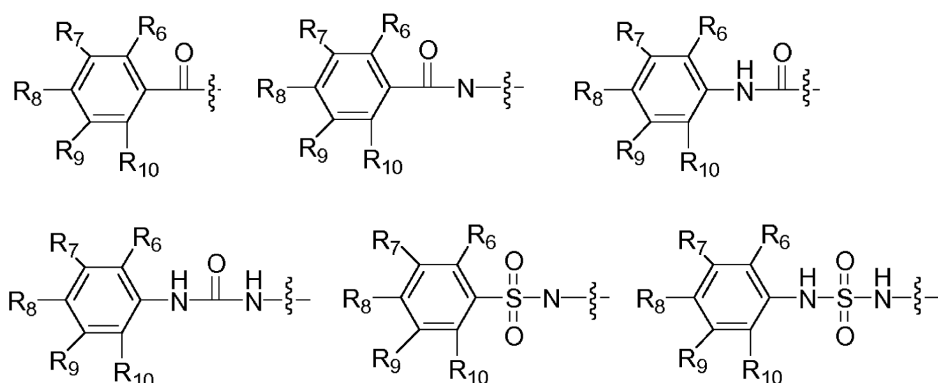
en la que R es hidrógeno, alquilo inferior, o amidino;

en la que R1, R2, R4, R5 es independientemente hidrógeno, hidroxilo, alcoxi inferior, amino o halógeno;

y

en la que R3 es alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, ariloxi, o un grupo seleccionado de los siguientes:

15



siendo R6-R10 independientemente hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno, trifluorometilo, carboxi, alcocarbonilo, amino, alquilamino, alquilcarbonilamino, alquilsulfonilamino (por ejemplo, CF₃SO₂NH-

CH₃SO₂NH-) y tetrazol;

7. El dispositivo transdérmico de la reivindicación 6, en el que el agente es balanol.

5 8. El dispositivo transdérmico de la reivindicación 6, en el que el agente es una variante de balanol.

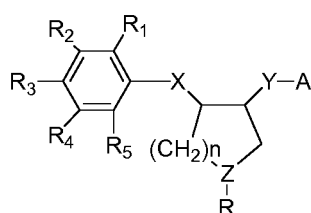
9. El dispositivo transdérmico de la reivindicación 8, en el que la variante de balanol se selecciona del grupo que consiste en balanol-7R, 14-d Descarboxi-balanol, 10-desoxi-balanol, balanol unido a un péptido transportador, una variante de balanol unida a un péptido transportador, balanol unido a un péptido portador, una variante de balanol unida a un péptido portador, balanol unido a un péptido transportador y un péptido portador y una variante de balanol unida a un péptido transportador y un péptido portador.

10

10. El dispositivo transdérmico de la reivindicación 6, 7, 8 o 9, en el que el agente que tiene la fórmula I está unido a un péptido transportador.

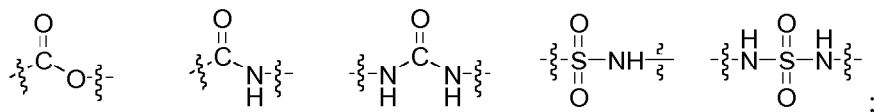
15

11. El uso de un agente que tiene la fórmula I:

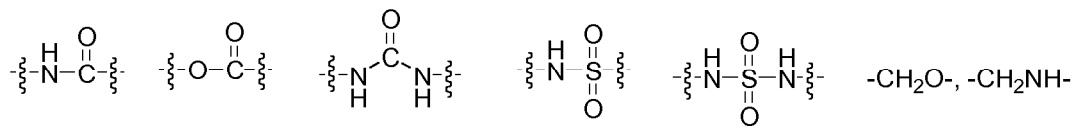


Fórmula I

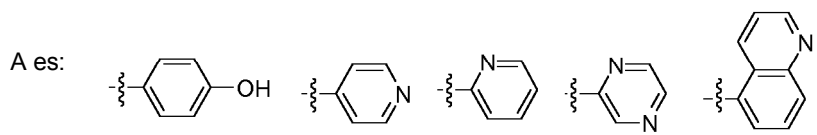
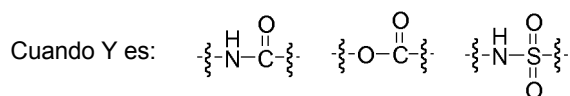
20 en la que n es 1, 2 o 3; Z es N o CH;
en la que X representa uno de los siguientes grupos funcionales:



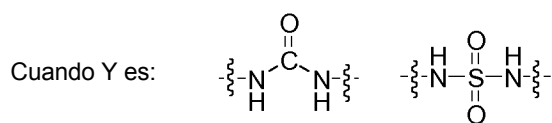
en la que Y representa uno de los siguientes grupos funcionales:



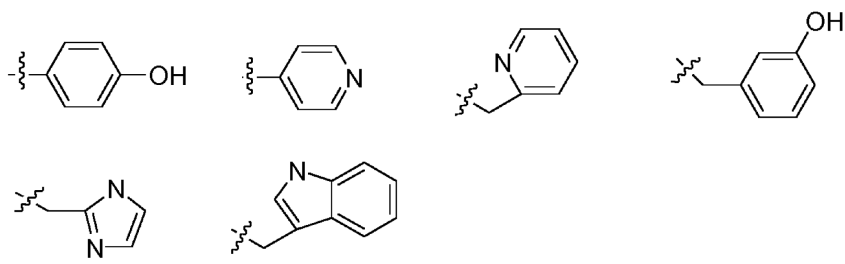
25 en la que A representa grupos arilo o heteroarilo no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino o halógeno, de manera que, donde A es un grupo arilo o heteroarilo,



30 y

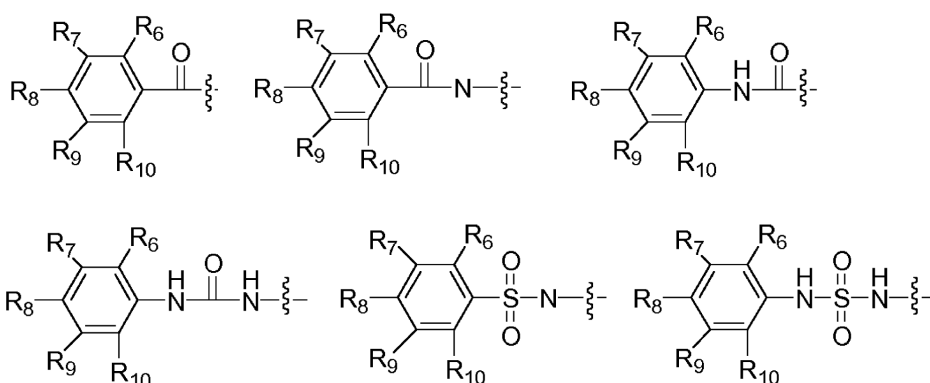


A es:



en la que R es hidrógeno, alquilo inferior, o amidino;
 en la que R1, R2, R4, R5 es independientemente hidrógeno, hidroxilo, alcoxi inferior, amino o halógeno;
 y
 en la que R3 es alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, ariloxi, o un grupo seleccionado de los siguientes:

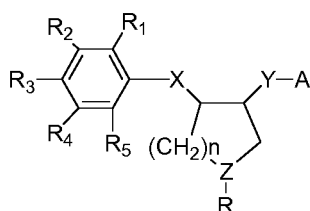
5



siendo R6-R10 independientemente hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno, trifluorometilo, carboxi, alcocarbonilo, amino, alquilamino, alquilcarbonilamino, alquilsulfonilamino (por ejemplo, CF₃SO₂NH-, CH₃SO₂NH-) y tetrazol;

10 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de dolor crónico en el que el medicamento es para la administración al sistema nervioso central.

12. Un agente que tiene la fórmula I:



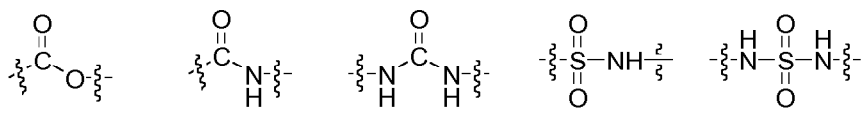
15

Fórmula I

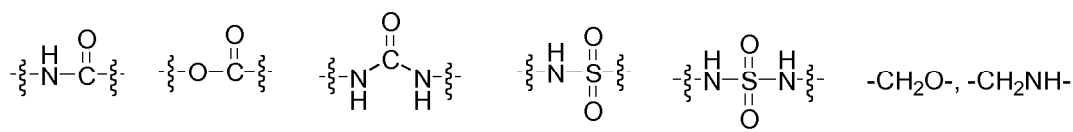
en la que n es 1, 2 o 3; Z es N o CH;

en la que X representa uno de los siguientes grupos funcionales:

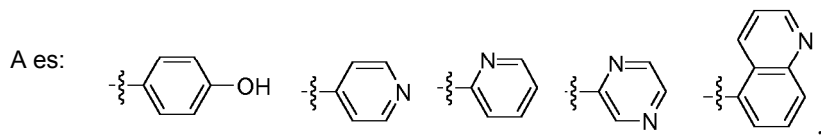
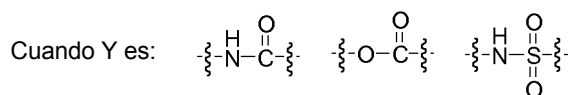
20



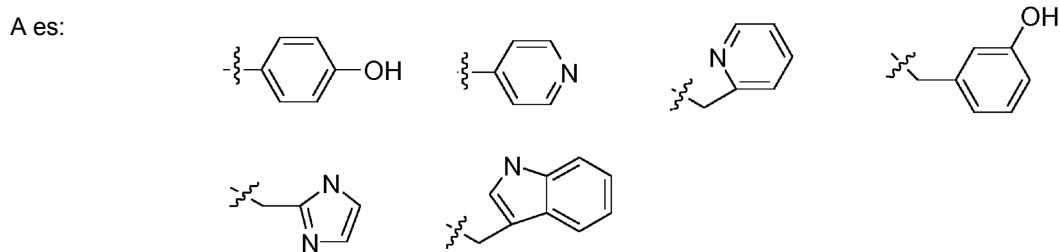
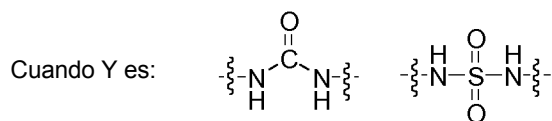
en la que Y representa uno de los siguientes grupos funcionales:



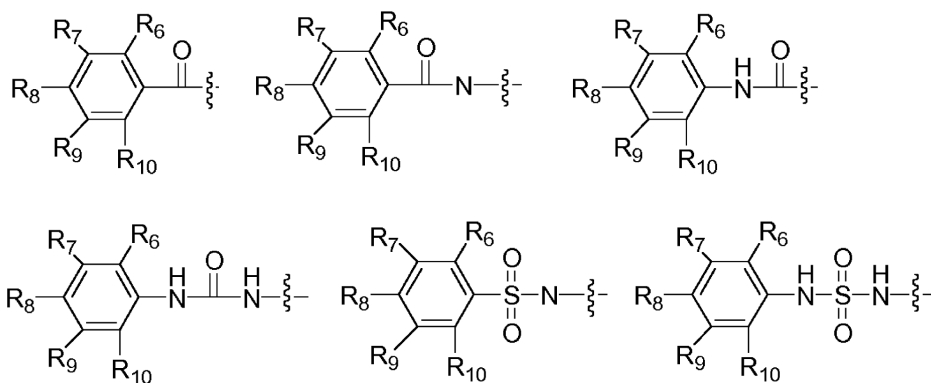
25 en la que A representa grupos arilo o heteroarilo no sustituidos o sustituidos con uno o más grupos alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino o halógeno, de manera que, donde A es un grupo arilo o heteroarilo,



y

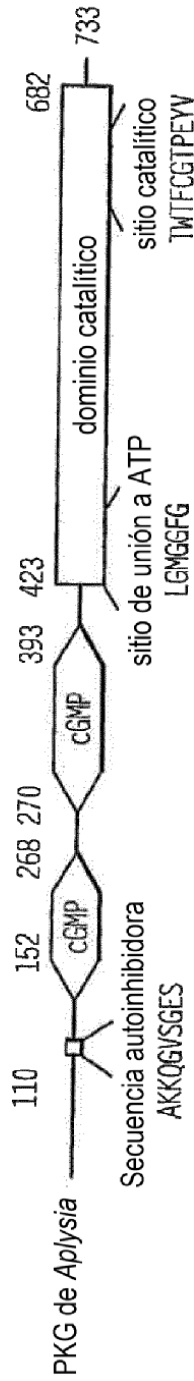


- 5 en la que R es hidrógeno, alquilo inferior, o amidino;
 en la que R1, R2, R4, R5 es independientemente hidrógeno, hidroxilo, alcoxi inferior, amino o halógeno;
 y
 en la que R3 es alquilo, arilo, heteroarilo, alcoxi, ariloxi, o un grupo seleccionado de los siguientes:



- 10 siendo R6-R10 independientemente hidrógeno, hidroxilo, alquilo inferior, alcoxi inferior, halógeno, trifluorometilo, carboxi, alcocarbonilo, amino, alquilamino, alquilcarbonilamino, alquilsulfonilamino (por ejemplo, CF₃SO₂NH-, CH₃SO₂NH-) y tetrazol;
 15 para su uso en el tratamiento del dolor crónico en el que el medicamento es para la administración al sistema nervioso central.

13. El uso de la reivindicación 11, o el agente de la reivindicación 12, en el que el agente es balanol o una variante de balanol.
 20 14. El uso o el agente de la reivindicación 13, en el que la variante de balanol se selecciona del grupo que consiste en balanol-7R, 14-descarboxi-balanol, 10-desoxi-balanol, balanol unido a un péptido portador y una variante de balanol unida a un péptido portador.



apPKG	1	-----MNGASSNTHFTIDGE-----	SMDVHKVKALVPELRHELRRRD---	KIIIEQYDSQVRQKDELKEKEAEIARLKEEVHKLKSVL
DG1	1	MAAGMLTDREREIVSNLTKDVQALREWRSESELVKLHREJHKLKSVLQQTNNLNVTRNEKAKKKLYSLPEQGGEGESRNQPHLCSSCGMV	-----MSELEEDFAKTLMLKEERIKELKRLSEKEEIIQELKRKLHKQQSVL	
hPKG1a	1	-----MGLRDLQYALQEKIEELRQRDALIDELLELDQKDELIQKLQNELDKYRSVI	-----MGLRDLQYALQEKIEELRQRDALIDELLELDQKDELIQKLQNELDKYRSVI	
mPKG1b	1	-----MOSLRISGCTPSGTGGSATPS-----	-----MGLRDLQYALQEKIEELRQRDALIDELLELDQKDELIQKLQNELDKYRSVI	
DG2T3A	1	-----MNGSLVDFVSNVVAASPOEERFIQIQAKELKIQMQRALQFKDNEIAELKSHLDFQSFV	-----MGLRDLQYALQEKIEELRQRDALIDELLELDQKDELIQKLQNELDKYRSVI	
hPKG1I	1	-----MNGSVKPKHSHKHPDG-----	-----MGLRDLQYALQEKIEELRQRDALIDELLELDQKDELIQKLQNELDKYRSVI	
mPKG1I	1	-----MNGSVKPKHSHKHPDG-----	-----MGLRDLQYALQEKIEELRQRDALIDELLELDQKDELIQKLQNELDKYRSVI	
apPKG	77	Q-----LKVDTLK--AOESKPDLLSTIDENQAEPTAPRGPAAKQKQ-----	-----VSGE--S-----PSSKTLGVLDLTH	
DG1	96	LPTSP--E-----FALEALSGLSPLASTSSASPSGRTSADAEVRPKAMPAAIKKQG-----	-----VSAESCV-----QSMQSYSIPIPK	
hPKG1a	48	P-----VPSTHIGPRT-----TRAQG-----	-----ISAEPQT-----YRSFHDLRQAFRK	
mPKG1b	54	R-----PATQQAQKQASATLQGEPRTRQA-----	-----ISAEPQT-----YRSFHDLRQAFRK	
DG2T3A	85	P-----FSRGSAAAGCAGTGGASGGAGSGGSGPGTATGATKSGQNFQRQALG-----	-----ISAEPQT-----YRSFHDLRQAFRK	
hPKG1I	80	N-----KLQDVVHMQGGSPLOASPKVPLEVHRKTSGLVSLHSRRGAKAG-----	-----VSAEPTTRTYDLNKPPEFSFEKAR	
mPKG1I	90	N-----KLQDVTHVQGGSPLOASPKVPLEVHRKTSGLVSLHSRRGAKAG-----	-----VSAEPTTRTYDLNKPPEFSFEKAR	
apPKG	133	HEKDFKSKQLIKDAIISNEFIKVLAAATQLREIIDCWYEKRVKACYYIKGGERGEHLVYCADGLLEVHKEDKRLGEIKSGGLFGELAILYNCXRT	-----VSAEPTTRTYDLNKPPEFSFEKAR	
DG1	166	YKDFSDKQIJKDAIMDNDFLKNIDASQVRELVDMSYKSIAGEFVIREGEVGAHLVYSAAGFAVMQHGKVLDMGAKAFGELAILYNCXRT	-----VSAEPTTRTYDLNKPPEFSFEKAR	
hPKG1a	84	FTKERSKOLIKEAILDNDFMKLELSQIQEIVDCMYPVEYKDCSIIKEGDVGSLLVYMEDGKVEITKEGVKCTMGPGKVFGEALAILYNCXRT	-----VSAEPTTRTYDLNKPPEFSFEKAR	
mPKG1b	99	YKSPQSKOLIKEAILDNDFMKLELSQIQEIVDCMYPVEYKDCSIIKEGDVGSLLVYMEDGKVEITKEGVKCTMGPGKVFGEALAILYNCXRT	-----VSAEPTTRTYDLNKPPEFSFEKAR	
DG2T3A	155	YKDESRRELKAAIILDNDFMKLELSQIQEIVDCMYPVEYKDCSIIKEGDVGSLLVYMEDGKVEITKEGVKCTMGPGKVFGEALAILYNCXRT	-----VSAEPTTRTYDLNKPPEFSFEKAR	
hPKG1I	149	VRKDSSEKLLITDALNKNQFLKRLDPQIJKDMVECMYGRNYQQGSYIIKQGEFPGNHIFVLAEGRLVDFQGEKLLSSIPMHTTFGELAILYNCXRT	-----VSAEPTTRTYDLNKPPEFSFEKAR	
mPKG1I	149	VRKDSSEKLLITDALNKNQFLKRLDPQIJKDMVECMYGRNYQQGSYIIKQGEFPGNHIFVLAEGRLVDFQGEKLLSSIPMHTTFGELAILYNCXRT	-----VSAEPTTRTYDLNKPPEFSFEKAR	

FIG. 1A-1

```

apPKG 228 ASVKAVTHTT-LWVLD RRRVFOAIMMKTGLORREENMAFLKSVPLLNKLPDKLAKMSDVL EYDFFHENEYI IREGAAGDTFFL NKGEVKVTQKI
  DGI 261 ASIRVLSEARVWVLD RRRVFOAIMMCTGLQRIENSVNFRSVP LLMNSEL LAKIADVLELEFYAAGTYI IROGTAGDSFFLISQGNVRVTQKL
hpKG1a 179 ATVKTLVNVK-LWAIDRQCFCQIMMRTGLIKHTEYMEFLKSVPTFQSLPEEILSKLADVLEETHYENGEYI IROGARGDTFFIISKGTVNVTRD
mpKG1b 194 ATVKTLVNVK-LWAIDRQCFCQIMMRTGLIKHTEYMEFLKSVPTFQSLPEEILSKLADVLEETHYENGEYI IROGARGDTFFIISKGTVNVTRD
DG2T3A 250 ATITATECN-LWAIERQCFCQIMMRTGLIQAEYSDFLKSVPFKDAEDTLKISDVL EETHYQRGDHIVROGARGDTFFIISKGTVNVTRD
hpKGII 244 ASVKAITNVK-TWALDREVFQIMRRTAQARDEQYRNF LRSVSL LKNLPEDKLT KIIDCLEVEYDKGDYI IREGEEGSTFFLAKGKVKVTQST
mpKGII 244 ASVKAITNVK-TWALDREVFQIMRRTAQARDEEYRNF LRSVSL LKNLPEDKLT KIIDCLEVEYDKGDYI IREGEEGSTFFLAKGKVKVTQST

apPKG 322 AGHA-EPKEVRRLLKRGDYFGEKALLSEDRRTANVIALPP-GVECLTVDRSFTQVGDUNELR-----NKDYGDEARGAERRSG-----SD
  DGI 356 TPTSPEETELRTL SRGDYFGEQALINEDKRTANI IALSP-GVECLTLDRDSFKRLIGDLCELK-----EKDYGDESRLKAMKQA-----RE
hpKG1a 273 SPSE-DPVFLRTLKGDNWFGKALQGEDVRTANVIAAEA--VTCLVIDRDSFKHLIGGLDDVS-----NKAYEDA EAKAKYEA-----
mpKG1b 288 SPSE-DPVFLRTLKGDNWFGKALQGEDVRTANVIAAEA--VTCLVIDRDSFKHLIGGLDDVS-----NKAYEDA EAKAKYEA-----
DG2T3A 344 QDRQ-EEKFIRMLGKGDFFGKALQGDRLTANI ICESADGVSLVIDRETFNQLISNLDEIK-----HR--YDDEG-AMERRK-----
hpKGII 338 EGH D-QPQLIKTLQKGEYFGEKALISDDVRSANI IAEEN-DVACLVIDRETFNQTVGTFEELQKYLEGYVANLNRDDEKRHAKRSMNMKLSKAL
mpKGII 338 EGH D-QPQLIKTLQKGEYFGEKALISDDVRSANI IAEEN-DVACLVIDRETFNQTVGTFEELQKYLEGYVATLNRDDEKRHAKRSMNMKLSKAL

apPKG 401 STVSPVSERPVAK EFENCSLDDLQVTTLGMGGFGRVELVQLS-KEKGT FALKCLKKKHIVETROQEHYSEKKIMMEADSPFITKLHKTFRDR
  DGI 346 SCQDEPKEQ-LQQEFPDLKLTDL E VSTLGI GGFGRVELVKAHQDRVDIFALKCLKRRHIVDTKQEEHIFSERHIMLSSRSPFICRLYRTFRDE
hpKG1a 348 -----EAAF FANLKL SDFNIDTLGVGGFGRVELVQLK-SEESKTFAMKILKRRHIVDTROQEHIRSEKQIMQGAHSDFTVRLYRTFKDS
mpKG1b 363 -----EAAF FANLKL SDFNIDTLGVGGFGRVELVQLK-SEESKTFAMKILKRRHIVDTROQEHIRSEKQIMQGAHSDFTVRLYRTFKDS
DG2T3A 419 -----INEEFRDINL TDLRVJATLGVGGFGRVELVQTN-GDSSRSFALKQMKKSQIVETRQQQHIMSEKIMGEANCQFIVKLFKTFKDK
hpKGII 431 SLEMIQLKEKVARFSSSPFNLEIATLGVGGFGRVELVKVK--NENVAFAMKIRKKHIVDTKQEHYSEKRIIEELCSPFIVKLYRTFKDN
mpKGII 431 SLEMIQLKEKVARFSSSPFNLEIATLGVGGFGRVELVKVK--NENVAFAMKIRKKHIVDTKQEHYSEKRIIEELCSPFIVKLYRTFKDN

```

FIG.1A-2

apPKG 495 KYVYMLMEVCLGGELWTLRDRGNFDDL TARFCVACVLEAFSYLHAKGIIYRDLKPENLLDARGYVKLVDFGFAKKIGVGGKKTWTFCGTPEYVA
 DGI 530 KYVYMLLEACMGGETWMLRDRGSFEDNAAQFIIGCVLQAFEYLHARGIYRDLKPENMLDERGYVKIVDFGFAKQIGTSSKTWTFCGTPEYVA
 hPKG1a 432 KYLYMLEACLGGELWTLRDRGSFEDSTRFYTACVWEAFAYLHSGKGIYRDLKPENLILDRGYAKLVDFGFAKKIGFGGKKTWTFCGTPEYVA
 mPKG1b 447 KYLYMLEACLGGELWTLRDRGSFEDSTRFYTACVWEAFAYLHSGKGIYRDLKPENLILDRGYAKLVDFGFAKKIGFGGKKTWTFCGTPEYVA
 DG2T3A 503 KYLYMLMESCLGGELWTLRDKGNFDDSTRFYTACVWEAFDYLSHRNIIYRDLKPENLLNERGYGKLVDFGFAKKLQTRKKTWTFCGTPEYVA
 hPKG1I 524 KYVYMLLEACLGGELWTLRDRGSFDEPTSKFCVACVTEAFDYLRHLGIIYRDLKPENLILDAEGYLKLVDFGFAKKIGSGGKTWTFCGTPEYVA
 mPKG1I 524 KYVYMLLEACLGGELWTLRDRGSFDEPTSKFCVACVTEAFDYLRHLGIIYRDLKPENLILDADGYLKLVDFGFAKKIGSGGKTWTFCGTPEYVA

 apPKG 590 PEIILNKGHDSADYWSLGIIMYELLNGTTPFSGSDPMRTYNIILKGIHIEFPKKISRSAYL IKKLCRONPMERLGYKNGIGSDIRKKNMFQG
 DGI 625 PEIILNKGHDRADVYMALGIL IHELLNGTTPFSAPDPMQTYNLILKGIAMIAPFKHISRWAQVLIKRLCRDVPSERLGYQTGGIQDIKKHKWFLG
 hPKG1a 527 PEIILNKGHDISADYWSLGIIMYELL TGSPPFSGDPMKTYNIILRGIDMIEFPKIAKWAANLIKLCRDNPSERLGNLKNYKDIQKHKWFEG
 mPKG1b 542 PEIILNKGHDISADYWSLGIIMYELL TGSPPFSGDPMKTYNIILRGIDMIEFPKIAKWAANLIKLCRDNPSERLGNLKNYKDIQKHKWFEG
 DG2T3A 598 PEVILNRGHDISADYWSLGLVMFELL TGTPPFTGSDPMRTYNIILKGIIDAEFPRNITRNASNL IKKLCRONPAERLGYQGGISEIQKHKWFDG
 hPKG1I 619 PEVILNKGHDFSVDFWSLGIILVYELL TGNPFSGVQDMTYNLILKGIEMDFPRKI TRRPEDLIRRLCRQNPTERLGNLKNYKDIQKHKWFLNG
 mPKG1I 619 PEVILNKGHDFSVDFWSLGIILVYELL TGNPFSGVQDMTYNLILKGIEMDFPRKI TRRPEDLIRRLCRQNPTERLGNLKNYKDIQKHKWFLNG

 apPKG 685 FDWDGLMDLTLTPPIVPKVKNPTDTSNFDSPYRDMO - IAADELSGWDIDF
 DGI 720 FDWDGLASQLLIPPFVRIAPHTDVRYDFRFPCLDN - EPPDELSGWDADF
 hPKG1a 622 FNWEGLRKGTLTPPIPSVASPTDTSNFDSPEDNDEPPDDNSGWDIDF
 mPKG1b 637 FNWEGLRKGTLTPPIPSVASPTDTSNFDSPEDSDEPPDDNSGWDIDF
 DG2T3A 693 FYWGLQNLTEPPIKPAVKSVDTTNFDDYPPDPEGPPDDVTGMDKOF
 hPKG1I 714 FNWEGLKARSLPSPLQRELKPIDHSYFDKYPPEKG - MPPDELSGWDKOF
 mPKG1I 714 FNWEGLKARSLPSPLRRELSGPIIDHSYFDKYPPEKG - VPPDEMNSGWDKOF

FIG. 1A-3

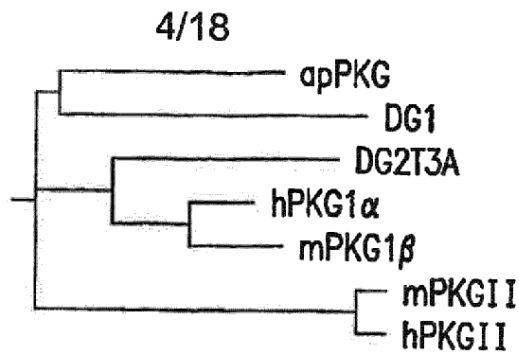


FIG.1B

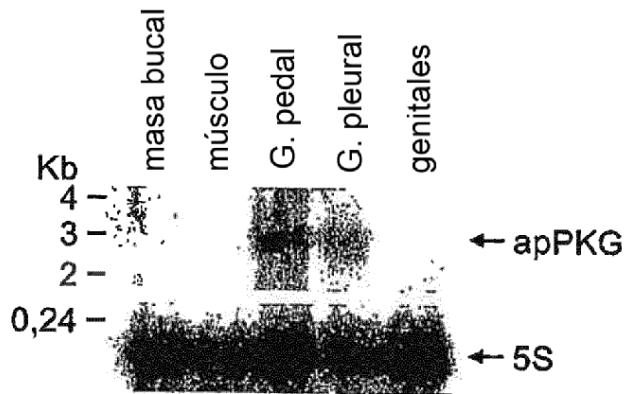


FIG.1C

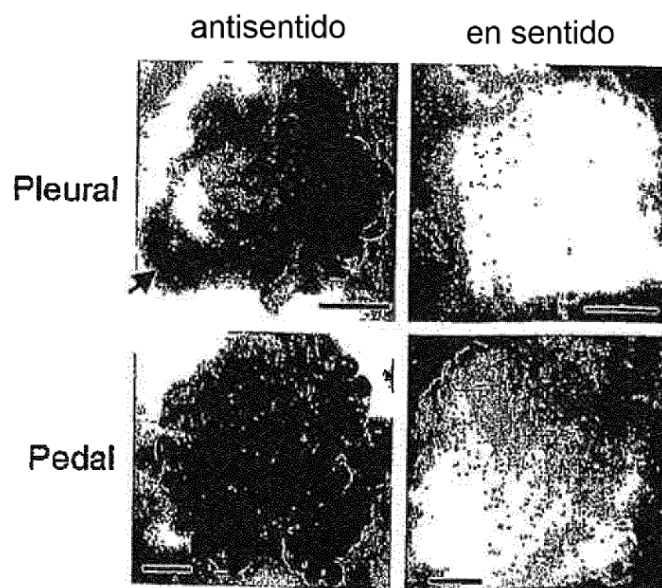


FIG.1D

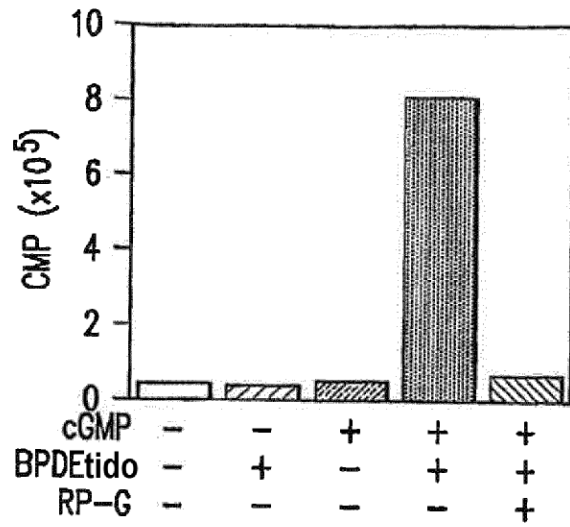


FIG.2A

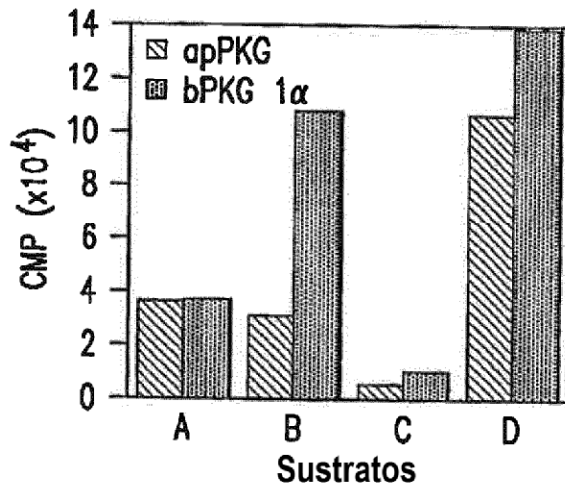


FIG.2B

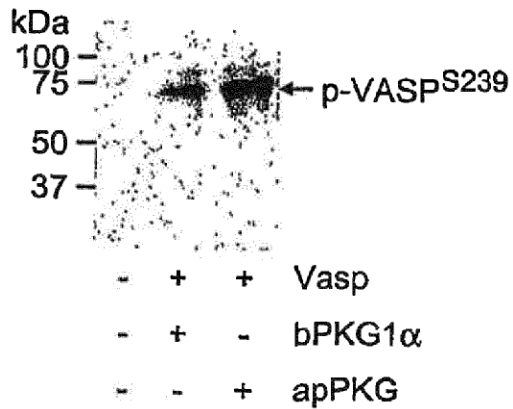


FIG. 2C

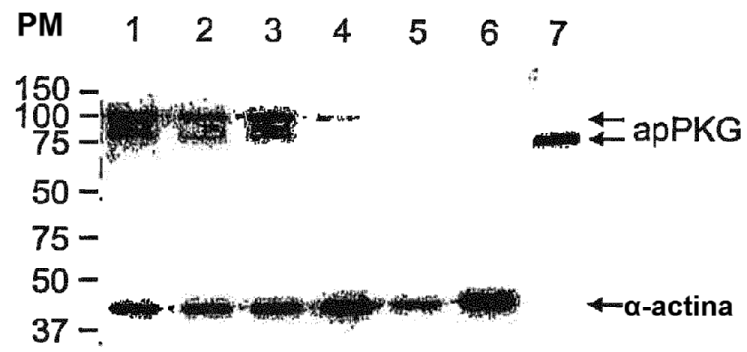


FIG.3A

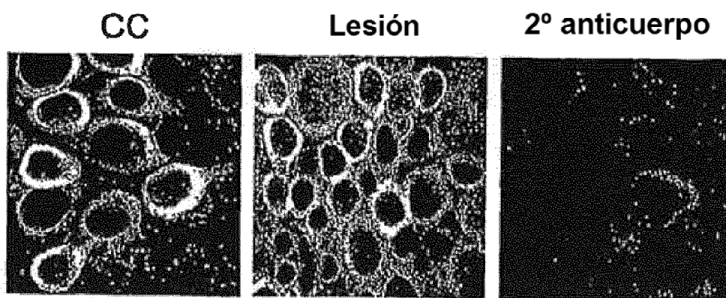


FIG.3B

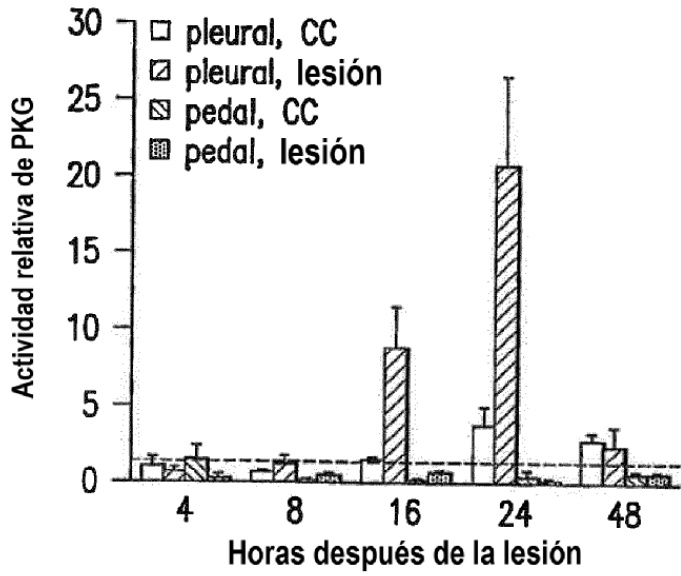


FIG.4A

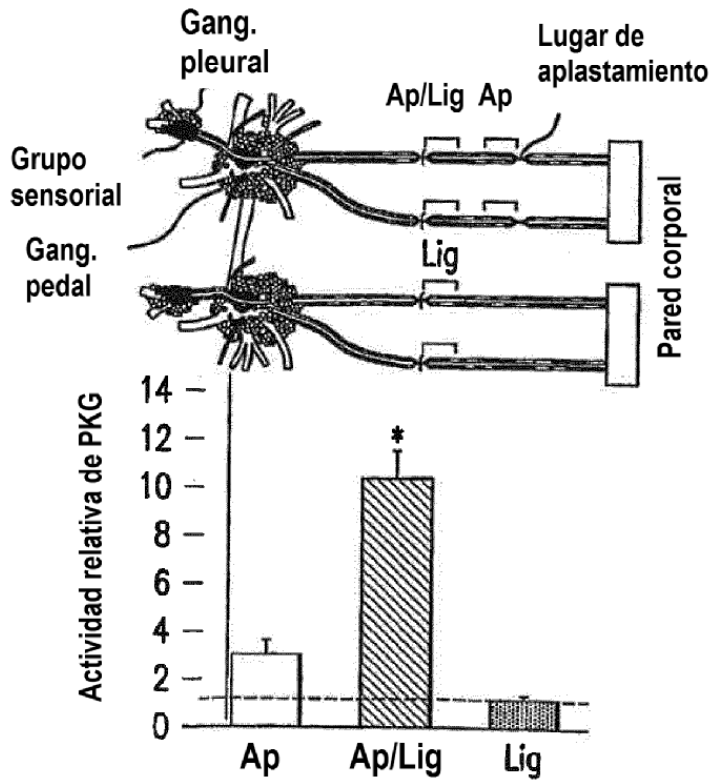


FIG.4B

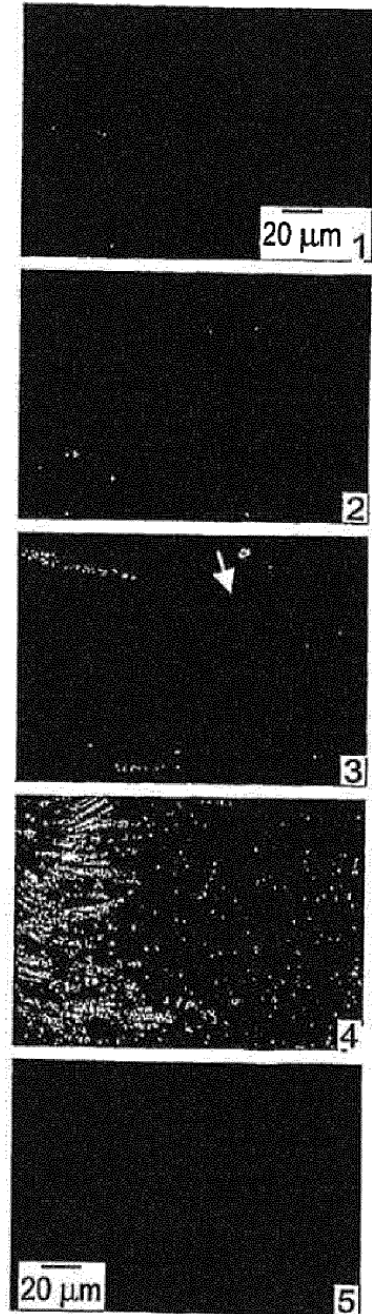


FIG.4C

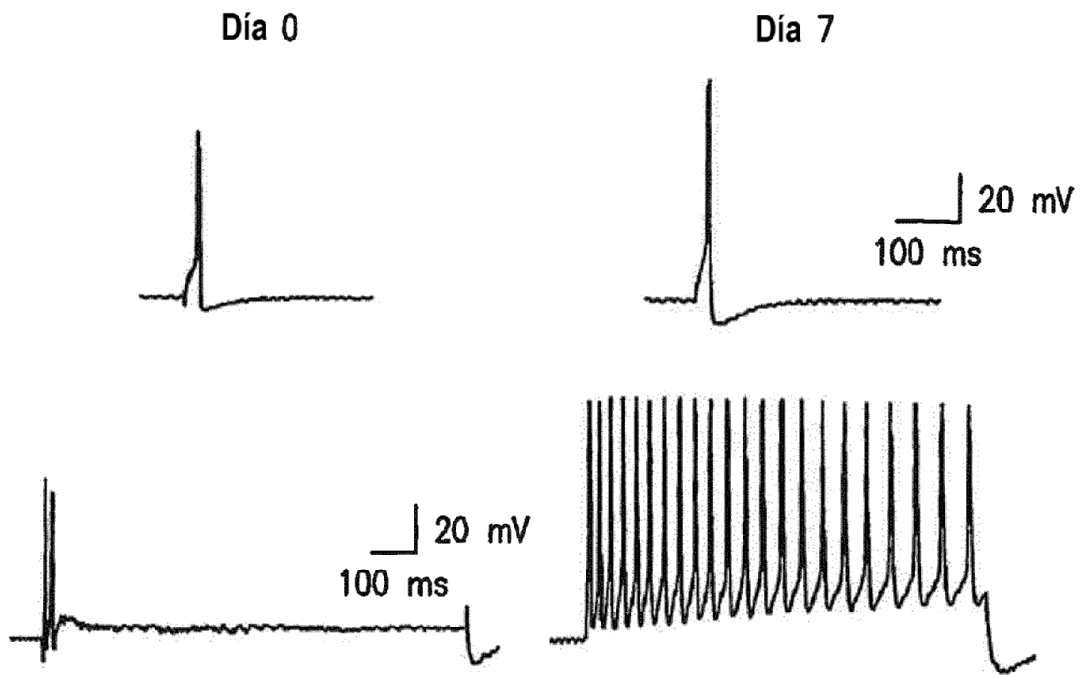


FIG.5A

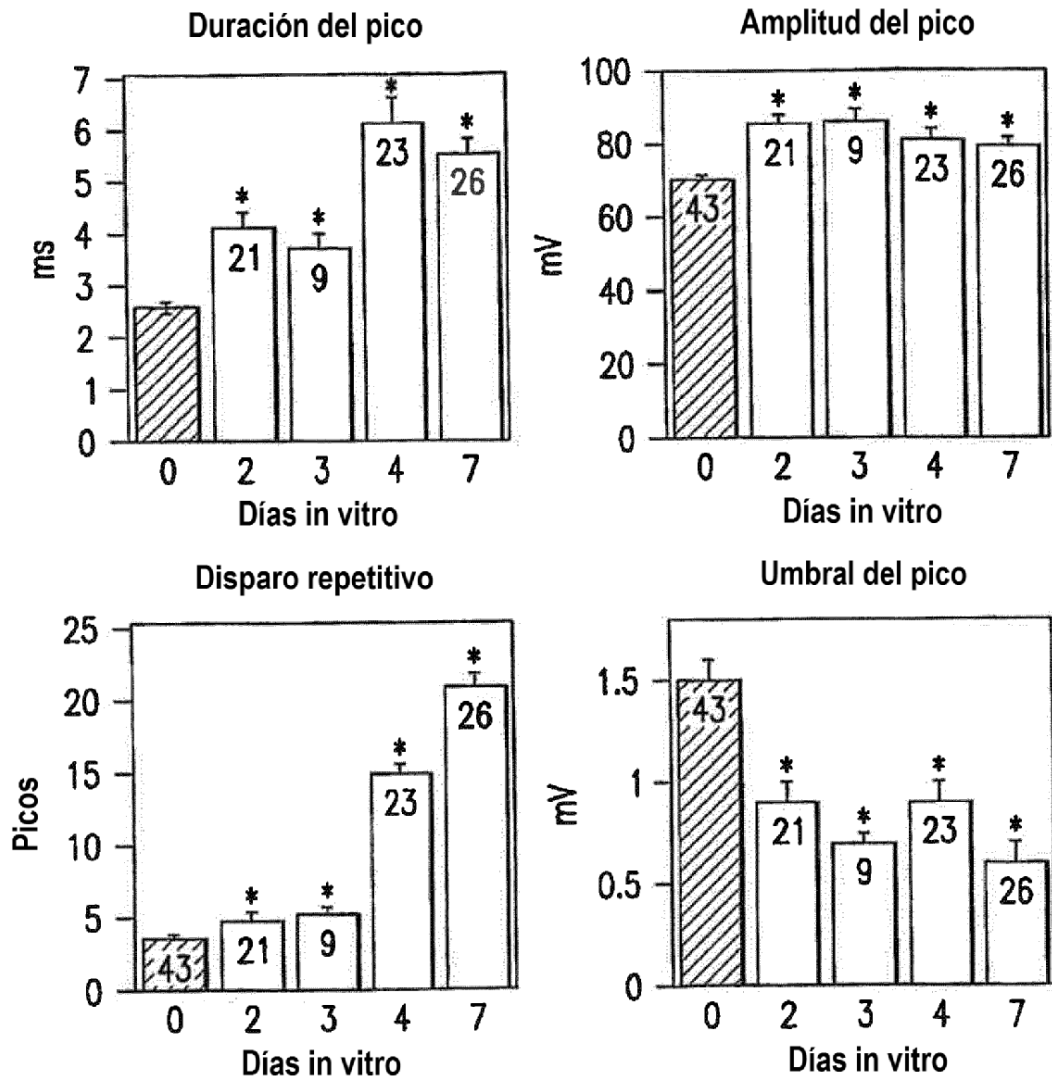


FIG.5B

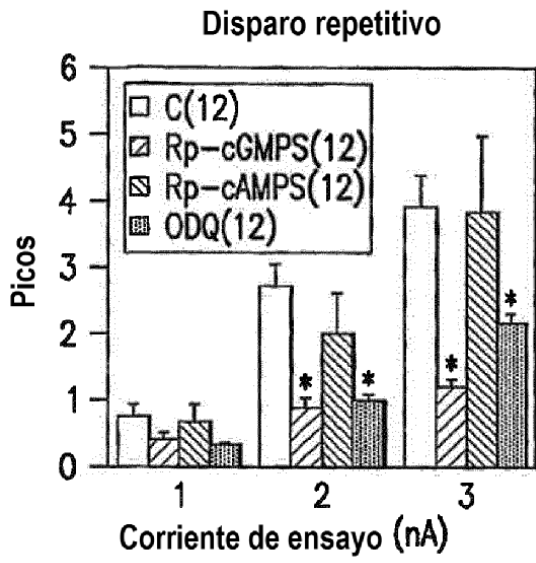


FIG.6A

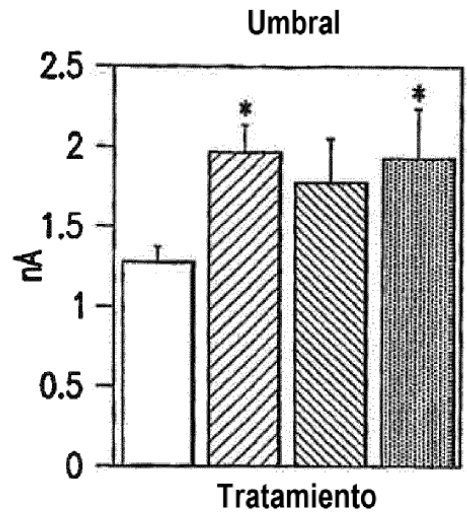


FIG.6B

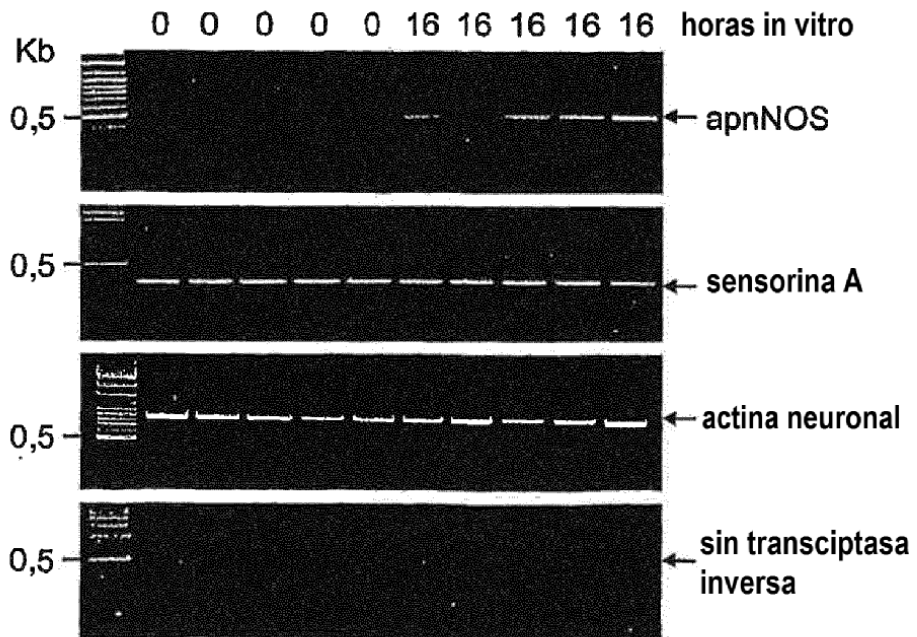


FIG.6C

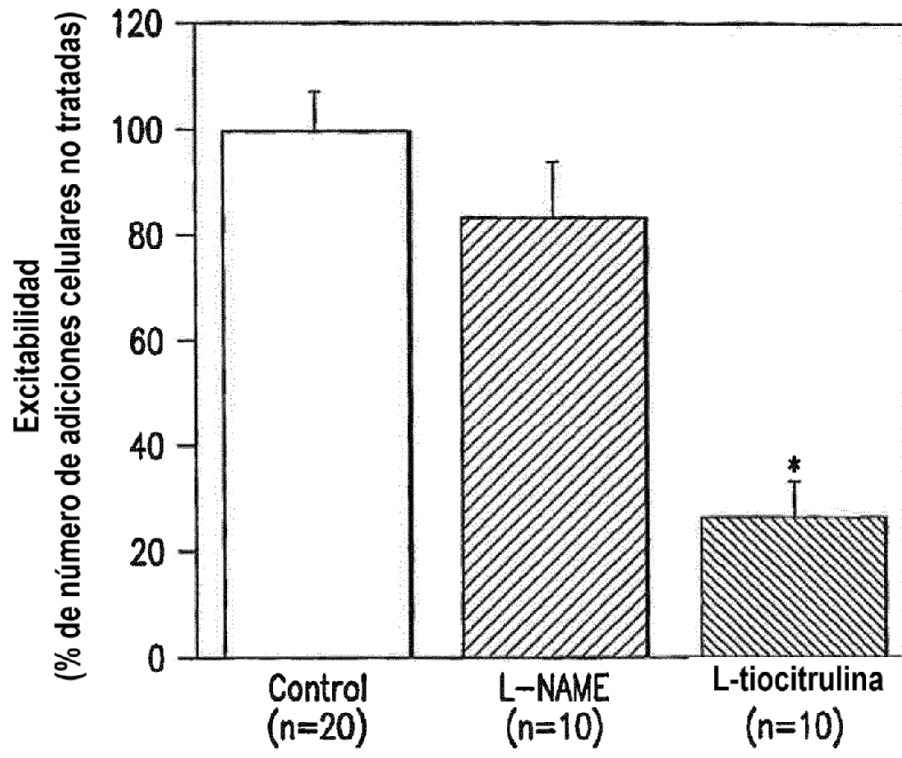


FIG.6D

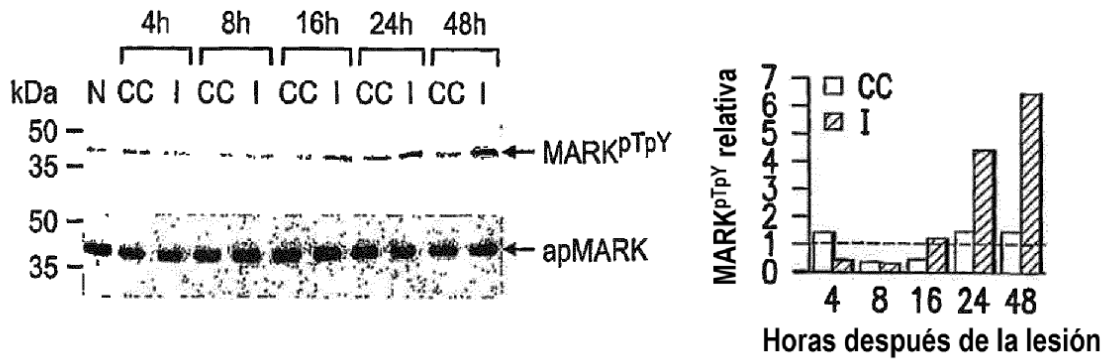


FIG. 7A

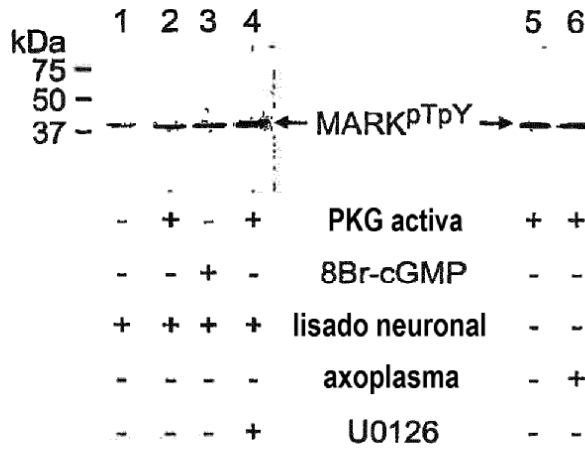


FIG. 7B

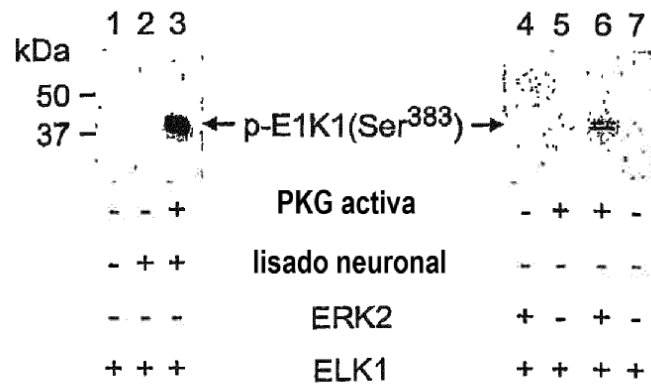


FIG. 7C

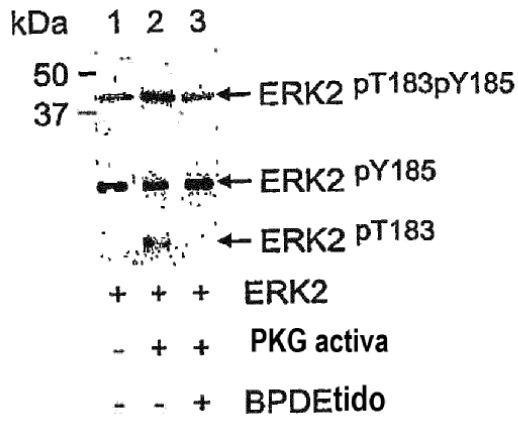


FIG.7D

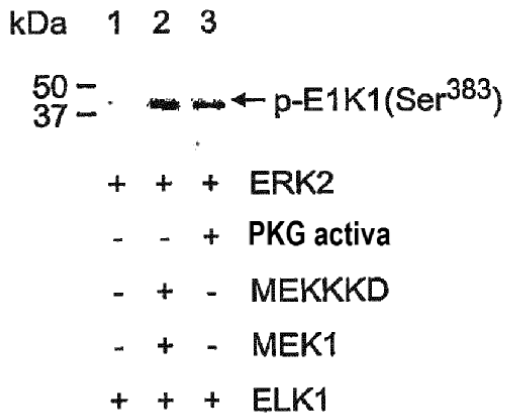


FIG.7E

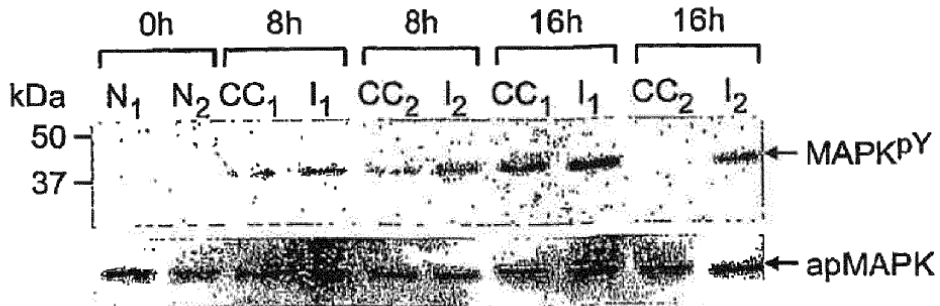


FIG. 7F

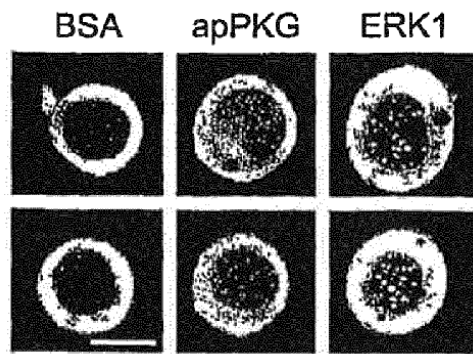


FIG.8A

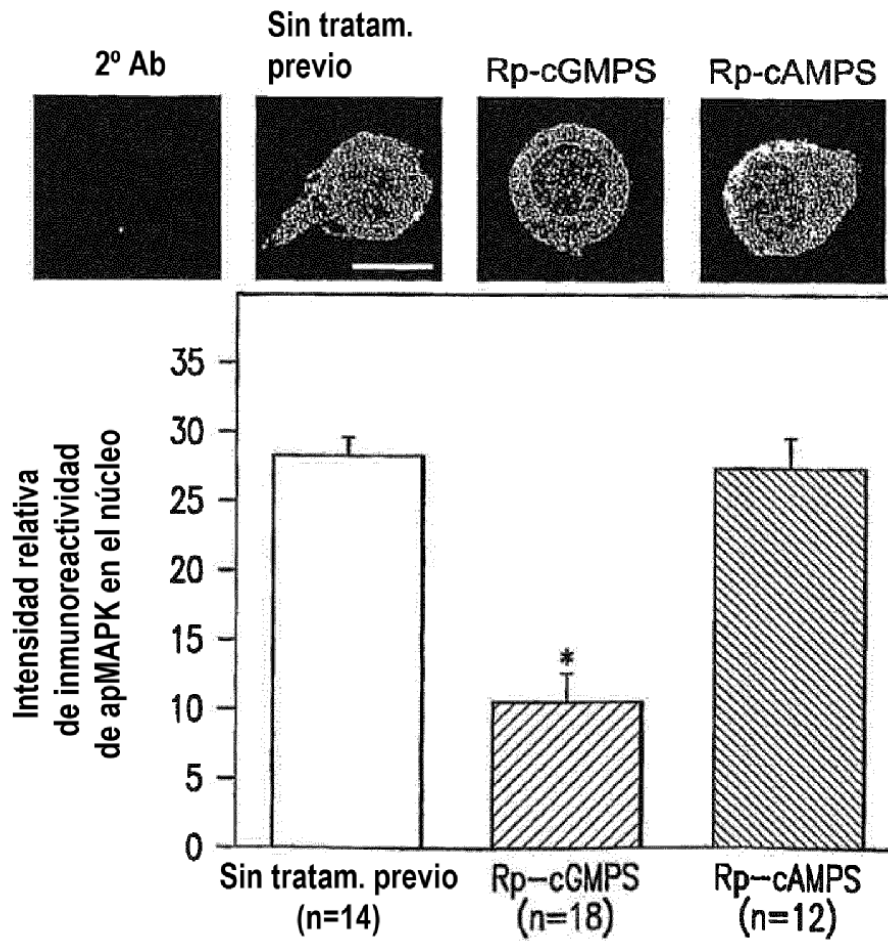


FIG.8B

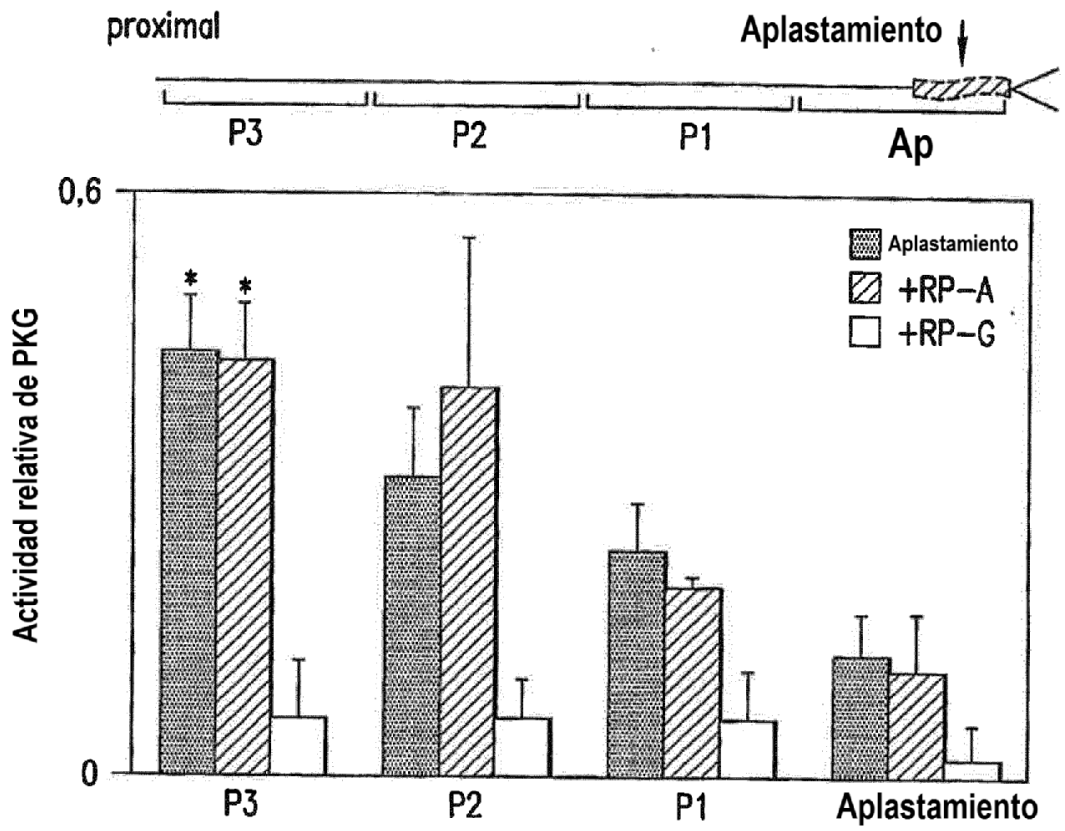


FIG.9

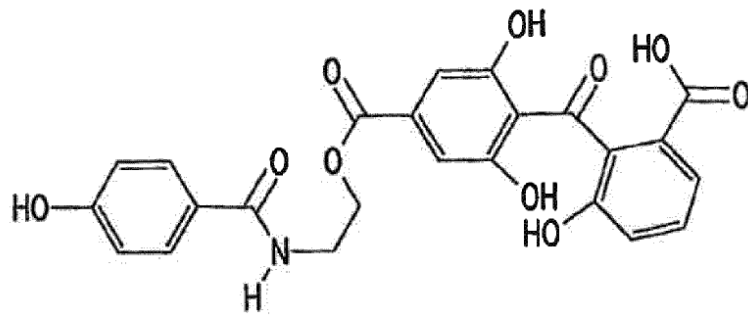


FIG. 10A

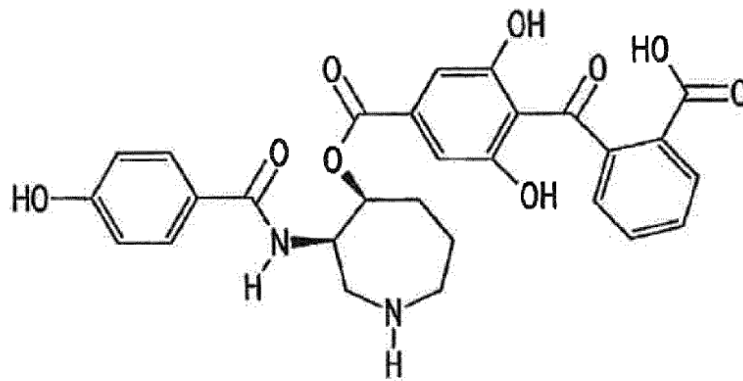


FIG. 10B

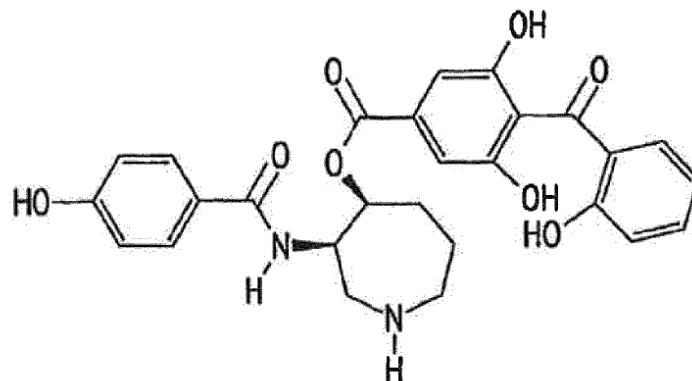


FIG. 10C

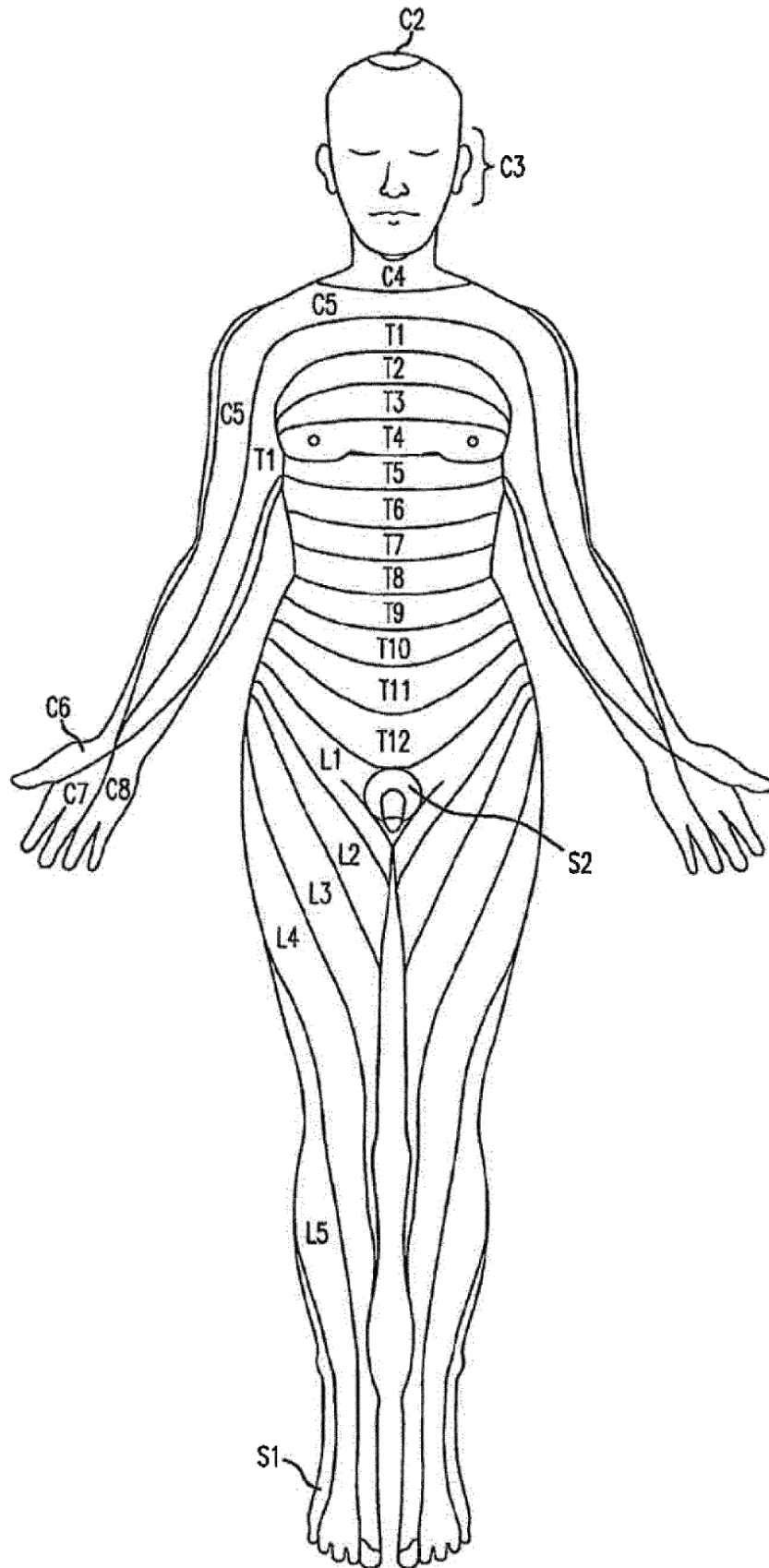


FIG. 11A

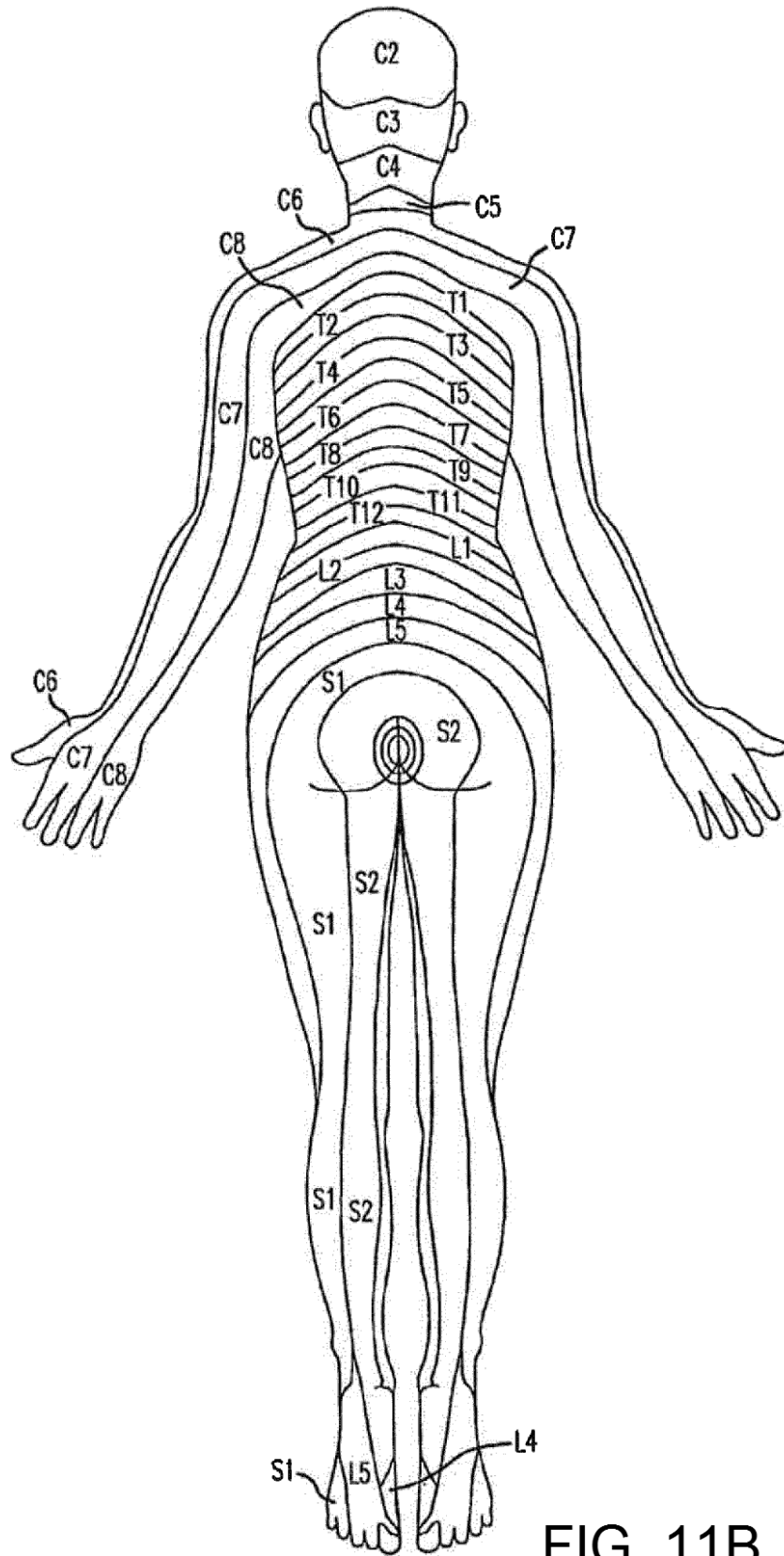


FIG. 11B