

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 042**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2015 PCT/EP2015/065545**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16005422**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2015 E 15734409 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3167063**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento del dolor neuropático**

30 Prioridad:

09.07.2014 EP 14306114

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

27.06.2019

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CARROLL, PATRICK;
PATTYN, ALEXANDRE y
VENTEO, STÉPHANIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 718 042 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

Métodos y composiciones para el tratamiento del dolor neuropático

Campo de la invención

5 La invención pertenece al campo de la neurología. Más en particular, la invención proporciona métodos y composiciones que comprenden un inhibidor de la expresión del gen de FXYD2 para tratar el dolor neuropático. En el presente documento se proporcionan también métodos para administrar la composición de la invención mediante inyección intratecal en un paciente que lo necesite.

Antecedentes de la invención

10 El dolor se divide generalmente en dolor nociceptivo y dolor neuropático. El dolor nociceptivo se deriva de las vías neurales en respuesta a señales dañinas para el tejido o potencialmente dañinas para el tejido, e incluye el dolor inflamatorio. El dolor neuropático tiende a relacionarse con disfunciones dentro del sistema nervioso. Desgraciadamente, los agentes que tratan un tipo de dolor no necesariamente tratan al otro. El dolor neuropático se distingue del dolor inflamatorio en que no está mediado por el ácido araquidónico, las ciclooxigenasas ni las prostaglandinas. Por tanto, el dolor neuropático no se reduce ni se alivia con los agentes antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, inhibidores de las ciclooxigenasas ("COX"), incluyendo los inhibidores selectivos de la COX-2.

15 Bouchet T.J et al. 2000 describe que el factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF) tanto previenen como revierten anomalías sensoriales que se desarrollaron en modelos de dolor neuropático por tratamiento de GDNF intratecal. También se ha demostrado que la infusión intratecal de GDNF previene e invierte la expresión conductual del dolor neuropático experimental procedente de una lesión de los nervios raquídeos (R Wang et al 2003).

20 Hasta hoy, los agentes farmacológicos que más comúnmente se ha demostrado que bloquean eficazmente el dolor neuropático son los antidepresivos tricíclicos (TCA). Sin embargo, estos agentes no son en absoluto efectivos en algunos pacientes y son solamente parcialmente efectivos en otros. Los TCA tienen muchas desventajas bien conocidas en este campo. Sin embargo, dado que el dolor neuropático es una condición debilitante y difícil de tratar, los TCA se han utilizado a pesar de sus desventajas en ausencia de agentes con menos efectos adversos.

25 Por tanto, la terapia del dolor neuropático es una necesidad clínica no satisfecha y creciente.

Recientemente se demostró que FXYD2, que codifica la subunidad gamma de la Na,K-ATPasa que hasta ahora se ha reportado que se expresa principalmente en el riñón, es inducido en los DRGs de ratón en los estadios postnatales donde se restringe específicamente a las neuronas nociceptivas no peptidérgicas que expresan TrkB mecanoceptivas y Ret-positivas/de unión a IB4.

30 En consecuencia, FXYD2 fue considerado como un nuevo marcador específico restringido exclusivamente a dichos mecanorreceptores y nociceptores de neuronas somato-sensoriales primarias (Ventéo et al, 2012).

Sumario de la invención

35 En un primer aspecto, la invención describe un inhibidor de la expresión del gen FXYD2 para uso en un método para tratar el dolor neuropático en un paciente que lo necesite, en donde dicho inhibidor se selecciona del grupo que consiste en ARNs, shARNs, oligonucleótidos antisentido o ribozimas.

En un segundo aspecto, la invención describe una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la expresión del gen FXYD2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición farmacéutica se formula para una administración directa en el sistema nervioso central periférico de un paciente, en donde dicho inhibidor se selecciona del grupo que consiste en ARNs, shARNs, oligonucleótidos antisentido o ribozimas.

40 En un tercer aspecto, la invención describe una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la expresión del gen de FXYD2 para uso en un método para tratar el dolor neuropático en un paciente en necesidad de dicho tratamiento.

Descripción detallada de la invención

45 La invención se basa en modelos experimentales de dolor neuropático en dos especies diferentes (ratón y rata) y utilizando dos métodos diferentes para manipular la expresión de *Fxyd2* (mutación génica y ARNsi) que muestra que la función de *Fxyd2* es necesaria para la expresión completa del comportamiento del dolor neuropático. En ambos modelos experimentales, la pérdida o la disminución de la función de *Fxyd2* causó una drástica reducción del comportamiento del dolor. Tales resultados sugieren que *Fxyd2* en las neuronas somatosensoriales es una nueva diana terapéutica para tratar el dolor neuropático.

Métodos terapéuticos y usos

En un primer aspecto, la invención se refiere a un inhibidor de la expresión del gen FXYD2 para uso en un método

para el tratamiento del dolor neuropático en un paciente que lo necesite, en donde dicho inhibidor se selecciona del grupo que consiste en ARNs, shARNs, oligonucleótidos antisentido o ribozimas.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "regulador 2 del transporte de iones que contiene el dominio FXYD" (también conocido como "FXYD2") tiene su significado general en la técnica y se refiere a la subunidad gamma de la Na,K-ATPasa. El término incluye variantes naturales de FXYD2 y formas modificadas de las mismas. El gen FXYD2 humano de origen natural tiene una secuencia de nucleótidos como se muestra en el número de registro Genbank NM_001680.4 (variante a) y NM_021603.3 (variante b).

Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibidor de la expresión génica" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir la expresión de un gen.

10 La invención describe que dicho inhibidor de la expresión génica es un ARNsi, un shARN, un oligonucleótido antisentido o una ribozima.

15 Los inhibidores de la expresión génica para uso en la invención pueden basarse en constructos de oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido, incluyendo las moléculas de ARN antisentido y las moléculas de ADN antisentido, actuarían para bloquear directamente la traducción del ARNm señalado uniéndose al mismo y, por lo tanto, evitarían la traducción de proteínas o aumentarían la degradación del ARNm, disminuyendo así el nivel de la proteína diana (es decir, FXYD2), y por lo tanto la actividad, en una célula. Por ejemplo, pueden sintetizarse oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia del transcripto de ARNm que codifica la proteína diana, por ejemplo mediante técnicas de fosfodiéster convencionales, y administrarse, por ejemplo, mediante inyección intravenosa o infusión. Los métodos para usar técnicas antisentido para inhibir específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia es conocida son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véanse las patentes de EE. UU. nº 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321 y 5.981.732). Los ARN inhibitorios pequeños (ARNsi) pueden también funcionar como inhibidores de la expresión génica para su uso en la presente invención. La expresión génica se puede reducir poniendo en contacto el sujeto o la célula con un pequeño ARN bicatenario (dsARN), o un vector o construcción que provoca la producción de un pequeño ARN bicatenario, de manera que la expresión génica se inhibe específicamente (es decir, la interferencia del ARN o ARNi). Los métodos para seleccionar un dsARN apropiado o un vector de codificación de dsARN son bien conocidos en la técnica para genes cuya secuencia se conoce (por ejemplo, véase Tuschli, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, G. J. (2002); McManus, M. T. et al. (2002); Brummelkamp, T. R. et al. (2002); Patentes de EE. UU. Nos. 6.573.099 y 6.506.559; y Publicación de Patente Internacional Nos. WO 01/36646, WO 99/32619, y WO 01/68836). Los ARN de horquilla corta (ARNsi) pueden también funcionar como inhibidores de la expresión génica para su uso en la invención.

35 Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión génica para su uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del ARN. El mecanismo de la acción de la ribozima implica la hibridación específica de la secuencia de la molécula de la ribozima con el ARN diana complementario, seguido de la escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima diseñadas en horquilla o cabeza de martillo que catalizan específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de las secuencias de ARNm dirigidas son, por tanto, útiles dentro del alcance de la presente invención. Los sitios específicos de escisión de la ribozima dentro de cualquier objetivo potencial de ARN se identifican inicialmente escaneando la molécula diana en busca de sitios de escisión de la ribozima, lo que típicamente incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, las secuencias cortas de ARN de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión se pueden evaluar en relación con las características estructurales predichas, tal como la estructura secundaria, que pueden hacer que la secuencia de oligonucleótidos haga inadecuada. La idoneidad de las dianas candidatas también puede evaluarse probando su accesibilidad para la hibridación con oligonucleótidos complementarios, usando, por ejemplo, ensayos de protección de ribonucleasa.

45 Los oligonucleótidos antisentido, ARNs, shARNs y ribozimas útiles como inhibidores de la expresión génica, pueden prepararse por métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para la síntesis química tales como, por ejemplo, mediante la síntesis química de fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN antisentido pueden generarse por transcripción in vitro o in vivo de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Tales secuencias de ADN pueden incorporarse en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados, tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Se pueden introducir diversas modificaciones a los oligonucleótidos de la invención como medio para aumentar la estabilidad intracelular y la vida media. Las posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a ellas, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o de desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en vez de uniones fosfodiéster dentro del esqueleto del oligonucleótido.

60 Los oligonucleótidos antisentido, ARNsi, shARN y ribozimas de la invención pueden administrarse in vivo solo o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del ARNsi del oligonucleótido antisentido o del ácido nucleico de la ribozima, a las células. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con una degradación reducida en relación con el grado de degradación que resultaría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a ellos,

plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han sido manipulados mediante la inserción o incorporación del oligonucleótido antisentido ARNsi o secuencias del ácido nucleico del ribozima. Los vectores virales son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a ellos, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus, tal como el virus de la leucemia murina de Moloney, el virus del sarcoma murino de Harvey, el virus del tumor mamario murino y el virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociados; virus del tipo SV40; virus de polioma; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus vaccinia; virus de la polio y virus de ARN tal como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores conocidos en la técnica.

Los vectores víricos preferidos se basan en virus eucarióticos no citopáticos en los que los genes no esenciales se han reemplazado con el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (p. ej. lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa del ARN viral genómico en ADN con la integración proviral posterior en el ADN celular del hospedador. Los retrovirus han sido aprobados para ensayos de terapia génica en seres humanos. Los más útiles son aquellos retrovirus que son deficientes en la replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retroviral alterados genéticamente tienen una utilidad general para la transducción de genes de alta eficacia *in vivo*. Protocolos estándar para producir retrovirus deficientes en la replicación (incluidos los pasos de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, la transfección de una célula de empaquetamiento forrada con plásmido, la producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetamiento, la recolección de partículas virales de medios de cultivo de tejidos, y la infección de las células diana con partículas virales), se proporcionan en KRIEGLER (A Laboratory Manual, "WH Freeman C. O., New York, 1990) y en MURRY ("Methods in Molecular Biology", vol.7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991).

Los virus preferidos para ciertas aplicaciones son los adeno-virus y los virus adenoasociados, que son virus de ADN bicatenario que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica. El virus adenoasociado puede ser diseñado para ser deficiente en la replicación y es capaz de infectar una amplia gama de tipos de células y especies. Además tiene ventajas tales como estabilidad al calor y al disolvente lipídico; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluidas las células hematopoyéticas; y la falta de inhibición de la superinfección, permitiendo así series de transducciones múltiples. Según se informa, el virus adenoasociado puede integrarse en el ADN celular humano de una manera específica del sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis de inserción y la variabilidad de la expresión génica insertada característica de la infección retroviral. Además, las infecciones por virus adenoasociados de tipo silvestre se han seguido en el cultivo de tejidos durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un evento relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de manera extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores de plásmidos. Los vectores de plásmidos se han descrito ampliamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, SAMBROOK et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. En los últimos años, se han utilizado vectores de plásmidos como vacunas de ADN para suministrar genes que codifican antígenos a células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para esto porque ya no tienen los mismos problemas de seguridad que muchos de los vectores virales. Sin embargo, estos plásmidos que tienen un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido de un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos plásmidos de uso común incluyen pRC/CMV y SV40. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, los plásmidos pueden diseñarse a la medida utilizando enzimas de restricción y reacciones de ligación para eliminar y agregar fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos pueden administrarse en solución acuosa, secarse sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de ADN que incluye, pero sin limitarse a ellos, liposomas, dendrímeros y microencapsulación.

Los ejemplos de inhibidores de la expresión del gen FXYD2 incluyen ARNsi de FXYD2 tal como el ARNsi "ON-TARGET plus" dirigido contra el mRNA de *Fxyd2* de rata (ref. TMOSLR-005187) fueron suministrados por Thermo Scientific, que se representa por la secuencia de sentido 5'- AAUCCCUUCGAGUAUGAUUU-3' (SEC ID NO: 1).

La invención describe que dicho ARNsi de FXYD2 está dirigido contra el gen FXYD2 humano. Dicho ARNsi es, por ejemplo, ARNsi de FXYD2 humano descritos en Gegelashvili et al., 2007, que están representados por

la secuencia de sentido - 5'-UAAGAAGCGCAGGCAAUCA-3' (SEC ID NO: 2), y

la secuencia antisentido - 5'- GAUUUGCCUGCGCUUCUUA-3' (SEC ID NO: 3).

La invención describe que los ARNsi de FXYD2 humanos contienen dos salientes de nucleótidos en su extremo 3' (por ejemplo, 2 desoxitimidinas (dT-dT)).

Otros ARNsi de FXYD2 humanos están disponibles comercialmente e incluyen, por ejemplo, los adquiridos de Origene (Cat. No. SR300342), Santa Cruz (Cat. No. SC-42422), Dharmacon (L-017391-00; LU-017391-00; LQ-017391-00; J-017391-05; J-017391-06; J-017391-07; J-017391-08) y Life Technologies (n.º de catálogo 1299001).

Como se usa en este documento, la expresión "dolor neuropático" se refiere al dolor resultante de una patología en el sistema nervioso. Las características notables del dolor neuropático incluyen (1) dolor generalizado que no es

explicable; (2) evidencia de déficit sensorial; (3) dolor ardiente; (4) dolor al acariciar suavemente la piel (alodinia); y (5) aumento del dolor dependiente del estímulo (hiperalgesia) y (6) ataques de dolor sin aparente provocación (dolor independiente del estímulo). El dolor neuropático se origina de una lesión del sistema nervioso. Cualquiera de una serie de enfermedades o lesiones puede ser la causa subyacente del dolor neuropático. Por ejemplo, el paciente puede padecer una enfermedad metabólica (por ejemplo, neuropatía diabética), una enfermedad autoinmunitaria (p. ej., esclerosis múltiple), una infección viral (p. ej., herpes y secuelas, neuralgia postherpética), enfermedad vascular (p. ej. apoplejía), traumatismo y/o cáncer.

La invención describe que el dolor neuropático es dolor neuropático periférico. En otra realización, el dolor neuropático es el dolor neuropático central.

La invención describe que el dolor neuropático se selecciona del grupo que consiste en neuralgia postherpética, neuralgia del trigémino, lesión focal del nervio periférico y anestesia dolorosa, dolor central debido a un accidente cerebrovascular o lesión masiva, lesión de la médula espinal o esclerosis múltiple, y neuropatía periférica debida a la diabetes, el VIH o la quimioterapia, el dolor postoperatorio y el dolor post-amputación.

Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un mamífero tal como un ser humano o un mamífero no humano, incluyendo primates (por ejemplo, macaco, pan troglodita, pongo), un mamífero domesticado (por ejemplo, felinos, caninos), un mamífero de ganadería (por ejemplo, bovino, ovino, porcino, equino) y un mamífero o roedor de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, lagomorfos, hámsteres).

Como se usa en el presente documento, la expresión "paciente que necesita tratamiento" se refiere a un paciente que sufre de dolor neuropático periférico, por ejemplo, como resultado de una condición patológica que incluye polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda y crónica; polineuropatía alcohólica; polineuropatía inducida por quimioterapia; síndrome de dolor regional complejo; neuropatías por atrapamiento (p. ej. síndrome del túnel carpiano); neuropatía sensorial por HfV; neuralgias iatrogénicas (p. ej. dolor postmastectomía o dolor post-toracotomía); neuropatía sensorial idiopática; compresión o infiltración nerviosa por tumor; neuropatías relacionadas con deficiencias nutricionales; neuropatía diabética dolorosa; dolor del miembro fantasma; neuralgia postherpética; plexopatía post-radiación; radiculopatía (cervical, torácica o lumbosacra), neuropatías relacionadas con la exposición tóxica, tic doloroso (neuralgia del trigémino); y/o neuralgias postraumáticas.

La invención describe que el paciente que necesita tratamiento puede estar sometido a sufrir dolor neuropático crónico o intermitente. En otra realización, el paciente que lo necesita puede o no estar exhibiendo o experimentando síntomas de dolor neuropático en el momento del tratamiento.

También se describe un método para tratar el dolor neuropático en un paciente que necesita tratamiento, que comprende una etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de la expresión del gen FXD2 de una manera tal que el inhibidor se administra directamente en el sistema nervioso periférico de dicho paciente.

También se describe un método para tratar el dolor neuropático en un paciente que necesita tratamiento, que comprende una etapa de administración intratecal de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de la expresión del gen FXD2 en dicho paciente.

El inhibidor de la invención se puede administrar en forma de una composición farmacéutica, como se define a continuación. Preferiblemente, dicho inhibidor es una cantidad terapéuticamente efectiva. Por "una cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad del agente que es suficiente para tratar el dolor neuropático en una relación razonable de beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento médico. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente efectiva del agente activo" para un paciente es una cantidad del agente activo que induce, mejora o produce una mejoría en los síntomas patológicos, la progresión de la enfermedad o las condiciones físicas asociadas con la enfermedad que afecta al paciente. Los presentes métodos encuentran uso en el tratamiento, es decir, reducir, mitigar, aliviar, mejorar o inhibir el dolor neuropático en un paciente que lo necesite. Los términos "reducir", "inhibir", "mitigar", "aliviar" se refieren a la disminución detectable en los síntomas del dolor neuropático, según lo determine un observador clínico capacitado. Una reducción del dolor neuropático se puede medir mediante una autoevaluación (por ejemplo, informando el paciente), aplicando ensayos de medición del dolor bien conocidos en la técnica (por ejemplo, pruebas de hiperalgesia y/o alodinia), y/u objetivamente (p. ej. utilizando imágenes de resonancia magnética funcional o f-MRI). La determinación de una reducción del dolor neuropático se puede hacer comparando el estado del paciente antes y después del tratamiento.

Composiciones farmacéuticas

En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la expresión génica de FXD2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición farmacéutica se formula para una administración directa en el sistema nervioso periférico (PNS) de un paciente, en donde dicho inhibidor se selecciona del grupo que consiste en ARNs, ARNs, oligonucleótidos antisentido o ribozimas.

Las composiciones farmacéuticas y los métodos relacionados son útiles para administrar un inhibidor de la expresión génica de FXD2 al SNC de un paciente (por ejemplo, por vía intratecal, intraventricular o intracisternal) y para el

tratamiento del dolor neuropático.

La invención describe que la composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la expresión génica de FXYD2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable se formula para administración intratecal.

5 Como se usa en el presente texto, los términos "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inconveniente cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según el caso. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo, sólido, semisólido o líquido.

10 En general, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden prepararse de una manera convencional usando excipientes convencionales o vehículos que son bien conocidos en la técnica.

Como se usa en el presente texto, los términos "administración intratecal" o "inyección intratecal" se refieren a una inyección en el conducto raquídeo (espacio intratecal que rodea la médula espinal). Se pueden usar varias técnicas que incluyen, sin ser limitantes, la inyección cerebroventricular lateral a través de una trepanación o punción cisternal o lumbar, o similares.

15 La invención describe que la administración intratecal se usa para administrar un inhibidor de la expresión génica de FXYD2 en el CSF. Como se usa en este documento, la administración intratecal (también denominada inyección intratecal) se refiere a una inyección en el conducto raquídeo (espacio intratecal que rodea la médula espinal). Se pueden usar varias técnicas que incluyen, sin ser limitantes, la inyección cerebroventricular lateral a través de una trepanación o punción cisternal o lumbar, o similares. Se describen métodos ejemplares en Lazorthes et al. *Advances in Drug Delivery Systems and Applications in Neurosurgery*, 143 - 192, y Omay et al, *Cancer Drug Delivery*, 1: 169 - 179.

20

De acuerdo con la descripción, se puede inyectar un inhibidor de la expresión del gen FXYD2 en cualquier región que rodea el conducto raquídeo.

25 La invención describe que el inhibidor de la expresión génica de FXYD2 se inyecta en el área lumbar o la cisterna magna o intraventricularmente en un espacio cerebroventricular.

Como se usa en el presente texto, el término "región lumbar" o "área lumbar" se refiere al área entre la tercera y cuarta vértebras lumbares (parte inferior de la espalda) y, más inclusivamente, la región L2-S1 de la columna vertebral. Típicamente, la inyección intratecal a través de la región lumbar o área lumbar también se conoce como "suministro intratecal lumbar" o "administración intratecal lumbar".

30 El término "cisterna magna" se refiere al espacio alrededor y debajo del cerebelo a través de la abertura entre el cráneo y la parte superior de la columna vertebral. Por lo general, la inyección intratecal a través de la cisterna magna también se conoce como "administración en la cisterna magna".

35 El término "ventrículo cerebral" se refiere a las cavidades del cerebro que son continuas con el canal central de la médula espinal. Por lo general, las inyecciones a través de las cavidades del ventrículo cerebral se conocen como "administración cerebral intraventricular (ICV)".

40 La invención describe que la "administración intratecal" o "suministro intratecal" se refiere a la administración intratecal lumbar, por ejemplo, administrada entre la tercera y cuarta vértebras lumbares (parte inferior de la espalda) y, más inclusivamente, la región L2-S1 de la columna vertebral. Se contempla que la administración o administración intratecal lumbar se distingue de la administración en la cisterna magna en que la administración o el suministro intratecal lumbar de acuerdo con esta invención proporciona una entrega mejor y más efectiva al canal espinal distal, mientras que la administración en la cisterna magna, entre otras cosas, típicamente no se suministra bien al conducto raquídeo distal.

45 Se pueden usar diversos dispositivos para la administración intratecal. En algunos casos, un dispositivo para administración intratecal contiene un puerto de acceso de fluido (por ejemplo, un puerto inyectable); un cuerpo hueco (por ejemplo, un catéter) que tiene un primer orificio de flujo en comunicación fluida con el puerto de acceso de fluido y un segundo orificio de flujo configurado para la inserción en la médula espinal; y un mecanismo de sujeción para asegurar la inserción del cuerpo hueco en la médula espinal. En diversas realizaciones, el puerto de acceso de fluido comprende un depósito. En algunas realizaciones, el puerto de acceso de fluido comprende una bomba mecánica (por ejemplo, una bomba de infusión). En algunas realizaciones, un catéter implantado está conectado a un reservorio (por ejemplo, para la administración de bolos) o bien a una bomba de infusión. El puerto de acceso del fluido puede ser implantado o externo.

50

La invención describe que se puede realizar la administración intratecal mediante punción lumbar (es decir, bolo lento) o bien mediante un sistema de administración porta-catéter (es decir, infusión o bolo). En algunas realizaciones, el catéter se inserta entre las láminas de las vértebras lumbares y la punta se enrosca en el espacio tecal al nivel deseado (generalmente L3-L4).

En relación con la administración intravenosa, un volumen de dosis única adecuado para la administración intratecal suele ser pequeño. Típicamente, la administración intratecal de acuerdo con la invención mantiene el equilibrio de la composición del CSF así como la presión intracraneal del sujeto. En algunas realizaciones, la administración intratecal se realiza en ausencia de la eliminación correspondiente del CSF de un paciente. En algunas realizaciones, un volumen de dosis única adecuado puede ser, por ejemplo, menos de aproximadamente 10 ml, 8 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1,5 ml, 1 ml o 0,5 ml. En algunas realizaciones, un volumen de dosis única adecuado puede ser de aproximadamente 0,5 a 5 ml, 0,5 a 4 ml, 0,5 a 3 ml, 0,5 a 2 ml, 0,5 a 1 ml, 1 a 3 ml, 1 a 5 ml, 1,5 a 3 ml, 1 a 4 ml, o 0,5 a 1,5 ml. En algunas realizaciones, el suministro intratecal de acuerdo con la invención implica una etapa de eliminación en primer lugar de una cantidad deseada de CSF. En algunas realizaciones, menos de aproximadamente 10 ml (por ejemplo, menos de aproximadamente 9 ml, 8 ml, 7 ml, 6 ml, 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml) de CSF se elimina primero antes de la administración intratecal. En esos casos, un volumen adecuado de dosis única puede ser, por ejemplo, más de aproximadamente 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml o 10 ml.

Se pueden usar otros varios dispositivos para realizar la administración intratecal de una composición terapéutica. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de la expresión del gen *FXYD2* se pueden administrar utilizando un reservorio de Ommaya que es de uso común para administrar por vía intratecal medicamentos para la carcinomatosis meníngea (Lancet 2: 983 - 84, 1963). Más concretamente, en este método se inserta un tubo ventricular a través de un orificio formado en el asta anterior y se conecta a un reservorio Ommaya instalado debajo del cuero cabelludo, y el reservorio se punza subcutáneamente para administrar por vía intratecal la enzima particular que se reemplaza, que se inyecta en el reservorio. Otros dispositivos para la administración intratecal de composiciones terapéuticas a un individuo se describen en la patente de EE.UU. No. 6.217.552. Alternativamente, el fármaco puede administrarse por vía intratecal, por ejemplo, mediante una sola inyección, o por infusión continua. Se ha de entender que el tratamiento de dosificación puede ser en forma de una administración de dosis única o dosis múltiples.

Para inyección, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular en soluciones líquidas. Además, la expresión del inhibidor del gen de *FXYD2* puede formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. También se incluyen formas liofilizadas. La inyección puede ser, por ejemplo, en forma de inyección en bolo o de una infusión continua (por ejemplo, utilizando bombas de infusión) de la enzima.

En un tercer aspecto, la invención describe una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la expresión génica de *FXYD2* para uso en un método para tratar el dolor neuropático en un paciente que lo necesite.

Se entenderá que el uso diario total del inhibidor de la invención o la composición farmacéutica que lo comprende será decidido por el médico asistente dentro del alcance del criterio médico acertado. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz, específico para cualquier paciente en particular, dependerá de una diversidad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del inhibidor específico empleado; la composición farmacéutica específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del inhibidor específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o al mismo tiempo que el inhibidor específico empleado; y como factores similares bien conocidos en el campo médico. Por ejemplo, está dentro de la experiencia de la técnica iniciar dosis del inhibidor a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se haya conseguido el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria del inhibidor puede variar en un amplio margen de 0,01 a 1.000 mg por adulto y por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del agente para el ajuste sintomático de la dosis al sujeto a tratar. Un medicamento contiene típicamente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Generalmente, una cantidad efectiva del ingrediente activo se suministra a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

La invención se ilustrará con más detalle mediante las figuras y ejemplos que siguen. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras

Figura 1: Comparación de la hipersensibilidad mecánica entre ratones WT y *Fxyd2* KO en el modelo SNI de dolor neuropático. La prueba de Von Frey en ratones WT y *Fxyd2* KO de 8 a 10 semanas de edad se realizó 2 días antes de la operación de SNI y varias veces después de la cirugía. Se incluyeron seis animales en cada grupo. Cuatro días después de la cirugía, los animales desarrollaron una clara hipersensibilidad mecánica que se mantuvo hasta 28 días después de la SNI, no se produjeron cambios significativos en ratones de tipo silvestre (WT). En los ratones mutantes *Fxyd2* nullos (KO), el umbral de extracción mecánica aumentó drásticamente entre los días 4 y 28 después de la SNI.

Figura 2: Efecto de la inyección intratecal de ARNsi de *Fxyd2* en un modelo experimental de dolor neuropático en ratas. El umbral nociceptivo de base se evaluó en ratas de 4 a 5 semanas con la prueba de vocalización de presión en la pata (prueba de Randall-Stillletto) un día antes y el día de la operación de SNI y repetidamente después de la cirugía. Se analizaron dos grupos de 6 ratas: ARNsi de control de SNI y ARNsi de *Fxyd2* de SNI. Después del establecimiento

del umbral nociceptivo reducido (días 5 a 8), se inyectaron intratecalmente Fxyd2 o ARNsi de control en los días indicados (flechas). En el día 16, se observó un aumento drástico en el umbral nociceptivo a 165 g en animales ARNsi SNI-Fxyd2, momento en el cual los niveles de animales ARNsi-control SNI eran 90,0 g.

Figura 3: Expresión restringida conservada de FXYD2 en DRGs humanos.

5 (A) Análisis RT-qPCR de la expresión de *FXYD2* en fibroblastos humanos y muestras de DRGs humanos que revelan la detección específica de *FXYD2* en los DRG (n = 3 replicados).

10 (B) Inmunohistoquímica en cortes transversales de DRG lumbar humano utilizando un anticuerpo anti-FXYD2. FXYD2 se detecta en subpoblaciones de neuronas sensoriales de diámetros pequeño (flechas negras) y mediano (puntas de flechas negras). Las dos flechas y las dos puntas de flecha (en el centro) apuntan a neuronas FXYD2- negativas de diámetro pequeño y grande, respectivamente.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

Animales y cirugía

15 Todos los experimentos fueron aprobados por la Direction Départementale des Services Vétérinaires de l'Hérault (Certificado de Experimentación con Animales n° 34-376, 17 de febrero de 2009) y las directrices de la International Association for the Study of Pain (Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP).

20 Ratonos C57BL/6 macho de ocho a diez semanas de edad (Charles River, Francia) o ratones *nulos Fxyd2* (Jones et al., 2005) se albergaron con un ciclo de luz/oscuridad 12/12 y acceso *ad libitum* al agua y a los alimentos (n = 6 en cada grupo). Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho (Janvier), que pesaban 200 a 250 g (4 a 5 semanas de edad) al comienzo de los experimentos.

25 Los animales se anestesiaron profundamente con ketamina-xilasina (respectivamente 100 mg/kg y 10 mg/kg) y se realizó una cirugía de lesión nerviosa (SNI) unilateral (Decosterd y Woolf, 2000). Brevemente, el miembro posterior izquierdo se inmovilizó en una posición lateral y se elevó ligeramente. Se hizo una incisión en la piel a mitad del muslo utilizando el fémur como punto de referencia, y se separaron las capas musculares para extraer el nervio ciático y sus tres ramas (nervios sural, peroneo común y tibial). Tanto los nervios tibial como peroneo común se ligaron estrechamente con un hilo de seda 6.0 (Ethicon, Johnson and Johnson Intl, Bruselas, Bélgica), se seccionaron juntos y se extrajo una sección de 1 - 2 mm de los dos nervios. La rama sural se preservó cuidadosamente evitando cualquier estiramiento del nervio o cualquier contacto con instrumentos quirúrgicos. La capa muscular se cerró mediante una aposición cuidadosa y se suturó la piel con hilos de Vicryl 4.0. Finalmente se realizó una inyección subcutánea de NaCl al 0,9% (10 ml/kg) para prevenir la deshidratación.

Pruebas de comportamiento en ratones

35 La sensibilidad mecánica se evaluó poniendo a los animales en una rejilla de malla de alambre elevada y estimulando la pata trasera con pelos de Von Frey mediante el uso del paradigma arriba-abajo (Chaplan et al, 1994). La pata trasera izquierda se probó dos veces en intervalos de 30 minutos.

40 El programa del experimento fue como sigue. Después de probar la sensibilidad mecánica de base en dos ocasiones separadas por al menos 24 h, los ratones fueron sometidos a cirugía (modelo SNI). Se ha de observar que, como este modelo libró el territorio sural, los estímulos de von Frey se dirigieron a la cara lateral de la pata trasera durante las medidas de línea base y postoperatorias. Los ratones se ensayaron después para determinar la sensibilidad mecánica en los días 4, 7, 14 y 28 postoperatorios.

Inyección intratecal de ARNsi en ratas

45 Se adquirió un ARNsi "ON-TARGET plus" dirigido contra el ARNm de *Fxyd2* de rata (ref. TMOSLR-005187), de la firma Thermo Scientific. La secuencia fue la siguiente: secuencia de sentido 5'-AAUCCCUUCGAGUAUGAUUU-3' (SEC ID NO: 1). Se usó como control negativo el ARNsi n° 2 de siGENOME no direccionador (Ref. D-001210-02-20 Thermo Scientific).

50 Las ratas fueron inyectadas diariamente por vía intratecal bajo una breve anestesia con isoflurano con 2 µg de Fxyd2 o ARNsi de control en el reactivo de transfección Exgen (Euromedex ref. ET0250) en un volumen de 20 µl. La mezcla de transfección se preparó como sigue: Se mezclaron 10 µl de solución de ARNsi que contenía 50 µg con 240 µl de solución de glucosa en agua al 5%. El reactivo de transfección Exgen500 (9 µl) se añadió por separado a 241 µl de solución de glucosa y se mezcló. Después de reunir las 2 soluciones, se mezclaron con vórtex y se dejaron durante 10' a temperatura ambiente antes de las inyecciones intratecales.

Pruebas de comportamiento en ratas

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho (Janvier), con un peso de 200 a 250 g (4 a 5 semanas de edad) al comienzo de los experimentos. Se albergaron tres por cada jaula en condiciones estándar de luz y temperatura, durante al menos una semana antes y a lo largo de todo el período experimental. Las bolitas de comida comercial y el agua corriente estaban disponibles *ad libitum*. Los animales se aclimataron a la unidad de cuidados de animales durante una semana. Durante los siete días anteriores al experimento, las ratas se pesaron diariamente y se colocaron en la sala de pruebas durante una hora. La hiperalgesia mecánica (respuesta dolorosa a estímulos táctiles que son normalmente inocuos) se evaluó el día anterior y el día de la cirugía (D-1 y D0) y en cada día del experimento. Los umbrales nociceptivos se midieron usando la prueba de presión de la pata de Randall-Siletto como se describió anteriormente en Kayser V et al. (1990). Brevemente, se aplicó una presión incremental a la pata trasera por medio de un calibrador automático (Ugo Basile) y se estimó el umbral nociceptivo por el tiempo de vocalización, después de lo cual se detuvo la presión y se anotó el umbral (peso en gramos). Se utilizó un valor límite de 600 g para evitar causar molestias indebidas.

Resultados

Los ratones que carecen de la función del gen *Fxyd2* no logran mantener el comportamiento del dolor en el modelo experimental SNI de dolor neuropático. Para probar el papel de *Fxyd2* en el dolor neuropático, ratones de tipo silvestre (WT) de 8-10 semanas de edad y ratones que llevan una mutación *nula* en el gen *Fxyd2* (Jones et al, 1995) fueron sometidos a una lesión nerviosa de repuesto (SNI: Spared Nerve Injury) unilateral (Decosterd y Wood, 2000). La sensibilidad mecánica se evaluó colocando a los animales en una rejilla de malla de alambre elevada y estimulando la pata trasera con pelos de Von Frey usando el paradigma arriba-abajo (Chaplan et al, 1994). Se realizó la prueba de Von Frey en ratones mutantes WT y *Fxyd2 nulos*, 2 días antes de la operación SNI y a los 4, 7, 14 y 28 días después de la cirugía (Figura 1). Al cabo de cuatro días de la cirugía, ambos grupos de animales habían desarrollado una clara hipersensibilidad mecánica. Desde el día 4 hasta el día 28 después del SNI, los ratones WT mantuvieron su hipersensibilidad a los estímulos mecánicos como era de esperar. Sin embargo, en ratones mutantes *Fxyd2 nulos*, el umbral de retirada mecánica aumentó drásticamente entre los días 7 y 28 posteriores a la cirugía. Se pueden sacar tres conclusiones de estos resultados. En primer lugar, el umbral nociceptivo en ratones mutantes *Fxyd2* vírgenes es similar al de tipo silvestre, lo que sugiere que *Fxyd2* no desempeña ningún papel en las respuestas de dolor agudo normal. En segundo lugar, la mutación *Fxyd2* no afecta al establecimiento ni a la gravedad del estado hiperalgésico inducido por la SNI. En tercer lugar, la función *Fxyd2* parece ser necesaria para mantener la hipersensibilidad de las neuronas lesionadas en este modelo de dolor neuropático.

La inyección intratecal de ARNsi que se dirige al ARNm de *Fxyd2* en ratas reduce el comportamiento del dolor en un modelo experimental de dolor neuropático. Dado que los resultados del análisis de ratones mutantes *Fxyd2 nulos* podrían explicarse por los defectos somatosensoriales que surgieron durante el desarrollo, los autores de la presente invención han realizado una desactivación aguda de la función del gen *Fxyd2* con un ARNsi de *Fxyd2* específico combinado con el modelo SNI de dolor neuropático. Para estos experimentos utilizaron ratas, ya que se ha publicado un ARNsi que demuestra ser eficaz contra el ARNm de *Fxyd2* de rata (Wetzel et al, 2004). Se analizaron dos grupos de 6 ratas Sprague Dawley macho adultas: i) cirugía; ARNsi control y ii) cirugía; ARNsi *Fxyd2*. La prueba de sensibilidad mecánica de Randall-Stillitto se utilizó para calcular los umbrales nociceptivos. Como se muestra en la Figura 2, desde el día 5 hasta el día 8 después del SNI los umbrales nociceptivos reducidos en animales operados demostraron una hipersensibilidad mecánica crónica (de 247,5 g a 127,5 g). Posteriormente, *Fxyd2* o ARNsi testigo (2 µg) se inyectaron por vía intratecal en los días 11, 12 y 13 posteriores a la cirugía. En el día 14, los animales inyectados con ARNsi de *Fxyd2* acusaron un aumento marcado de hasta 145 g en el umbral nociceptivo, mientras que en los controles los umbrales disminuyeron aún más a 102,5 g. El día 14, se inyectó 1 µg de ARNsi y causó un aumento del umbral nociceptivo a 152,5 g en animales inyectados con ARNsi de *Fxyd2*, en comparación con 92,5 g para el control. La inyección de 1,6 µg de ARNsi de *Fxyd2* en el día 15 condujo a un mayor aumento en el umbral nociceptivo a 165 g en el día 16, momento en el cual los niveles de control fueron 90,0 g.

Estos resultados indican que la administración intratecal aguda de ARNsi de *Fxyd2* a ratas en un modelo experimental de dolor neuropático causó una reducción drástica del comportamiento del dolor, lo que sugiere que *Fxyd2* desempeña un papel en el mantenimiento de la hiperalgesia en este modelo.

Ejemplo 2

Materiales y métodos

qPCR en tiempo real

Se sometió a transcripción inversa 1 µg de ARN total de DRG humanos (Clontech, número de lote 1105216A) o de fibroblastos humanos (proporcionados por el Dr. C. Angebault-Prouteau), con 100 U de transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) y 5 µM de cebadores hexámeros aleatorios (Boehringer Mannheim), 0,5 mM de cada dNTP (Pharmacia), 10 mM de ditioneitol y 20 U de inhibidor de la ARNasa recombinante (Promega) durante 1 hora a 37 °C, y luego se almacenó a -80 °C hasta su uso. La PCR en tiempo real se llevó a cabo como se describió anteriormente (Elzière et al, 2014) utilizando la detección de colorante SYBR Green I en el sistema LightCycler (Roche Molecular Biochemichals). Las reacciones de PCR se realizaron en placas de 96 pocillos en un volumen de 10 µl que contenía 3 µl de producto de RT (dilución final 1/30), 0,5 µM de cebadores directos e inversos y 2 µl de la mezcla maestra QuantiTect SYBR Green PCR (Roche Diagnosis). Los productos amplificados se secuenciaron al menos una vez

(Beckman Coulter Genomics, Reino Unido). Las cantidades relativas de ADNc amplificados específicamente se calcularon utilizando el método delta-CT (Hoebeek et al, 2005; Vandesompele et al, 2002) en tres repeticiones experimentales independientes y se normalizaron dividiendo con un factor de normalización apropiado. Este factor fue *Beta actina* (ACTB) (Genbank: NM 001101.3); los cebadores *FXVD2* humanos (GenBank: NM_001680) se adquirieron de Clinisciences (HP205498).

Inmunohistoquímica

La tinción inmunofluorescente se realizó como se describió anteriormente (Ventéo et al, 2012). Los DRG lumbares humanos se recolectaron a través de la "Coordination Hospitalière de Prélèvement et Agence de Biomédecine" y se cosecharon de acuerdo con las directrices de la Agencia Biomédica Francesa, de dos pacientes adultos con muerte cerebral que eran donantes de órganos, como se informó anteriormente (Bauchet et al., 2013). La inmunohistoquímica se realizó utilizando un anticuerpo anti-FXVD2 de ratón (Abnova, H00000486-M01) y el kit Vectastain ABC (Vector).

Resultados

Los inventores evaluaron si la expresión de FXVD2 se conservaba en DRG humanos. En primer lugar, mediante análisis de RT-qPCR en muestras de ADNc humano preparadas a partir de fibroblastos o DRG lumbares, los inventores descubrieron que *FXVD2* estaba presente en niveles altos específicamente en los DRG (Figura 3A). Además, realizando inmunohistoquímica en secciones de DRG lumbar humano, los inventores encontraron que FXVD2 se detectó sorprendentemente en subpoblaciones de neuronas sensoriales de diámetros pequeño y medio que representan aproximadamente el 45% de la población neuronal de DRG completa (Figura 3B). Por tanto, estos resultados indican que la expresión de FXVD2 en los subtipos de neuronas sensoriales primarias se ha conservado evolutivamente.

Referencias

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

Bauchet L, Lonjon N, Vachieri-Lahaye F, Boullaran A, Privat A, Hugnot JP. 2013. Isolation and culture of precursor cells from the adult human spinal cord. *Methods Mol Biol* 1059: 87-93.

Chaplan S, Bach F, Pogrel J, Chung J, Yaksh T. (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63.

Decosterd I, Woolf CJ. (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87(2): 149-58.

Elziere L, Sar C, Venteo S, Bourane S, Puech S, Sonrier C, Boukhadaoui H, Fichard A, Pattyn A, Valmier J, Carroll P, Mechaly I. 2014. CaMKK-CaMKII α , a new post-traumatic signalling pathway induced in mouse somatosensory neurons. *PLoS One* 9: e97736.

Gegelashvili et al (2007). Glutamate transporter GLAST/EAAT1 directs cell surface expression of FXVD2/gamma subunit of Na,K-ATPase in human fetal astrocytes. *Neurochemistry International* 50; 916-920.

Hoebeek J, van der Luijt R, Poppe B, De Smet E, Yigit N, Claes K, Zewald R, de Jong GJ, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. 2005. Rapid detection of VHL exon deletions using real-time quantitative PCR. *Lab Invest* 85: 24-33.

Jones D H, Li T Y, Arystarkhova E, Barr K J, Wetzel R K, Peng J, Marham K, Sweadner K J, Fong G-H, Kidder G M. (2005) Na,K-ATPase from mice lacking the γ subunit (FXVD2) exhibits altered Na affinity and decreased thermal stability. *J Biol Chem* 280: 19003-19011.

Kayser V, Basbaum AI, Guilbaud G. (1990) Deafferentation in the rat increases mechanical nociceptive threshold in the innervated limbs. *Brain Res* 508: 329-32.

Vandesompele J, Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.

Ventéo S, Bourane S, Méchaly I, Sar C, Samad O, Puech S, Bolstein R, Valmier J, Pattyn A, Carroll P. (2012) Regulation of the Na,K-ATPase gamma-subunit FXVD2 by Runx1 and ret signalling in normal and injured non-peptidergic nociceptive sensory neurons. *PlosOne* 7(1): e29852.

Wetzel R, Pascoa J, Arystarkhova E. (2004) Stress-induced expression of the γ subunit (FXVD2) modulates Na,K-ATPase activity and cell growth. *J Biol Chem* 279: 41750- 41757.

Listado de secuencias

<110> INSERM

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR NEUROPÁTICO

5

<130> BIO14109 - CARROLL-VENTEO/AS

<160> 3

10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> ARN

15

<213> Artificial

<220>

<223> ARNsi dirigido contra la rata Fxyd2 mRNA

20

<400> 1

aaucuuucg agaugauuu 20

<210> 2

<211> 21

<212> ARN

25

<213> Artificial

<220>

<223> ARNsi FXYD2 humano

30

<400> 2

uaagaagcgc aggcaauca a 21

<210> 3

<211> 19

<212> ARN

35

<213> Artificial

<220>

<223> ARNsi FXYD2 humano

40

<400> 3

gauuugccug cgcuucua 19

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la expresión génica de FXYD2 para uso en un método para el tratamiento del dolor neuropático en un paciente en necesidad del mismo, en donde dicho inhibidor se selecciona del grupo que consiste en ARNsi, ARNsh, oligonucleótidos antisentido o ribozimas.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la expresión génica de FXYD2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición farmacéutica se formula para una administración directa en el sistema nervioso periférico de un paciente, en donde dicho inhibidor se selecciona entre el grupo que consiste en ARNsi, ARNsh, oligonucleótidos antisentido o ribozimas.
- 10 3. La composición farmacéutica según la reivindicación 2, en donde dicha composición farmacéutica se formula para administración intratecal.
4. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la expresión génica de FXYD2 para uso en un método para el tratamiento del dolor neuropático en un paciente en necesidad del mismo, en donde dicho inhibidor se elige entre el grupo que consiste en ARNsi, ARNsh, oligonucleótidos antisentido o ribozimas.
- 15 5. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 4, en donde el dolor neuropático es dolor neuropático periférico.
- 20 6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 4 o 5, en donde el paciente que la necesita padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria aguda y crónica; polineuropatía alcohólica; polineuropatía inducida por quimioterapia; síndrome de dolor regional complejo; neuropatías por atrapamiento (por ejemplo, síndrome del túnel carpiano); neuropatía sensorial por HfV: neuralgias iatrogénicas (p. ej. dolor post-mastectomía o dolor post-toracotomía); neuropatía sensorial idiopática; compresión nerviosa o infiltración por tumor; neuropatías relacionadas con la deficiencia nutricional; neuropatía diabética dolorosa; dolor de miembro fantasma; neuralgia postherpética; plexopatía post-radiación; radiculopatía (cervical, torácica o lumbosacra); neuropatías relacionadas con la exposición a un tóxico; tic doloroso (neuralgia del trigémino); y/o neuralgias post-traumáticas.

25

Umbral de retirada mecánica

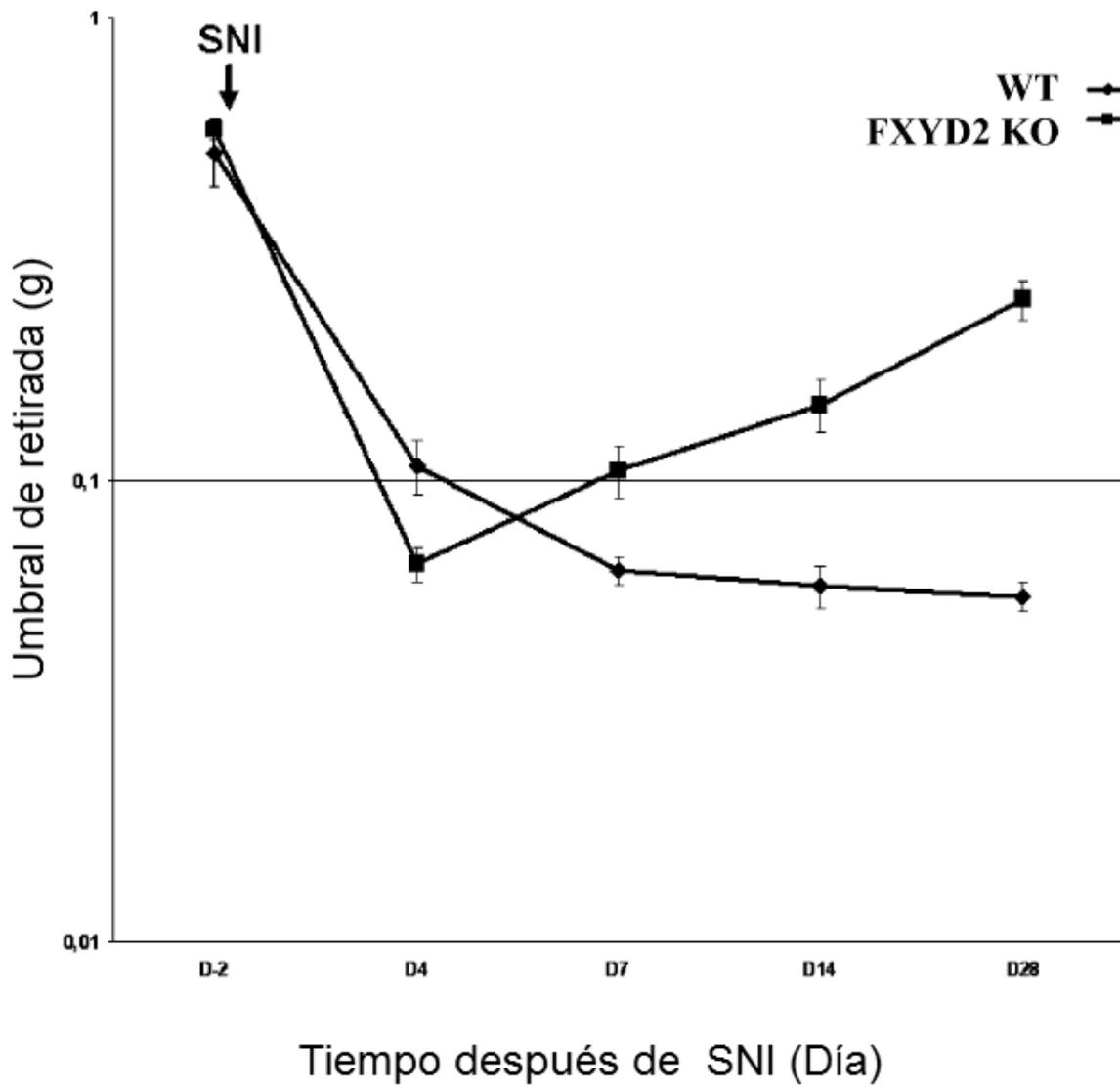


Figura 1

Umbral de respuesta nociceptiva

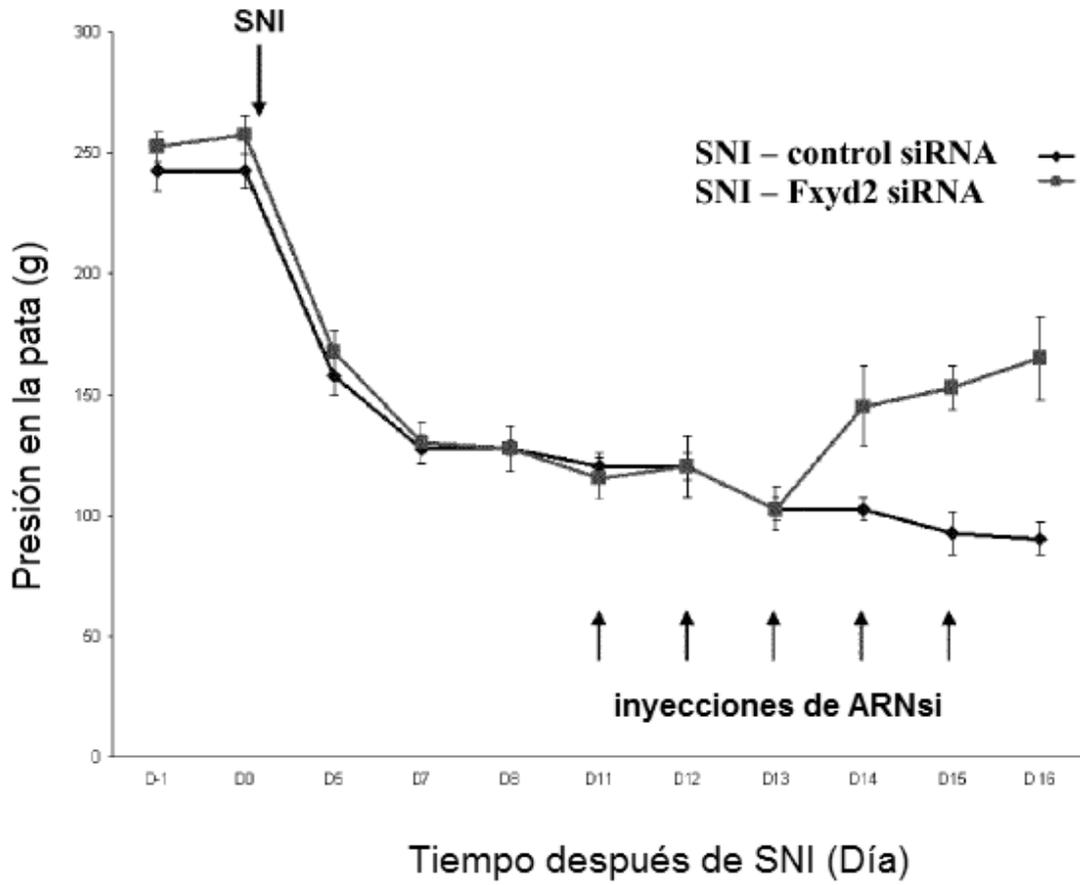


Figura 2

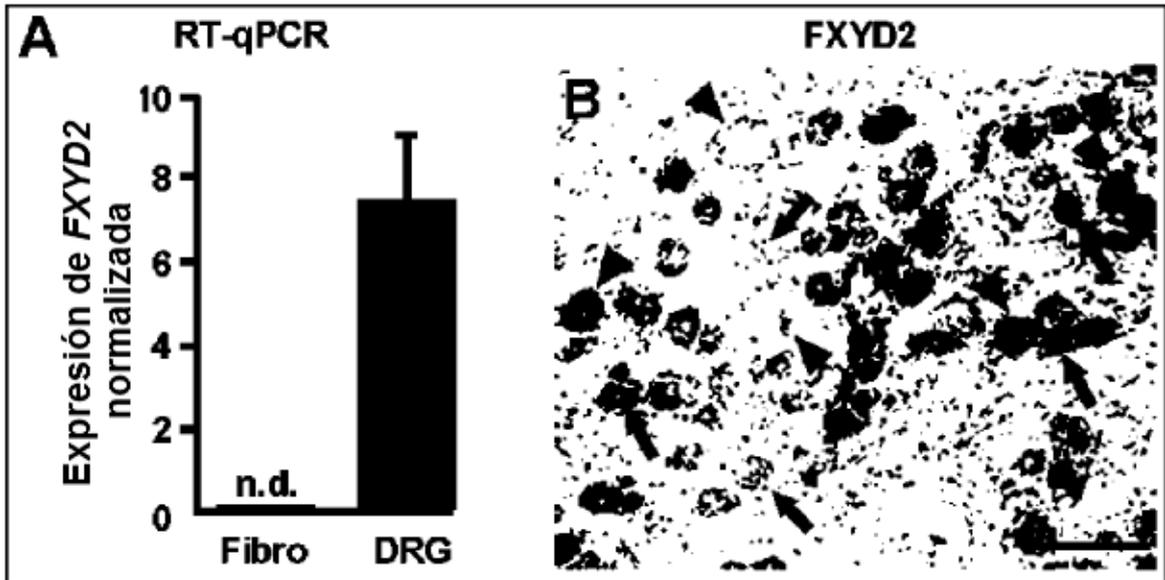


Figura 3