

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 851**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 33/06 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2013 PCT/US2013/040426**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13170086**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2013 E 13787024 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2846839**

54 Título: **Formulaciones para el suministro de principios activos**

30 Prioridad:

10.05.2012 US 201261645475 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2019

73 Titular/es:

**ADYNXX, INC. (100.0%)
100 Pine Street No. 500
San Francisco, CA 94111, US**

72 Inventor/es:

**MAMET, JULIEN;
HARRIS, SCOTT;
MILJANICH, GEORGE;
ORR, RICK;
SCHMIDT, WILLIAM K.;
YAKSH, TONY y
YEOMANS, DAVID C.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 724 851 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

Formulaciones para el suministro de principios activos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al suministro *in vivo* de formulaciones de principios activos. Más particularmente, la presente invención se refiere a formulaciones de principios activos que comprenden adicionalmente una cantidad estabilizante *in vivo* de un agente, los métodos para fabricar dichas formulaciones, y métodos de utilización de las mismas.

Antecedentes de la invención

Los principios activos, tales como fármacos que contienen péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, o moléculas orgánicas pequeñas, pueden producir efectos no deseados al administrarlos *in vivo*, tal como a un mamífero (por ejemplo, un ser humano). Dichos efectos pueden restar significativamente el beneficio terapéutico ofrecido por el propio principio activo. En consecuencia, existe la necesidad de formulaciones de principios activos que minimicen los efectos no deseados de la administración *in vivo*. El documento US8093225 desvela el uso de oligonucleótidos en el tratamiento del dolor.

Sumario de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los niveles homeostáticos de ciertos agentes son importantes con respecto a los efectos adversos de una entidad terapéutica, por ejemplo, un principio activo de una entidad terapéutica. En consecuencia, se desvelan en el presente documento composiciones o formulaciones capaces de inhibir o reducir los efectos adversos de una entidad terapéutica. Además, se desvelan en el presente documento métodos de utilización de la composición o formulaciones para tratamientos terapéuticos.

En una realización, la presente invención proporciona una composición de acuerdo con la reivindicación 1.

Se desvela en el presente documento un método de reducción de un efecto adverso de un principio activo que comprende la administración de un principio activo con una cantidad estabilizante *in vivo* de un agente, en el que el agente se asocia al efecto adverso del principio activo causado por la administración del principio activo sin el agente, y en el que la cantidad estabilizante *in vivo* es la cantidad que sustancialmente satura los sitios de unión del principio activo al agente.

Se desvela en el presente documento un método para el tratamiento o manejo del dolor en un sujeto que comprende la administración al sujeto de la composición farmacéutica como se describe en el presente documento, en la que el principio activo es un oligonucleótido señuelo que comprende uno o más sitios de unión para el EGR1 y en la que el agente es un ion de calcio.

Breve descripción de las Figuras

FIGURA 1: valores de respuesta clínica de las formulaciones de oligonucleótido. FIGURA 1A: se calculó el valor de la respuesta clínica de cada formulación ensayada como la suma total de signos clínicos y representados en un gráfico de barras (valor potencial máximo = 13, valor potencial mínimo = 0). Las FIGURAS 1B y 1C presentan gráficos visuales de la actuación de las formulaciones de "solución salina + oligonucleótido" y "1:0,0146 oligonucleótido:calcio", respectivamente. Cada barra o superficie marrón del gráfico marca el % de existencia de un signo clínico determinado. Peso molecular del oligonucleótido = 14092,92 g/mol, peso molecular de CaCl_2 = 147,02 g/mol, cadena sencilla = cadena antisentido del oligonucleótido de cadena doble, los oligonucleótidos se inyectaron a 100 mg/ml, N = 2-6 ratas por formulación, ensayo T, diferente de la inyección de solución salina: $p < 0,05$.

FIGURA 2: análisis de una relación de unión oligonucleótido-calcio. Se incubó el oligonucleótido (0,05 mM a 3 mM) en presencia de distintas concentraciones de CaCl_2 (0,14 a 25 mM). A continuación de la incubación del CaCl_2 y el oligonucleótido, se midió la cantidad de calcio libre que permanecía en la solución utilizando o-cresoftaleína, un colorante que se une al calcio libre (Kit de ensayo colorimétrico de calcio BioVision). La cantidad de calcio unido al oligonucleótido se calculó como la diferencia entre el calcio introducido inicialmente en la solución menos el calcio libre que permanecía después de la incubación (30-60 min). La relación de concentraciones de calcio añadido en la solución dividida por la concentración de oligonucleótido se graficó contra la concentración de calcio unido al oligonucleótido dividido por la concentración de oligonucleótido (círculos). La relación era lineal: $R^2 = 0,89$, pendiente = 0,61, que muestra que la mayoría del calcio estaba unido al oligonucleótido. Los mismos experimentos se llevaron a cabo en presencia de una alta fuerza iónica añadiendo NaCl con un exceso de 2 (triángulos) o 12 (cuadrados) veces la concentración de calcio, N = 1-4 por condición, se representa la media de los datos, peso molecular del oligonucleótido = 14092,92 g/mol, peso molecular de CaCl_2 = 147,02 g/mol.

FIGURA 3: Gráfico de barras que representa el calcio libre en las formulaciones de oligonucleótido. El oligonucleótido se incubó con CaCl_2 con una relación molar de $1,8 \pm 0,3$ hasta el límite de solubilidad del

oligonucleótido (13,5 mM). Se ensayaron tres formulaciones con las siguientes concentraciones de oligonucleótido:CaCl₂ (mM): 0,6:1,08, 7,8:14,04 y 13,5:24,3. Después de un periodo de incubación de 30 min, se aisló el calcio libre utilizando membranas de centrifuga de ultrafiltración (AMICON ULTRA 0,5ML 3KDA, Millipore) y se midió su concentración utilizando un electrodo de ion calcio (barra negra). Se llevó a cabo un experimento similar en condiciones con una fuerza iónica comparable al líquido cefalorraquídeo (LCR) (138 mM de NaCl, barras blancas). Las barras discontinuas representan el intervalo del nivel endógeno de concentración de calcio en el LCR (1-1,4 mM), N = 2 por condición, peso molecular del oligonucleótido = 14092,92 g/mol, peso molecular de CaCl₂ = 147,02 g/mol.

FIGURAS 4A y 4B: Estudios de afinidad y estabilidad del oligonucleótido en presencia de calcio. La FIGURA 4A es un gráfico de barras que ilustra la afinidad de unión del oligonucleótido con su diana, el factor de transcripción EGR1, según se midió utilizando un ensayo ELISA de competición. Se unió a la placa de ELISA un oligonucleótido (12 pmoles) en tándem de consenso EGR1 biotinilado y se incubó con extractos de proteína nuclear que contenía EGR1 en ausencia (barras blancas) o presencia (barras negras) de 100 pmoles de oligonucleótido competidor libre que incluía distintas relaciones molares en exceso de CaCl₂ (X = concentración de CaCl₂/concentración de oligonucleótido). FIGURA 4B: Se incubó oligonucleótido (4 mM) en ausencia o presencia de relaciones molares en exceso crecientes de CaCl₂ (X = concentración de CaCl₂/concentración de oligonucleótido) en suero inactivado (Suero de caballo, inactivado por calor, Invitrogen) a 37 °C durante 10 o 60 minutos. Se midió la cantidad de oligonucleótido intacto que permanecía a continuación de la incubación en el suero, que contenía nucleasas que degradan oligonucleótidos, utilizando un gel de electroforesis y un método de detección por UV. Los datos se normalizaron contra la cantidad inicial de oligonucleótido introducido inicialmente en la solución.

Las FIGURAS 5A y 5B muestran la eficacia de un oligonucleótido para evitar el dolor en el modelo de lesión de nervio preservado del dolor (Decosterd y Woolf, Pain 87:149-158 (2000)). Se inyectaron el vehículo (triángulo) o el oligonucleótido (círculo) por vía intratecal (percutánea, L5/6, 0,02 ml) una vez en el momento de la cirugía. Se midió el dolor como la hipersensibilidad mecánica utilizando filamentos de Von Frey (VF). Se llevaron a cabo cinco aplicaciones repetidas de cada uno de los siguientes pelos de VF en la garra ipsilateral a la lesión: 1-4-6-8-10 (dos veces)-26 gramos. FIGURA 5A: 1,4 mg de oligonucleótido sin calcio frente a vehículo; FIGURA 5B: 1,4 mg de oligonucleótido con CaCl₂ a una relación de peso de 1:0,0198 frente a vehículo y tamponado a pH 7,5 con Tris 10 mM. Se muestran los valores de las medianas ± percentiles 40 % y 60 % de las respuestas totales a las estimulaciones de VF repetitivas; N ≥ 4 por grupo, ensayo T seguido por un análisis T de Welsh, distribución de datos a lo largo del periodo de ensayo, diferente del vehículo; p < 0,01 en ambos estudios.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los niveles homeostáticos de ciertos agentes son importantes con respecto a los efectos adversos de una entidad terapéutica, por ejemplo, un principio activo de una entidad terapéutica. En consecuencia, se desvelan en el presente documento composiciones o formulaciones capaces de inhibir o reducir los efectos adversos de una entidad terapéutica. Además, se desvelan en el presente documento métodos de utilización de las composiciones o formulaciones para tratamientos terapéuticos.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1.

El agente es un ion de calcio.

El agente con respecto al líquido cefalorraquídeo es un ion de calcio. El agente con respecto a la sangre es Ca²⁺.

El ion de calcio utilizado en la composición del principio activo está en una cantidad estabilizante *in vivo*. La cantidad estabilizante *in vivo* del agente es una cantidad que satura sustancialmente los sitios de unión, por ejemplo, los sitios de unión disponibles del principio activo al agente. Por ejemplo, la cantidad estabilizante *in vivo* del agente puede ser una cantidad que sea capaz de unirse o unir al menos un 0,001 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, o 50 % de los sitios de unión, por ejemplo, los sitios de unión disponibles del principio activo al agente. Como se desvela en el presente documento, la cantidad estabilizante *in vivo* del agente es una cantidad que al administrarlo junto con el principio activo no afecta materialmente ni causa un cambio detectable del pH (por ejemplo, induce un cambio menor de aproximadamente 0,5 unidades de pH, 0,2 unidades de pH, 0,1 unidades de pH, etc.) del sitio local, tejido o entorno celular, etc.

Como se desvela en el presente documento, la cantidad estabilizante *in vivo* del agente puede ser la cantidad que al mezclarlo con el principio activo produzca menos de un nivel predeterminado del agente libre en la composición, por ejemplo, un nivel mínimo o indetectable de agente libre en la composición. Por ejemplo, el nivel predeterminado de agente libre en la composición puede ser al menos menor de 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, o 2 mM en una composición cuando el principio activo es un oligonucleótido señuelo y el agente es un ion, por ejemplo, de calcio. En otro ejemplo, el nivel predeterminado del agente libre en la composición es menor de aproximadamente un 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % del nivel endógeno, por ejemplo, la concentración local del agente. En otro ejemplo más, el nivel predeterminado del agente libre en la composición se determina basándose en el nivel de saturación de los sitios de unión del principio activo al agente.

Como se desvela en el presente documento, el agente libre es el agente que no se une al principio activo, por ejemplo, mediante interacciones electrostáticas, covalentes, o hidrófobas, o cualquier otro modo de interacción. De manera alternativa, el agente libre es el agente que es capaz de interferir o interfiere el nivel endógeno del agente, por ejemplo, sistémicamente o en el sitio local de administración.

5 Como se desvela en el presente documento, la cantidad estabilizante *in vivo* del agente puede ser la cantidad que proporciona una relación adecuada entre el principio activo y el agente de manera que cuando se administran *in vivo*, inhibe o disminuye uno o más de los efectos adversos del principio activo sin el agente o alternativamente no produce un cambio sustancial o detectable del nivel endógeno, por ejemplo, el nivel homeostático del agente. En algunas realizaciones, la relación molar o la relación de peso del principio activo respecto al agente varía desde aproximadamente 1:1000 a aproximadamente 1000:1. Ejemplos no limitantes de relaciones incluyen 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, y 2:1, y cualquier intervalo que se pueda derivar de este, incluyendo las fracciones de los números enteros (por ejemplo, 1,5, 1,05, etc.). El principio activo es un ácido nucleico (es decir, un oligonucleótido señuelo) que comprende la SEQ ID NO: 42, y el agente es un ion de calcio, y la relación de peso o la relación molar del principio activo y el agente puede ser desde aproximadamente 0,005 a 5, 0,05 a 5, 0,1 a 3, 0,2 a 2,8, 0,5 a 2, o 1 a 2. El ingrediente activo es un ácido nucleico (es decir, un oligonucleótido señuelo), y el agente es un ion calcio, y la relación de peso o la relación molar del principio activo y el agente puede ser desde aproximadamente 1 a 0,001, 1 a 0,005, 1 a 0,01, 1 a 0,015, 1 a 0,018, 1 a 0,019, 1 a 0,02, 1 a 0,025, 1 a 0,03, 1 a 0,035, 1 a 0,4, o 1 a 0,5. Por ejemplo, la relación de peso puede ser 1:1, 2:1, 4:1, 5:1, 15:1, 30:1, 50:1, 100:1, 200:1, 250:1, 300:1, 400:1, 500:1, o 1000:1. Un ion de calcio, puede estar comprendido en una composición tal como una sal (por ejemplo, CaCl_2), y la cantidad molar o cantidad de peso de esta composición se puede referenciar en una relación. En consecuencia, en algunas realizaciones, el agente es un ion de calcio comprendido en una composición tal como CaCl_2 , en la que la relación de peso de un principio activo, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido, un oligonucleótido señuelo) con respecto a la composición, por ejemplo CaCl_2 , es aproximadamente de 1:1, 2:1, 4:1, 25 5:1, 15:1, 30:1, 50:1, 100:1, 200:1, 250:1, 300:1, 400:1, o 500:1, o cualquier intervalo que se pueda derivar del mismo.

Se entiende que la relación exacta de principio activo respecto al agente en una composición puede variar, tal como basándose en la naturaleza química del principio activo (por ejemplo, en el contexto de un ácido nucleico, si el ácido nucleico es un ARN, ADN, de cadena sencilla o cadena doble, el porcentaje de contenido en GC, el peso molecular), el agente y su concentración local (por ejemplo, el nivel endógeno) en el sitio *in vivo* direccionado, y su vía de suministro pretendida. Por ejemplo, en un entorno con una concentración de calcio endógeno más alta, se anticipa que la relación de principio activo (por ejemplo, un oligonucleótido señuelo):calcio se debería aumentar en una composición que comprende dichos componentes.

35 En algunas otras realizaciones más, la cantidad estabilizante *in vivo* del agente es la cantidad que cuando se administra junto con el principio activo produce una cantidad de interacción mínima, insustancial, o indetectable, por ejemplo, de unión entre el agente endógeno y el ingrediente activo.

40 En general, el principio activo se utiliza normalmente en una cantidad suficiente para prevenir, curar, diagnosticar o tratar una enfermedad u otra afección, según el caso que se pueda dar. Como se utiliza en el presente documento, una "molécula orgánica pequeña" se refiere a un agente que contiene carbono que tiene un peso molecular de menos de o igual a 1500 g/mol, tal como menos de 1400, menos de 1300, menos de 1200, menos de 1100, menos de 1000, menos de 900, menos de 800, menos de 700, menos de 600, menos de 500, menos de 400, menos de 300, menos de 200, o menos de 100 g/mol.

45 El principio activo es un oligonucleótido señuelo, que comprende la SEQ ID NO: 42 tal como se describe en las Patentes de EE. UU. N.º 7.943.591 y 8.093.225. Un "oligonucleótido señuelo" se refiere a cualquier polímero que contiene un ácido nucleico de cadena doble de generalmente menos de 200 nucleótidos (o 100 pares de bases) y que incluye, pero no se limita a, ARN, ARN e híbridos ARN-ADN. El término engloba secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases de ARN y ADN conocidos que incluyen pero no se limitan a, 2,6-diaminopurina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, ácido oxiacético-5-uracilo, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, metiléster del ácido N-uracil-5-oxiacético, queosina, 2-tiocitosina, 5-bromouracilo, metilfosfonato, fosforoditioato, ormactal, 3'-tio-formactal, armazón nitróxido, sulfona, sulfamato, derivados de morfolino, derivados de ácido nucleico bloqueado (LNA), o derivados peptídicos de ácido nucleico (PNA).

50 En algunas realizaciones, el oligonucleótido señuelo está compuesto por dos oligonucleótidos de cadena sencilla complementarios que están hibridados juntos. En otras realizaciones, el oligonucleótido señuelo está compuesto por un oligonucleótido de cadenas sencilla que forma pares de bases intramoleculares para crear una estructura sustancialmente de cadena doble.

60 Como se desvela en el presente documento, el oligonucleótido señuelo comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, etc.) sitios de unión al factor de transcripción. En ejemplos relacionados, cada sitio de unión al factor de transcripción se une a un factor de transcripción seleccionado de entre el grupo que consiste en los factores de transcripción POU1F1, POU2F, POU3F, POU4F1, POU5F1, USF, EGR1, CREB/ATF, API, CEBP, SRF, ETS1, MEF2, SP1, RUNX, NFAT, ELK1, factores del complejo ternario, STAT, GATA1, ELF1, factor nuclear - granulocito/macrófago a, HNF1, ZFX3, IRF, TEAD1, TBP, NFY, factores de unión a caccoc-box, KLF4, KLF7, IKZF, MAF, REST, HSF, KCNIP3 y PPAR. En ciertos ejemplos, los sitios de unión al factor de transcripción se unen a uno o más miembros de

una familia de factores de transcripción estrechamente relacionados. Los miembros representativos de dichas familias de factores de transcripción se pueden seleccionar de entre el grupo que consiste en POU1F1, POU2F, POU3F, POU4F1, POU5F1, USF, EGR1, CREB/ATF, API, CEBP, SRF, ETS1, MEF2, SP1, RUNX, NFAT, ELK1, factores del complejo ternario, STAT, GATA1, ELF1, factores de unión a cacc-box, KLF4, KLF7, IKZF, MAF, REST, HSF, KCNIP3 y PPAR. Por lo tanto, en ciertos ejemplos, un oligonucleótido señuelo que se une, por ejemplo, a EGR1, también se puede unir a uno o más miembros adicionales de la familia, por ejemplo, EGR2, EGR3, EGR4.

En ciertos ejemplos, el oligonucleótido señuelo comprende dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.) sitios de unión al factor de transcripción. En ejemplos relacionados, cada sitio de unión al factor de transcripción se une a un factor de transcripción seleccionado de entre el grupo que consiste en POU1F1, POU2F, POU3F, POU4F1, POU5F1, USF, EGR1, CREB/ATF, API, CEBP, SRF, ETS1, MEF2, SP1, RUNX, NFAT, ELK1, factores del complejo ternario, STAT, GATA1, ELF1, factores de unión a cacc-box, KLF4, KLF7, IKZF, MAF, REST, HSF, KCNIP3 y PPAR. En ciertos ejemplos, la posición relativa de los dos o más sitios de unión al factor de transcripción en el señuelo modula (por ejemplo, aumenta o disminuye) la afinidad de unión entre un factor de transcripción diana (es decir, el factor de transcripción para el que se diseña un sitio de unión particular para que se una) y su sitio de unión al factor de transcripción, por ejemplo, en comparación con la afinidad de unión entre el factor de transcripción y un señuelo que tenga un único sitio de unión al factor de transcripción (por ejemplo, un sitio de unión de consenso) específico del factor de transcripción. Por lo tanto, la posición relativa de los dos sitios de unión al factor de transcripción en un oligonucleótido señuelo de la invención puede aumentar la afinidad del oligonucleótido señuelo por un factor de transcripción diana (por ejemplo, por uno o más de los factores de transcripción direccionados por el señuelo). En ciertas realizaciones, el aumento de afinidad del oligonucleótido señuelo por un factor de transcripción diana es de 1,2 veces o más (por ejemplo, aproximadamente 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0 veces, o más). En ciertos ejemplos, la posición relativa de los dos sitios de unión al factor de transcripción en un oligonucleótido señuelo promueve las interacciones proteína-proteína entre los factores de transcripción unidos a los sitios, por ejemplo, ejemplos de homodimerización o heterodimerización de los factores de transcripción. En ciertos ejemplos, dichas interacciones proteína-proteína entre los factores de transcripción estabilizan sus interacciones, por ejemplo, la unión, al oligonucleótido señuelo, aumentando de esta manera la afinidad de unión del oligonucleótido señuelo para uno o más factores de transcripción diana.

En ciertos ejemplos, los sitios de unión al factor de transcripción de un oligonucleótido señuelo se une cada uno al mismo factor de transcripción, por ejemplo, EGR1. En otros ejemplos, los sitios de unión al factor de transcripción de un oligonucleótido señuelo se unen a factores de transcripción diferentes, por ejemplo, diferentes miembros de una familia de factores de transcripción estrechamente relacionados (por ejemplo, diferentes miembros de la familia EGR1) o una combinación de factores de transcripción seleccionados de entre el grupo que consiste en POU1F1, POU2F, POU3F, POU4F1, POU5F1, USF, EGR1, CREB/ATF, API, CEBP, SRF, ETS1, MEF2, SP1, RUNX, NFAT, ELK1, factores del complejo ternario, STAT, GATA1, ELF1, factores de unión a cacc-box, KLF4, KLF7, IKZF, MAF, REST, HSF, KCNIP3 y PPAR.

En ciertos ejemplos, los sitios de unión al factor de transcripción de un oligonucleótido señuelo están separados entre ellos por una secuencia enlazadora. Las secuencias enlazadoras pueden ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más pares de bases de longitud. Normalmente, las secuencias enlazadoras tendrán de dos a cinco pares de bases de longitud. En otros ejemplos, los sitios de unión al factor de transcripción pueden estar inmediatamente adyacentes entre ellos (por ejemplo, no está presente una secuencia enlazadora) o se solapan. En casos en los que los sitios de unión al factor de transcripción se solapan, los sitios de unión al factor de transcripción pueden compartir 1, 2, 3, 4, 5, o más pares de bases. De manera alternativa, uno o ambos sitios de unión al factor de transcripción pueden carecer de pares de bases que de otra manera forman parte de una secuencia de unión de consenso para los factores de transcripción que se unen al sitio. En general, sin embargo, los pares de bases que son críticas para la interacción de unión entre el sitio de unión al factor de transcripción y los factores de transcripción que se unen al sitio (por ejemplo, pares de bases que son esencialmente invariables en una secuencia de unión de consenso por un factor de transcripción particular) no se comparten o se omiten cuando las secuencias de unión de transcripción están solapadas.

En ciertos ejemplos, el oligonucleótido señuelo comprende secuencias flanqueantes localizadas en cada extremo de la secuencia señuelo. Las secuencias flanqueantes pueden tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más pares de bases de longitud. En general, las secuencias flanqueantes tiene de dos a cinco pares de bases de longitud. En realizaciones preferidas, las secuencias flanqueantes 5' comienzan con un par de bases G/C y la secuencia flanqueante 3' terminan en un par de bases G/C. En ejemplos preferidos, las secuencias flanqueantes no forman parte de un sitio de unión al factor de transcripción o no interactúan con o se unen con factores de transcripción. En otros ejemplos, las secuencias flanqueantes forman interacciones débiles con los factores de transcripción unidos a un sitio de transcripción al factor de transcripción adyacente.

En ciertos ejemplos, el oligonucleótido señuelo tienen en general al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más pares de bases de longitud. En ejemplos relacionados, los oligonucleótidos señuelo tienen en general menos de 65, 60, 55, 55 o 45 pares de bases de longitud. En ejemplos preferidos, los oligonucleótidos señuelo tienen aproximadamente de 20 a 40 pares de bases de longitud. En otros ejemplos, los oligonucleótidos señuelo tienen aproximadamente de 20 a 35, de 25 a 40, o de 25 a 35 pares de bases de longitud.

El oligonucleótido señuelo comprende la secuencia que se muestra como SEQ ID NO:

Un oligonucleótido de cadena doble que tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 %) de identidad de secuencia con otra secuencia significa que, cuando se alinean, ese porcentaje determina el nivel de correspondencia de disposición de bases al comparar las dos secuencias, Este alineamiento y el porcentaje de homología o identidad se puede determinar utilizando cualquier programa de software adecuado conocido en la técnica que permita un alineamiento local, El programa de software debería ser capaz de encontrar regiones de identidad local entre dos secuencias sin la necesidad de incluir la longitud completa de las secuencias, En algunas realizaciones, dicho programa incluye, pero no se limita al algoritmo de alineamiento por parejas EMBOSS (disponible en el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI)), el programa ClustalW (también disponible en el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI)), o el programa BLAST (BLAST Manual, Altschul et al., Natl Cent, Biotechnol, Inf., Natl Lib, Med, (NCIB NLM NIH), Bethesda, Md., y Altschul et al., (1997) NAR 25:3389 3402),

Un experto en la técnica reconocerá que las secuencias englobadas en el presente documento incluyen las que se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia a modo de ejemplo (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-42, 45, y 47-53), Un ácido nucleico se puede hibridar a otro ácido nucleico cuando una forma de cadena sencilla del ácido nucleico puede hibridarse con el otro ácido nucleico de cadena sencilla en las condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica de la solución. Las condiciones de hibridación se conocen bien en la técnica. En algunas realizaciones, la hibridación puede producirse a lo largo de una lenta disminución de temperatura desde una temperatura desnaturalizante (por ejemplo, 100 °C) hasta la temperatura ambiente en un disolvente que contiene una sal (por ejemplo, un tampón Tris-EDTA).

Los oligonucleótidos señuelo desvelados en el presente documento se pueden modificar químicamente por métodos bien conocidos por el experto (por ejemplo, la incorporación de enlaces fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforoamidatos, carbonato, tioéter, siloxano, acetamidato o carboximetiléster entre los nucleótidos) para evitar la degradación por las nucleasas en las células y fluidos extracelulares (por ejemplo, suero, líquido cefalorraquídeo). También, se pueden diseñar oligonucleótidos señuelo que formen estructuras horquilladas y protuberancias que eviten también o dificulten la degradación por nucleasa. Adicionalmente, los oligonucleótidos señuelo también se pueden insertar como parte de un plásmido más grande capaz del mantenimiento episómico o replicación constitutiva en la célula diana con el fin de proporcionar un aumento de la exposición intracelular durante más tiempo a la secuencia señuelo o reducir su degradación. En consecuencia, cualquier modificación química o alteración estructural conocida en la técnica para aumentar la estabilidad del oligonucleótido está en el alcance de la presente divulgación. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos señuelo desvelados en el presente documento se pueden unir, por ejemplo, a polímeros de polietilenglicol, péptidos (por ejemplo, un dominio de translocación proteico) o proteínas que mejoren el efecto terapéutico de los oligonucleótidos señuelo. Dichos oligonucleótidos señuelos pueden preferentemente atravesar la membrana celular.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos señuelo se proporcionan como sales, hidratos, solvatos, o derivados N-óxido. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos señuelo se proporcionan en solución (por ejemplo, una solución salina que tenga un pH fisiológico) o en forma liofilizada. En otras realizaciones, los oligonucleótidos señuelo se proporcionan en liposomas.

Se desvelan en el presente documento oligonucleótidos señuelo que incluyen las secuencias presentadas en la Tabla A. En general, el oligonucleótido señuelo se genera hibridando la secuencia proporcionada en la tabla con una secuencia complementaria. Para generar un oligonucleótido de doble cadena sin coincidencia, la secuencia proporcionada en la tabla se puede hibridar con una secuencia que sea complementaria solo parcialmente. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 43 se puede hibridar con la SEQ ID NO: 46 para producir la secuencia no coincidente, SEQ ID NO: 43/46.

50 Tabla A

Secuencias de oligonucleótidos (5'-3')	SEQ ID NO.
GGCTTATGCAAATTCGAATGCAAATTTGTCTG	SEQ ID NO.: 1
CTAAGCCACGTGACCATTGGCCAGGTGACCAGATC	SEQ ID NO.: 2
GTTATGCGTGGGCGATAATGCGGGGGCGTTATAG	SEQ ID NO.: 3
GCCTCCCTGAGCTCATTGACGTATCTCGG	SEQ ID NO.: 4

ES 2 724 851 T3

(continuación)

Secuencias de oligonucleótidos (5'-3')	SEQ ID NO.
CGAATATGACTGAGAATGACTCAGATTTGC	SEQ ID NO.: 5
GGTTCTATGATTTTGAATCGGATTGTGCAAAGAAGC	SEQ ID NO.: 6
GCTTCAGGATGTCCATATTAGGAGATCTTGTTTCG	SEQ ID NO.: 7
GGCCACAGGATGTAGGATGTCCATATTAGGATGC	SEQ ID NO.: 8
GTTCTCTAAAAATAAAAGGCTAAAAATAAAAGTCG	SEQ ID NO.: 9
ATTAGGGCGGGGTCCGGGGCGGGGTATTA	SEQ ID NO.: 10
GTTATGGCGGGGCGGGGCGGGGCCGGGCGTTTAC	SEQ ID NO.: 11
GGCAATGTGGTTTTAGTGTGGTTTTACGG	SEQ ID NO.: 12
GCCGTTTGGGGTCATAGAACCACAGGAACCACACGG	SEQ ID NO.: 13
CATTGCCCGGAAATGGACCGGATGTAATTTCC	SEQ ID NO.: 14
GTTCTTGAAAATAAATGAAAATAGTGGAAAATAAG TCG	SEQ ID NO.: 15
CGTTCCCACTTCTGCGACCACTTCTGCCGGG	SEQ ID NO.: 16
CTGCACCTATAAATGGCCTATAAATGGGGATGC	SEQ ID NO.: 17
GCTTATTTGCGGAAGGTTTCCCGGAAGTGGCG	SEQ ID NO.: 18
GCTGTGCCTTATCTCTTTGGGATAACTGGCG	SEQ ID NO.: 19
GCTTAATGAATAAGAGGAAAAATGCATGCTGG	SEQ ID NO.: 20
GTTCTGAGATTGCACGATGAGATTTACAGTCG	SEQ ID NO.: 21
GTCCCGCATAAATAATGGCATCCTTAATCGCG	SEQ ID NO.: 22
GTGCAGGCAAGAGTAGAGACAGGCAAGAGTAGATGC	SEQ ID NO.: 23
CCGCCAATAATTAATTATTAAGGCC	SEQ ID NO.: 24
GCTTCGTTCCATTTCCGGTCTCGGTTTCCCATTC	SEQ ID NO.: 25
GCTGCTGTGGAATATCGACCTGTGGAATATCGTG	SEQ ID NO.: 26
GCCGTATAAATGTGCTATAAAAGTTTTAAGACCGTGC	SEQ ID NO.: 27
GCCGTATAAATGTGCTATAAAAGCCGTGC	SEQ ID NO.: 28
ATGCTGCGCTTTTCTCCAATCTGCGG	SEQ ID NO.: 29
CGTTCTCCGATTGGTCACGACTCTCCGATTGGTCACGG	SEQ ID NO.: 30
GCGCACCCAGCCTGGCTCACCCACGCG	SEQ ID NO.: 31
GATCCTTTGCCTCCTTCGATCCTTTGCCTCCTTAAG	SEQ ID NO.: 32
GGTGTGGGAGAGCTTTGGGAGGATACG	SEQ ID NO.: 33
GCTAATCACTCAGCATTTCGGTGAGGGAAGTAAAG	SEQ ID NO.: 34
CCTTTCAGCACCCACGGACAGCGCCAGCTTCAGCACCCACG GACAGCGCCTCG	SEQ ID NO.: 35
GGATCGAACATGGAGTCAGTGAGAAATCAGGATCGG	SEQ ID NO.: 36
GGATCGAAGCCGGAGTCAAGGAGGCCCTGATCGG	SEQ ID NO.: 37
CCGAAAGGACAAAGGTCAAGTCGAAAGGACAAAGGTCA	SEQ ID NO.: 38
CGGGAGAAAATTCGGGAACGTTCAAGAATTGTCGG	SEQ ID NO.: 39
GTTATGCGTGGGCGTAGATGCGGGGGCGTTATAG	SEQ ID NO.: 40
GATGCGTGGGCGTAGG	SEQ ID NO.: 41

(continuación)

Secuencias de oligonucleótidos (5'-3')	SEQ ID NO.
GTATGCGTGGGCGGTGGGCGTAG	SEQ ID NO.: 42
GTTATGCGTTTGTAGATGCTTTCGTTATAG	SEQ ID NO.: 43
GTTATGCGTGGGCGATATAG	SEQ ID NO.: 44
GATGCGTGGGCGTTGACGTGGAAAATGC	SEQ ID NO.: 45
CTATTTGAAACGATCTACATTGGCATAAC	SEQ ID NO.: 46
CGTTCCCACTTCCTGCGACCGG	SEQ ID NO.: 47
GGGTGAAGGCAAGAGTAGAGCGGCGG	SEQ ID NO.: 48
CGTTCTCCGATTGGTCACGCG	SEQ ID NO.: 49
GTACTIONCTTTGCCTCCTTCAACCGG	SEQ ID NO.: 50
CCTTATTCAGCACCCACGGACAGCGCCATTCG	SEQ ID NO.: 51
GCGAAAGGACAAAGGTCAGGCGG	SEQ ID NO.: 52
GGCTTGCTGTGGAATATCGATGGTG	SEQ ID NO.: 53

De acuerdo con la presente invención, la composición de la presente invención puede comprender adicionalmente un tampón. Se puede utilizar cualquier tampón adecuado para la composición de la presente invención. En algunas realizaciones, el sistema de tampón utilizado para la composición es compatible con el principio activo y/o el agente de la composición. En alguna otra realización, el sistema de tampón utilizado para la composición de la presente invención facilita o estabiliza el principio activo y/o el agente. En algunas otras realizaciones, el sistema de tampón utilizado para la composición de la presente invención es un tampón orgánico o inorgánico. Ejemplos de tampones incluyen tampones de fosfato, tampones de citrato, tampones de borato, tampones de bicarbonato, tampones de carbonato, tampones de acetato, tampones de amonio, y tampones de trometamina (Tris).

De acuerdo con la presente invención, en algunas realizaciones, el tampón es un tampón a base de un no fosfato. La cantidad de tampón empleado puede confirmarla un experto en la técnica, tal como una cantidad que varíe desde 0,01 mM a 1 M, tal como 10 mM.

De acuerdo con la presente invención, la composición de la presente invención puede ser una composición farmacéutica, por ejemplo, que incluya un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden contener un compuesto fisiológicamente aceptable que actúe, por ejemplo, para estabilizar la composición o para aumentar o disminuir la absorción del principio activo y/o la composición farmacéutica. Los compuestos fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, carbohidratos tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes tales como el ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular, composiciones que reduzcan el aclaramiento o la hidrólisis de cualquiera de los agentes coadministrados, o excipientes u otros estabilizantes y/o tampones. También se puede utilizar detergentes para estabilizar la composición o para aumentar o disminuir la absorción. Un experto en la técnica apreciará que la elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable, que incluya un compuesto fisiológicamente aceptable dependerá, por ejemplo, de la vía de administración del presente polvo y de las características fisicoquímicas particulares de cualquier agente coadministrado.

En algunas realizaciones, los vehículos o excipientes farmacéuticos adecuados incluyen los excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, carbón vegetal, gel de sílice, estearato sódico, glicerol, monoestearato, talco, cloruro sódico, leche desnatada secada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol, y similares. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tampón el pH. Además, se pueden utilizar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar por medio de procedimientos de mezclado convencional, disolución, granulado, fabricación de grageas, levigado, emulsificación, encapsulación atrapado o liofilización. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera convencional utilizando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables, que faciliten el procesamiento de los compuestos desvelados en el presente documento en preparaciones que se puedan utilizar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración escogida.

Las presentes composiciones farmacéuticas pueden tener forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, aglomerados, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación

sostenida, supositorios, aerosoles, pulverizadores, suspensiones o cualquier otra forma adecuada para su uso. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticamente adecuados se han descrito en la técnica (véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, Philadelphia College of Pharmacy and Science, 19ª Edición, 1995).

- 5 Se desvelan en el presente documento métodos para la utilización de la composición de la presente invención. En un ejemplo, la composición de la presente invención se puede utilizar para inhibir, reducir, o minimizar uno o más efectos adversos del principio activo, por ejemplo, sin el agente. En otro ejemplo, la composición de la presente invención se puede utilizar para tratar una o más afecciones o enfermedades tratables por el principio activo, por ejemplo, administrando la composición del principio activo y el agente, etc. En otro ejemplo más, la composición de la presente invención se puede utilizar para tratar una o más enfermedades tratables con el principio activo con efectos adversos disminuidos o reducidos del principio activo. En algunos ejemplos más, el principio activo es un oligonucleótido señuelo que incluye uno o más sitios de unión para EGR1 y la composición de la presente invención comprende el principio activo se puede utilizar para tratar el dolor o afecciones relacionadas.
- 10
- 15 Cualquier referencia en la descripción a tratamientos o métodos de tratamiento se refiere a las composiciones o formulaciones de la presente invención para su uso en un método de tratamiento.

En general, "tratar" o "tratamiento" de cualquier afección, enfermedad o trastorno se refiere, en algunas realizaciones, a la mejora de la afección, enfermedad o trastorno (es decir, la detención o reducción del desarrollo de la enfermedad o al menos de uno de los síntomas clínicos de la misma). En algunas realizaciones, "tratar" o "tratamiento" se refiere a la mejora de al menos un parámetro físico, que puede no ser perceptible por el sujeto. En algunas realizaciones "tratar" o "tratamiento" se refiere a la inhibición de la afección, enfermedad o trastorno, sea físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma perceptible), fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico) o ambos. En algunas realizaciones, "tratar" o "tratamiento" se refiere al retraso de la aparición de una afección, enfermedad o trastorno.

20

25

Los términos "minimizar", "inhibición" y "reducción", o cualquier variación de estos términos, incluye cualquier descenso medible o inhibición o reducción completa para conseguir un resultado deseado. Por ejemplo, puede haber una disminución del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o más, o cualquier intervalo derivado de este, de reducción de actividad en comparación con lo normal. "Prevención" o "prevenir" se refiere a (1) una reducción en el riesgo de adquirir una enfermedad o trastorno (por ejemplo, que cause que no se desarrolle al menos uno de los síntomas clínicos de una enfermedad en un paciente que pueda estar expuesto o predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha experimentado o presente síntomas de la enfermedad), (2) una reducción en la probable gravedad de un síntoma asociado a una enfermedad o trastorno (por ejemplo, la reducción de la probable gravedad de al menos uno de los síntomas clínicos de una enfermedad en un paciente que pueda estar expuesto o predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha experimentado o presentado síntomas de la enfermedad).

30

35

Como se desvela en el presente documento, el principio activo puede ser un oligonucleótido señuelo que incluye uno o más sitios de unión para EGR1 y la composición de la presente invención que comprende el principio activo puede utilizarse para tratar, pretratar o prevenir el dolor o afecciones relacionados. En general, "dolor" se refiere a una experiencia sensorial y emocional desagradable que se asocia a un daño tisular actual o potencial o descrito en dichos términos. Se incluyen todas las diferentes manifestaciones y cualidades de dolor, incluyendo el dolor mecánico (por ejemplo, inducido por un estímulo mecánico o por movimiento del cuerpo; hiperalgesia mecánica o alodinia), el dolor inducido por la temperatura (por ejemplo, el dolor inducido por temperaturas calientes, cálidas o frías), y el dolor inducido químicamente (por ejemplo, el dolor inducido por un agente químico). En ciertas realizaciones el dolor es crónico, sub-crónico, agudo, o subagudo. "Crónico" se refiere a un periodo de tiempo que comprende meses (por ejemplo, al menos dos meses) o años. "Subagudo" se refiere a un periodo de tiempo que comprende horas (por ejemplo, 1 h -24 h). "Sub-crónico" se refiere a un periodo de tiempo que comprende días o meses (por ejemplo, menos de dos meses). En ciertas realizaciones, el dolor representa hiperalgesia (es decir, una sensibilidad aumentada a un estímulo doloroso) o alodinia (es decir, una respuesta dolorosa a un estímulo no doloroso habitualmente). El dolor puede ser un dolor inflamatorio, dolor neuropático, dolor muscular, dolor esquelético, dolor postquirúrgico, dolor de artritis, o dolor de diabetes. En ciertas realizaciones, el dolor existe previamente en un paciente. En otras realizaciones el dolor es yatrogénico, inducido en un paciente (por ejemplo, el dolor postoperatorio).

40

45

50

En algunas realizaciones, las afecciones dolorosas o relacionadas con el dolor incluyen la señalización nociceptiva. En general "señalización nociceptiva" se refiere a mecanismos celulares y moleculares implicados en la detección del estímulo nocivo o de un estímulo potencialmente perjudicial, que da lugar a la percepción del dolor, incluyendo la síntesis y liberación de neurotransmisores, señalización inducida por neurotransmisores, despolarización de membrana, y eventos de señalización intracelular e intercelular relacionados.

55

60

En algunas otras realizaciones, las afecciones dolorosas o relacionadas con el dolor incluyen el dolor postoperatorio, dolor crónico, dolor inflamatorio, dolor neuropático, dolor muscular, y dolor esquelético. En ciertas realizaciones, las composiciones se pueden utilizar para la prevención de una faceta del dolor mientras se trata concurrentemente otro síntoma del dolor.

65

La composición desvelada en el presente documento se puede utilizar para el tratamiento o prevención del dolor en un paciente administrando la composición de un oligonucleótido señuelo y un agente, en la que el oligonucleótido señuelo no se une a los factores de transcripción AP1, ETS1 y STAT. La composición desvelada en el presente documento se puede utilizar para el tratamiento o prevención del dolor en un paciente administrando la composición de un oligonucleótido señuelo y un agente, en la que el oligonucleótido señuelo se une a uno o más factores de transcripción seleccionados de entre el grupo que consiste en AP1, ETS1, GATA y STAT, a condición de que el dolor no sea un dolor lumbar debido a un trastorno del disco intervertebral.

La composición desvelada en el presente documento se puede utilizar para la modulación de la transcripción de un gen presente en una célula implicada en la señalización nociceptiva o la percepción del dolor en un paciente administrando la composición de un oligonucleótido señuelo, por ejemplo, un oligonucleótido señuelo que comprende uno o más sitios de unión a EGR1 y un agente. En ciertos ejemplos, la modulación comprende la supresión o represión de la expresión genética. "Modulación del nivel de expresión genética" se refiere a cualquier cambio en el nivel de expresión genética, incluyendo una inducción o activación (por ejemplo, un aumento de la expresión genética), una inhibición o supresión (por ejemplo, una disminución de la expresión genética), o una estabilización (por ejemplo, la prevención de la regulación positivo o la regulación negativa de un gen que se produce habitualmente en respuesta a un estímulo, tal como un estímulo inductor de un dolor). En otros ejemplos, la modulación comprende la estabilización de la expresión genética. En otros ejemplos más, la modulación comprende la activación o inducción de la expresión genética. En ciertos ejemplos, el gen está implicado en la señalización nociceptiva. Los genes implicados en la señalización nociceptiva incluyen, pero no se limitan a, genes que codifican proteínas de membrana (por ejemplo, canales iónicos, receptores de membrana, etc.), moléculas de señalización solubles (por ejemplo, moléculas de señalización intracelulares o neurotransmisores), enzimas sintéticas (por ejemplo, enzimas de síntesis de neurotransmisores), y factores de transcripción. Ejemplos específicos de dichos genes incluyen, pero no se limitan a, *BDKRB2*, *HTR3A*, *SCN9A*, *BDNF*, *GRM5*, *NOS1*, *GCH1*, *1*, *CACNA1B*, *P2XR3* y *PNMT*.

En otros ejemplos, la composición de la presente invención se puede utilizar para modular la señalización nociceptiva en una célula poniendo en contacto la célula con la composición de un oligonucleótido señuelo, por ejemplo, un oligonucleótido señuelo que comprende uno o más sitios de unión a EGR1 y un agente. En ciertos ejemplos, la modulación comprende la supresión o represión de la señalización nociceptiva. En ciertos ejemplos, la modulación de la señalización nociceptiva en una célula comprende la modulación, por ejemplo, el aumento, proteólisis de una proteína implicada en la señalización nociceptiva en dicha célula. Por ejemplo, se ha unido la actividad proteasómica anormalmente alta a fuertes déficits de plasticidad neuronal (es decir, una principal característica celular de dolor). En ciertos ejemplos, la modulación comprende la activación de un inhibidor de la señalización nociceptiva.

En otros ejemplos más, la composición de la presente invención se puede utilizar para modular una proteína implicada en la señalización nociceptiva en una célula poniendo en contacto la célula con la composición de un oligonucleótido señuelo, por ejemplo, un oligonucleótido señuelo que comprende uno o más sitios de unión a EGR1 y un agente. En ciertos ejemplos, la modulación de la degradación proteica comprende la estimulación de la función del proteasoma. En ciertos ejemplos, la proteína está implicada en la señalización nociceptiva. Las proteínas implicadas en la señalización nociceptiva incluyen, pero no se limitan a, proteínas de membrana (por ejemplo, canales iónicos, receptores de membrana, etc.), moléculas de señalización solubles (por ejemplo, moléculas de señalización intracelular o neurotransmisores), enzimas sintéticas (por ejemplo, enzimas de síntesis de neurotransmisores), y factores de transcripción. Ejemplos específicos de dichas proteínas incluyen, pero no se limitan a, *BDKRB2*, *HTR3A*, *SCN9A*, *BDNF*, *GRM5*, *NOS1*, *GCH1*.

Como se utiliza en el presente documento, el término "eficaz" (por ejemplo, "una cantidad eficaz") significa adecuada para conseguir un resultado deseado, esperado o pretendido. Una cantidad eficaz puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un principio activo que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para efectuar dicho tratamiento de una enfermedad o afección particular. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del ingrediente activo, la enfermedad o afección, la gravedad de la enfermedad o afección, y la edad, peso, etc., del sujeto que se va a tratar.

En ciertos ejemplos, uno o más principios activos, tal como oligonucleótidos señuelo, opcionalmente en una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende una cantidad estabilizante *in vivo* de un agente, se proporcionan en un kit. En ciertos ejemplos, el kit incluye unas instrucciones, por ejemplo, de utilización de dicho uno o más principios activos o la composición que comprende los principios activos. En ciertos ejemplos, dichas interacciones describen uno o más de los métodos de la presente invención, por ejemplo, un método para la prevención o tratamiento del dolor, un método de modulación de la expresión genética en una célula, un método para la modulación de la señalización nociceptiva en una célula, un método para la modulación de la degradación proteica en una célula, etc. En ciertas realizaciones, los principios activos opcionalmente en una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que se proporcionan en un kit se proporcionan en forma liofilizada. En ciertos ejemplos relacionados, un kit que comprende uno o más componentes liofilizados comprende adicionalmente una solución (por ejemplo, una solución salina farmacéuticamente aceptable) que se puede utilizar para resuspender dicho uno o más principios activos y el agente opcional.

En general, las composiciones de la presentes invención se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en embolada, mediante absorción a través de capas epiteliales o

mucocutáneas (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.), o por vía oral. La administración puede ser sistémica o local. Se conocen distintos sistemas de suministro, incluyendo, por ejemplo, la encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., que se pueden utilizar con fines de administración. Los métodos de administración incluyen, pero no se limitan a, intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, intravenoso, subcutáneo, intranasal, epidural/peridural, oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmico, rectal, mediante inhalación o tópico, particularmente en los oídos, nariz, ojos, o piel. En ciertas realizaciones, se administra más de un principio activo a un paciente en una composición que comprende un agente, y opcionalmente más de un agente. El modo de administración preferido se deja a discreción del facultativo, y dependerá en parte del sitio de la afección médica.

En ejemplos específicos, puede ser deseable administrar una o más composiciones localmente en el área que necesita el tratamiento. Esto se puede conseguir, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante la cirugía, aplicación tópica (por ejemplo, en conjunción con un vendaje después de la cirugía), mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tal como membranas sialásticas, o fibras. En algunos ejemplos, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (por ejemplo, el sitio anterior, actual, o esperado) del dolor.

En ciertos ejemplos, puede ser deseable introducir una o más composiciones en el sistema nervioso por cualquier vía adecuada, incluyendo, pero no restringida a la inyección intraventricular, intratecal, perineural o epidural/peridural. Se puede facilitar la inyección intraventricular mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya.

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

Se puede administrar una dosis y entonces se repite si fuera necesario como determinen los expertos habituados en la técnica. Por lo tanto, en algunos ejemplos, se contempla una única dosis. En otras realizaciones, se contemplan dos o más dosis. Cuando se administran más de una dosis a un sujeto, el intervalo de tiempo entre dosis puede ser cualquier intervalo de tiempo según determinan los expertos habituados en la técnica. Por ejemplo, el intervalo de tiempo entre dosis puede ser aproximadamente de 1 hora a aproximadamente 2 horas, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 6 horas, aproximadamente 6 horas a aproximadamente 10 horas, aproximadamente 10 horas a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 1 día a aproximadamente 2 días, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, o más, o cualquier intervalo de tiempo que se deriva de cualquiera de estos intervalos citados. Las formas de dosificación pueden adaptarse, por ejemplo, para administrarse a un paciente no más de un cierto número por día, tal como no más de dos veces al día, o solo una vez al día. La dosificación se puede proporcionar sola o en combinación con otros fármacos y puede continuar tanto como sea necesario para el tratamiento o prevención eficaces, tales como el tratamiento o prevención eficaces del dolor.

40 Terapia de combinación

En ciertos ejemplos, las composiciones de la presente invención se pueden utilizar en una terapia de combinación con al menos otro agente terapéutico. El otro agente terapéutico puede ser otra composición que comprende un principio activo. La composición principio activo/agente y el agente terapéutico pueden actuar de manera aditiva o sinérgica. En algunas realizaciones, la administración de ambos, el principio activo/agente y el agente terapéutico es concurrente. En otros ejemplos, una composición de principio activo/agente se administra antes o después de la administración de otro agente terapéutico.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habituado en la técnica a la que pertenece la presente solicitud. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente solicitud, los métodos y materiales representativos se describen en el presente documento.

Siguiendo la convención de la ley de patentes de larga duración, los términos “un”, “una”, y “el” se refiere a “uno o más” cuando se utiliza en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un vehículo” incluye mezclas de uno o más vehículos, dos o más vehículos y similar.

El uso del término “o” en las reivindicaciones se utiliza para significar “y/o” a menos que se indique explícitamente para referirse solo a alternativas o las alternativas sean mutuamente excluyentes. Se contempla específicamente que cualquier listado de artículos utilizando el término “o” significa que cualquiera de los artículos enumerados también se puede excluir específicamente de la realización relacionada.

A lo largo de la presente solicitud, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar que un valor incluya la desviación típica de error para el dispositivo o método que se emplee para determinar el valor.

Ejemplos

Ejemplo 1: Valoración de la respuesta clínica de formulaciones de oligonucleótidos

- 5 Se desarrolló un método para identificar la cantidad apropiada de calcio que se tiene que añadir a una formulación con el fin de evitar los signos clínicos y eventos adversos a continuación del suministro intratecal de un oligonucleótido.

En resumen, se anestesiaron las ratas utilizando isoflurano, se les inyectó por vía intratecal (suministro percutáneo, L5/6, 0,02 ml), se les colocó en la jaula para que se recuperaran y se registró su comportamiento durante ~ 60 min.

- 10 Utilizando una formulación de solución salina + oligonucleótido (de doble cadena, 23 pares de bases, peso molecular = 14092,92 g/ml, %GC = 69,5 %, cadena en sentido: 5'-GTATGCGT-GGGCGGTGGGCGTAG-3'), se identificaron trece signos clínicos espontáneos o provocados que se podían producir a continuación del suministro de un oligonucleótido: agitado de cola, rigidez de cola, meneo de cola, dorso encorvado, vocalización, agitación, comportamiento de congelación, aflicción/convulsión, disfunción motora posterior/garras traseras, vocalización exagerada después de unción de la cola, escape exagerado después de la punción de la cola, meneo/rigidez a continuación de la punción de la cola. La presencia o ausencia de un signo durante el periodo de observación se registró numéricamente con un 1 o un 0, respectivamente. Se juzgó la actuación de una formulación para evitar la existencia de estos signos basándose en su valor numérico total respecto a 13 y se comparó con el valor de un control, la inyección intratecal de solución salina.

- 20 Se desarrolló un método de exploración en ratas para determinar la relación molar apropiada de CaCl_2 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dihidrato, peso molecular = 147,02 g/mol) con respecto al oligonucleótido que eliminaba estos efectos. En resumen, las ratas se anestesiaron ligeramente con el fin de llevar a cabo una inyección IT lumbar de la formulación de oligonucleótido (100 mg/ml, 0,02 ml). Después de la inyección, se dejó a los animales que se recuperaran de la anestesia y se colocaron en una jaula. Se observaron los signos clínicos durante aproximadamente 1 h y se calculó una puntuación clínica basándose en la existencia de signos clínicos predeterminados. De una manera iterativa, se ensayaron varias formulaciones del oligonucleótido que contenían relaciones de peso de oligonucleótido: CaCl_2 que variaban desde 1:0,002 gramos (relación molar de 1:0,2) a 1:0,026 gramos (relación molar de 1:2,64). Los resultados indicaban que los signos clínicos se eliminaban comenzando a una relación de peso de oligonucleótido: CaCl_2 de 1:0,0155 gramos (relación molar de 1:1,4 M). El efecto se mantenía hasta la relación más alta ensayada. Basándose en estos resultados, se determinó que una relación de peso fija de oligonucleótido: CaCl_2 de $1:0,0198 \pm 0,003$ (relación molar de $1:1,8 \pm 0,3$ M) que era la óptima para la prevención de los signos clínicos que se pueden producir al administrar un oligonucleótido en el LCR (FIGURA 1). Experimentos adicionales demostraban que la inyección de un oligonucleótido de cadena sencilla producía las mismas reacciones clínicas en comparación con uno de cadena doble, confirmando un efecto de clase para los compuestos a base de oligonucleótidos (FIGURA 1).

Ejemplo 2: Caracterización de una relación de unión oligonucleótido:calcio

- 40 Se llevaron a cabo experimentos para caracterizar una relación de unión oligonucleótido:calcio. Se dedicaron esfuerzos particulares a caracterizar la cantidad de calcio que permanecía libre, no unido al oligonucleótido del Ejemplo 1, ya que la concentración de calcio que se introduce en la formulación, que dependía de la concentración de oligonucleótido, podía exceder la concentración de calcio endógena del LCR. Se preparó un amplio intervalo de formulaciones que contenían un exceso de calcio de 1,4 a 250 veces con respecto a la concentración de oligonucleótido y se midió el calcio libre (FIGURA 2).

- 45 Los resultados demostraban que la cantidad de calcio que se une al oligonucleótido sigue una relación lineal ($R^2 = 0,89$) que aumenta con el exceso de CaCl_2 . Cuanto más calcio se añade, más se une al oligonucleótido hasta que se alcanza una meseta de saturación de unión. La unión también estaba influenciada por la fuerza iónica total de la solución ensayada, que se moduló añadiendo NaCl: cuanto mayor es la fuerza iónica, mayor era la unión del calcio (FIGURA 2). En total, este conjunto de resultados indicaba que solo una pequeña porción de calcio permanece libre en presencia del oligonucleótido en la formulación. Debido a los inconvenientes técnicos ligados al ensayo de detección de calcio, se llevaron a cabo los experimentos iniciales con bajas concentraciones de oligonucleótidos (0,1-3 mM). Con técnicas complementarias que permitían el ensayo de condiciones experimentales con mayores concentraciones de oligonucleótidos se confirmó que hasta el límite de solubilidad del oligonucleótido (13,5 mM), la cantidad de calcio que permanecía libre era mínima con respecto a la concentración introducida inicialmente en la formulación y en el intervalo de la concentración endógena del LCR (FIGURA 3).

- 60 Colectivamente, estos datos muestran que a la relación de oligonucleótido:calcio definida, el calcio introducido en la formulación satura adecuadamente los sitios de unión al calcio presentes en el oligonucleótido para evitar el tamponado del calcio del LCR. Además, demuestran que la formulación no presenta toxicidad potencial en términos de introducción artificial de una alta concentración de calcio en el LCR.

Ejemplo 3: Análisis farmacológico de una formulación de oligonucleótido

- 65 Se llevaron a cabo experimentos complementarios para asegurar que la presencia de calcio en la formulación del Ejemplo 1 no alteraba las propiedades farmacológicas del oligonucleótido. El oligonucleótido ensayado es un factor

de transcripción señuelo que inhibe la transcripción del factor EGR1 y evita el desarrollo de dolor después de una lesión. Los experimentos con ELISA de competición mostraban que el calcio, incluso con un alto exceso de concentración, no tenía un impacto en la afinidad del oligonucleótido por el EGR1 (FIGURA 4A) ni su estabilidad (FIGURA 4B). El ensayo de comportamiento del oligonucleótido en el modelo incisional y modelos preclínicos de lesión del nervio conservado del dolor presentaban una eficacia similar con formulaciones en presencia o ausencia de calcio (FIGURA 5).

Ejemplo 4: Estudio de estabilidad a largo plazo de una formulación de oligonucleótido

A continuación de la relación óptima de oligonucleótido:calcio con respecto al oligonucleótido del Ejemplo 1, se llevaron a cabo experimentos para desarrollar adicionalmente una formulación adecuada que proporcionara una estabilidad a largo plazo de una solución líquida que contenga un oligonucleótido/calcio. Los experimentos iniciales evaluaban la necesidad de un agente tampón preparando soluciones de oligonucleótido/calcio en agua, ya que se sabe que los oligonucleótidos contienen una cierta cantidad de capacidad tampón. Después de ajustar el pH a ~ 7,5, el pH de la solución se evaluó durante un periodo de 2 semanas. El pH no se mantenía y se apreciaba una "deriva" del pH en la solución (Tabla 1). Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos adicionales para seleccionar un tampón apropiado que proporcionara un control de pH adecuado y también fuera compatible con la vía de administración propuesta (intratecal). El fosfato sódico fue la elección inicial de tampón, sin embargo, los experimentos indicaban problemas de compatibilidad con el compuesto. Las concentraciones bajas de fosfato sódico (< 5 mM) no proporcionaban una capacidad tampón adecuada para mantener el pH, mientras que concentraciones más altas (≥ 5 mM) daban como resultado una precipitación visible, presumiblemente debido a la formación de fosfato cálcico (Tabla 2). Por lo tanto, se evaluó la trometamina (Tris), que no contiene fosfatos, en cuanto a compatibilidad y capacidad tampón. Los experimentos indicaban que 10 mM de trometamina (Tris) proporcionaban un control adecuado del pH (estable a 7,5) y no se observaron problemas de compatibilidad con la solución que contenía oligonucleótido:calcio (Tabla 3).

Tabla 1: Estabilidad de la formulación oligonucleótido:calcio en ausencia de tampón

Intervalo de tiempo	Concentración de oligonucleótido, mg/ml		pH	
	Refrigerador (5 °C)	Congelador (-20 °C)	Refrigerador (5 °C)	Congelador (-20 °C)
Día 0			7,47	
			7,5	
Día 3	47,7	46,8	8,28	7,58
	190	186,8	8,02	7,61
Día 7	44	46,3	7,9	7,67
	192	187,6	7,85	7,61
Día 10	47,1	46,7		
	193,8	193,8		

El oligonucleótido se formuló con cloruro cálcico en H₂O a una relación de peso 1:0,0155 (1:1,55 de relación molar) y se ajustó el pH a 7,5 con una pequeña cantidad de hidróxido sódico diluido y ácido clorhídrico diluido. El estudio se llevó a cabo con concentraciones de oligonucleótido de ~ 190 mg/ml y ~ 50 mg/ml a dos temperaturas de almacenamiento diferentes de 5 °C y -20 °C. La concentración de oligonucleótido total y el pH de la formulación AYX1 se controló durante un periodo de 10 días.

Tabla 2: Estabilidad de la formulación oligonucleótido:calcio con tampón de fosfato sódico

Formulación de oligonucleótido	Resultados día 0		Resultados Día 3		Resultados Día 7		Resultados Día 14	
	Visual	pH	Visual	pH	Visual	pH	Visual	pH
1:0,001 CaCl ₂ , sin tampón de fosfato sódico, 4,5 mg/ml of NaCl, Volumen total: 1,325 ml ²	Transparente, sin color	7,555	Transparente, sin color	7,434	Transparente, sin color	7,41	Transparente, sin color	7,328
1:0,001 CaCl ₂ , 2,5 mM de tampón de fosfato sódico buffer, 4,5 mg/ml of NaCl, Volumen total: 1,25 ml	Transparente, sin color	7,491	Transparente, sin color	7,47	Transparente, sin color	7,457	Transparente, sin color	7,415
1:0,001 CaCl ₂ , 5,0 mM de tampón de fosfato sódico, 4,5 mg/ml of NaCl, Volumen total: 1,25 ml	Transparente, sin color	7,466	Transparente, sin color	7,466	Transparente, sin color	7,454	Transparente, sin color	7,393
1:0,002 CaCl ₂ , no de tampón de fosfato sódico, 4,5 mg/ml of NaCl, Volumen total: 1,25 ml	Transparente, sin color	7,498	Transparente, sin color	7,317	Transparente, sin color	7,281	Transparente, sin color	7,209
1:0,002 CaCl ₂ , 2,5 mM de tampón de fosfato sódico, 4,5 mg/ml of NaCl, Volumen total: 1,25 ml	Transparente, sin color	7,546	Transparente, sin color	7,521	Transparente, sin color	7,478	Transparente, sin color	7,421
1:0,002 CaCl ₂ , 5,0 mM de tampón de fosfato sódico, 4,5 mg/ml of NaCl, Volumen total: 1,25 ml	Transparente, sin color	7,508	Ligeramente turbio	6,743	Ligeramente turbio	6,724	Ligeramente turbio	6,654

Se formuló el oligonucleótido (112 mg/ml, 7,95 mM) con cloruro cálcico en H₂O con una relación de peso de 1:0,01 o 1:0,02 (1:1-1:2 de relación molar) y se ajustó el pH a 7,5 con una pequeña cantidad de hidróxido sódico diluido y ácido clorhídrico diluido. Se añadió fosfato sódico para tamponar las formulaciones y se añadió cloruro sódico como el excipiente para ajustar la osmolalidad de la formulación. Se llevó a cabo el ensayo a la temperatura de almacenamiento de 5 °C. Se controlaron la estabilidad y el pH durante un periodo de 14 días. La turbidez indica que se produce precipitación en la solución.

5

10

Tabla 3: Estabilidad de la formulación oligonucleótido:calcio con tampón Tris

A. Estabilidad en quince días

Intervalo de tiempo	Descripción de la muestra	Inspección visual	pH	HPLC de intercambio iónico	HPLC de exclusión por tamaño
				Pureza (Área %)	Pureza (Área %)
Día 0	Producto farmacológico	Transparente, sin color	7,451	93,39	99,3
	Placebo	Transparente, sin color	7,4	ND	ND

ES 2 724 851 T3

(continuación)

Intervalo de tiempo	Descripción de la muestra	Inspección visual	pH	HPLC de intercambio iónico	HPLC de exclusión por tamaño
				Pureza (Área %)	Pureza (Área %)
Día 3	Producto farmacológico	Transparente, sin color	7,522	ND	ND
	Placebo	Transparente, sin color	7,439	ND	ND
Día 7	Producto farmacológico	Transparente, sin color	7,331	ND	ND
	Placebo	Transparente, sin color	7,546	ND	ND
Día 14	Producto farmacológico	Transparente, sin color	7,484	93,53	99,2
	Placebo	Transparente, sin color	7,367	ND	ND

B. Estabilidad en tres meses

Método de ensayo	T=0	T=1 mes	T=2 meses	T=3 meses
Visual - Color	Sin color	Sin color	Sin color	Sin color
Visual - Claridad	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
Apariencia visual	Libre de partículas visibles			
Contenido total de oligonucleótido	111,8 mg/ml	111,9 mg/ml	111,4 mg/ml	108,4 mg/ml
Pureza por SEC-HPLC				
a. Pico principal de oligonucleótido	99,30 %	99,20 %	99,20 %	99,20 %
b. impurezas de cadena sencilla	<u>RRT %área</u>	<u>RRT %área</u>	<u>RRT %área</u>	<u>RRT %área</u>
	0,88	0,59 %	0,88	0,88
c. impurezas inespecíficas	1,13	0,20 %	0,63 %	0,63 %
	0,61 %		1,14	1,13
	0,12 %		0,21 %	0,13 %

(continuación)

Método de ensayo	T=0	T=1 mes	T=2 meses	T=3 meses
Pureza por IEX-HPLC				
a. Picos principales de oligonucleótido	93,6 % Total	93,7 % Total	92,9 % Total	91,3 % Total
	59,6 % AWL 44,0 % AWM	49,9 % AWL 43,8 % AWM	49,3 % AWL 43,6 % AWM	48,8 % AWL 42,5 % AWM
b. impurezas	%Área	%Área	%Área	%Área
	2,32 %	2,74 %	2,50 %	3,12 %
	0,68 %	1,14 %	0,91 %	0,70 %
	%Área	%Área	%Área	%Área
	0,30 %	0,27 %	0,31 %	0,31 %
	1,79 %	1,53 %	1,79 %	2,88 %
	0,73 %	1,27 %	0,61 %	0,98 %
pH	7,5	7,5	7,5	7,6

Estabilidad de la formulación de oligonucleótido:calcio tamponada con Tris. Tabla 3A. Se formuló el oligonucleótido (112 mg/ml, 7,95 mM) con cloruro cálcico en H₂O con una relación de peso de 1:0,02 (1:2 de relación molar) y se ajustó el pH a 7,5 con una pequeña cantidad de hidróxido sódico diluido y ácido clorhídrico diluido. Se añadió Tris (con una concentración final de 10 mM) para tamponar la formulación y se añadió cloruro sódico como excipiente para ajustar la osmolalidad de la formulación. Se llevó a cabo el ensayo a una temperatura de almacenamiento de 5 °C. Se controlaron la estabilidad y el pH de las formulaciones durante un periodo de 14 días. Se llevaron a cabo mediciones adicionales de la estabilidad e integridad del oligonucleótido (pureza por HPLC de intercambio iónico y HPLC de exclusión por tamaño) en el tiempo 0 y a los 14 días. Tabla 3B: Estabilidad a largo plazo de la formulación de oligonucleótido:calcio. Se formuló el oligonucleótido (110 mg/ml, 7,8 mM) con cloruro cálcico en H₂O con una relación de peso de 1:0,018 (1:1,8 de relación molar), se ajustó el pH a 7,5 y se añadió Tris (con una concentración final de 10 mM). Se midieron el pH, la precipitación (por inspección visual) y la integridad del oligonucleótido (por SEC-HPLC de exclusión por tamaño, IEX-HPLC de intercambio iónico) durante 3 meses. Se ensayaron tres condiciones de almacenamiento 5 °C, 25 °C y 40 °C, con resultados similares. Se muestra el resultado de la condición de almacenamiento a 5 °C.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> Adynxx, Inc.

<120> FORMULACIONES PARA EL SUMINISTRO DE PRINCIPIOS ACTIVOS

<130> EAH/FP7078462

25 <140> EP13787024.2
<141> 09-05-2013

<150> PCT/US2013/040426

30 <151> 09-05-2013

<150> US 61/645,475
<151> 10-05-2013

35 <160> 53

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

40 <211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo

<400> 1

	ggcttatgca aattcgaatg caaatttgtc g	31
5	<210> 2 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 2 ctaagccac gtgaccattg gccaggtgac cagatc	36
15	<210> 3 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 3	
25	gttatgcgtg ggcgataatg cggggcgctt atag	34
30	<210> 4 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
35	<400> 4 gcctccctga gctcattgac gtatctcgg	29
40	<210> 5 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
45	<400> 5 cgaatatgac tgagaatgac tcagatttgc	30
50	<210> 6 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
55	<400> 6 ggttctatga ttttgaatc ggattgtgca aagaagc	37
60	<210> 7 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 7	
5	gcttcaggat gtccatatta ggagatcttg ttcg	34
	<210> 8	
	<211> 34	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 8	
15	ggccacagga tgtaggatgt ccatattagg atgc	34
	<210> 9	
	<211> 35	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
25	<400> 9	
	gttctctaaa aataaaaggc taaaaataaa agtcg	35
	<210> 10 <211> 30	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
35	<400> 10	
	attaggggcg ggggccggcg cggggtatta	30
	<210> 11	
	<211> 35	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
45	<400> 11	
	gttatggcgg ggcggggcgg ggccgggcgg tttac	35
	<210> 12	
	<211> 29	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 12	
	ggcaatgtgg ttttagtgtg gttttacgg	29
60	<210> 13	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 724 851 T3

	<220>		
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo		
	<400> 13		
5	gccgtttggg gtcatagaac cacaggaacc acacgg		36
	<210> 14		
	<211> 32		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo		
15	<400> 14		
	cattgcccgg aaatggaccg gatgtaattt cc		32
	<210> 15		
	<211> 40		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo		
25	<400> 15		
	gttcttgga aataaatgga aaatagtga aaataagtcg		40
	<210> 16		
30	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo		
	<400> 16		
	cgttcccact tcctgcgacc acttcctgcc ggg		33
40	<210> 17		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo		
	<400> 17		
50	ctgcacctat aaatggccta taaatgggga tgc		33
	<210> 18		
	<211> 33		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo		
	<400> 18		
60	gcttatttcg cggaaggttt cccggaagtg gcg		33
	<210> 19		
	<211> 31		
65	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

	<220>		
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo		
5	<400> 19	gctgtgcctt atctctttgg gataactggc g	31
	<210> 20		
	<211> 32		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo		
15	<400> 20	gcttaatgaa taagaggaaa aatgcatgct gg	32
	<210> 21		
	<211> 33		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo		
25	<400> 21	gttctgagat tgcacgatga gatttcacag tcg	33
	<210> 22		
	<211> 32		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo		
35	<400> 22	gtcccgcata aataatggca tccttaatcg cg	32
40	<210> 23		
	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo		
	<400> 23	gtgcaggcaa gagtagagac aggcaagagt agatgc	36
50	<210> 24		
	<211> 25		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo		
60	<400> 24	ccgccaataa ttaattatta aggcc	25
	<210> 25		
	<211> 35		

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 25 gcttcggttcc atttccggtc tcggtttccc cattc	35
10	<210> 26 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 26 gctgctgtgg aatatacgacc tgtggaatat cgtg	34
20	<210> 27 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
30	<400> 27 gccgtataaa tgtgctataa aagttttaag accgtgc	37
35	<210> 28 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 28 gccgtataaa tgtgctataa aagccgtgc	29
45	<210> 29 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 29 atgctgcgct tttctccaat ctgcgg	26
55	<210> 30 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 30 cgttctccga ttggtcacgg actctccgat tggtcacggc	40
	<210> 31	

	<211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 31 gcgacaccca gcctggctca cccacgcg	28
10	<210> 32 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 32 gatcctttgc ctcccttcgat cctttgcctc cttcaag	37
20	<210> 33 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 33 ggtgtttggg agagctttgg gaggatacg	29
30	<210> 34 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 34 gctaatact cagcatttcg gtgaggaag tgaaag	36
40	<210> 35 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 35 cctttcagca ccacggacag cgccagcttc agcaccacgg acagcgcctc g	51
50	<210> 36 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 36 ggatcgaaca tggagtcagt gagaaatcag gatcgg	36
60		

5	<p><210> 37 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo</p>	
10	<p><400> 37 ggatcgaagc cggagtcaag gaggcccctg atcgg</p>	35
15	<p><210> 38 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo</p>	
20	<p><400> 38 ccgaaaggac aaaggtcaag tcgaaaggac aaaggtcag</p>	39
25	<p><210> 39 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo</p>	
30	<p><400> 39 cgggagaaaa ttcggaacg ttcaagaatt gtcgg</p>	35
35	<p><210> 40 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo</p>	
40	<p><400> 40 gttatgcgtg ggcgtagatg cgggggcggt atag</p>	34
45	<p><210> 41 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo</p>	
50	<p><400> 41 gatgcgtggg cgtagg</p>	16
55	<p><210> 42 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo</p>	
60	<p><400> 42</p>	
65		

	gtatgcgtgg gcggtgggcg tag	23
	<210> 43	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
10	<400> 43	
	gttatgcgtt tgtagatgct ttcgttatag	30
	<210> 44	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
20	<400> 44	
	gttatgcgtg ggcgatatag	20
	<210> 45	
25	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 45	
	gatgcgtggg cgttgacgtg gaaaatgc	28
35	<210> 46	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 46	
45	ctatttcgaa acgatctaca ttggcataac	30
	<210> 47	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 47	
55	cgttcccact tcctgcgacc gg	22
	<210> 48	
	<211> 26	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	

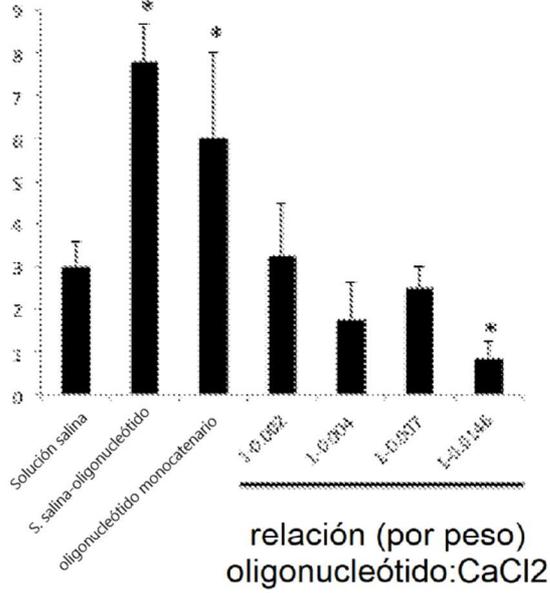
	<400> 48 gggtgaaggc aagagtagag cggcgg	26
5	<210> 49 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 49 cgttctccga ttggtcacgc g	21
15	<210> 50 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 50 gtactccctt tgcctccttc aaccgg	26
25	<210> 51 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 51 ccttattcag caccacggac agcgcattc g	31
35	<210> 52 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 52 gcgaaaggac aaaggtcagg cgg	23
45	<210> 53 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Factor de transcripción del oligonucleótido señuelo	
	<400> 53 ggcttgctgt ggaatatcga tggtg	25
55		
60		

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un principio activo y una cantidad estabilizante *in vivo* de un agente,
5 en la que el principio activo es un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 42 y el agente es el ion calcio.
en la que el agente se asocia a un efecto adverso *in vivo* causado por la administración del principio activo sin el
agente.
en la que la cantidad estabilizante *in vivo* es la cantidad que sustancialmente satura los sitios de unión del principio
activo al agente, y
10 en donde la composición farmacéutica se formula para su administración intratecal.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, adecuada para su administración mediante inyección.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la concentración de ion calcio libre no unido en la
15 composición es mayor que el nivel endógeno del ion calcio en el líquido cefalorraquídeo.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la concentración de ion calcio libre no unido en la
composición es menor que el nivel endógeno del ion calcio en el líquido cefalorraquídeo.
- 20 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la relación molar o la relación de peso del ácido
nucleico con respecto al ion calcio varía desde aproximadamente 1:1000 a aproximadamente 1000:1.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que:
el ion es el ion calcio tal como está comprendido en el cloruro cálcico, y en donde la relación de peso del ácido nucleico
25 con respecto al cloruro cálcico es de aproximadamente 1:1, 2:1, 4:1, 5:1, 15:1, 30:1, 50:1, 100:1, 200:1, 250:1, 300:1,
400:1, o 500:1, o cualquier intervalo que se pueda derivar de este.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente un tampón.
- 30 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica comprende
adicionalmente un tampón no a base de fosfato.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 para su uso en un método para el tratamiento o el manejo del
dolor en un sujeto.
35

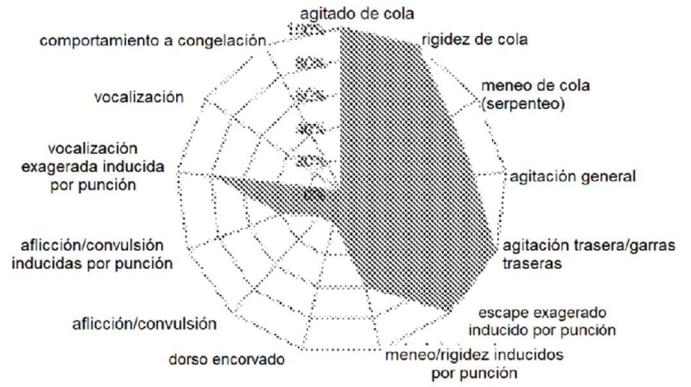
A

Valoración de la respuesta clínica



relación (por peso)
oligonucleótido:CaCl2

B



C



FIGURA 1A, 1B y 1C

Unión de calcio
(calcio unido /
oligonucleótido)

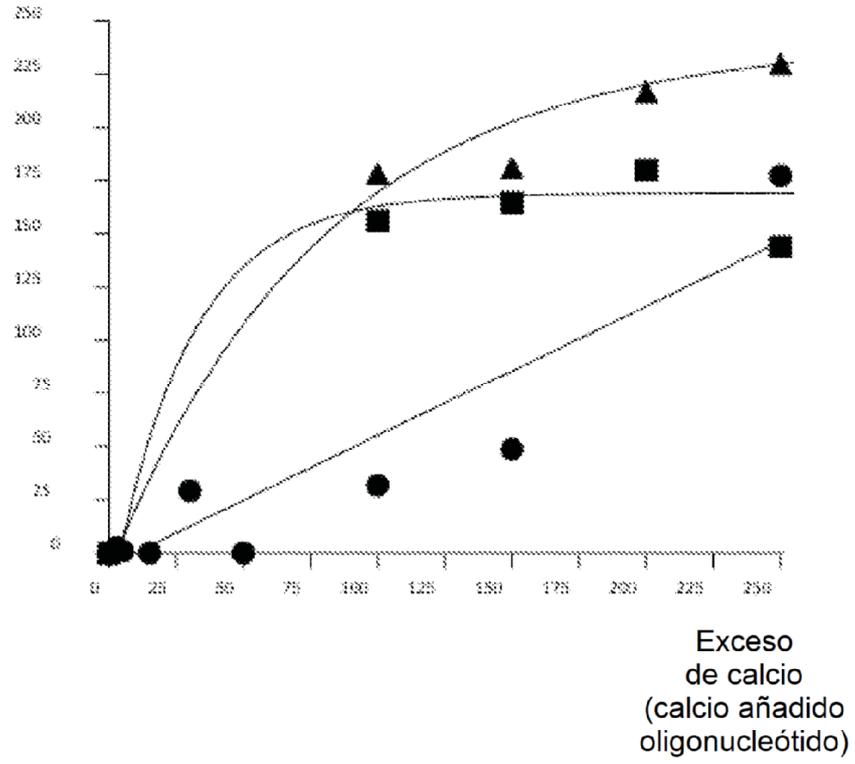


FIGURA 2

Calcio libre/
en la formulación (mM)

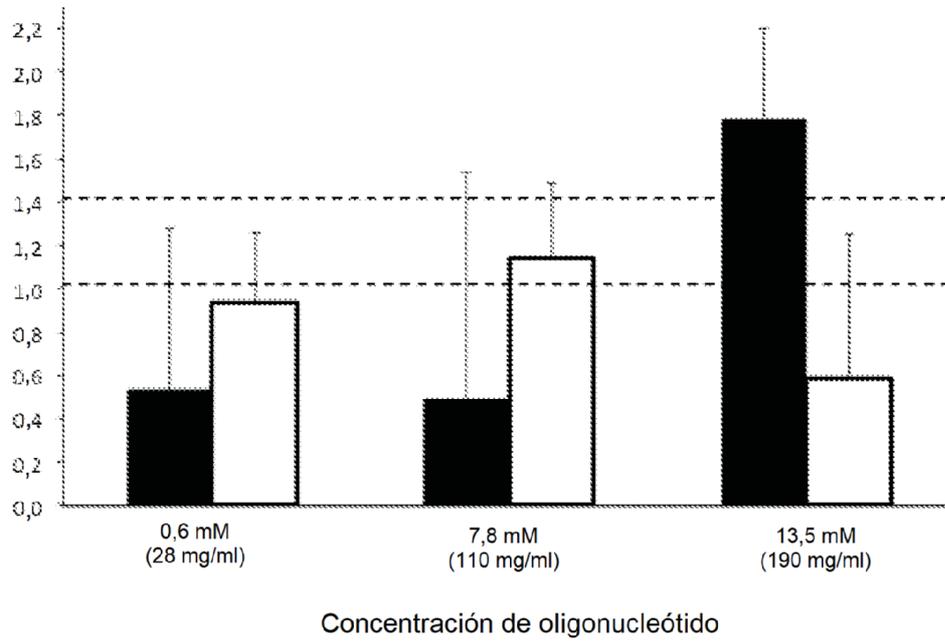
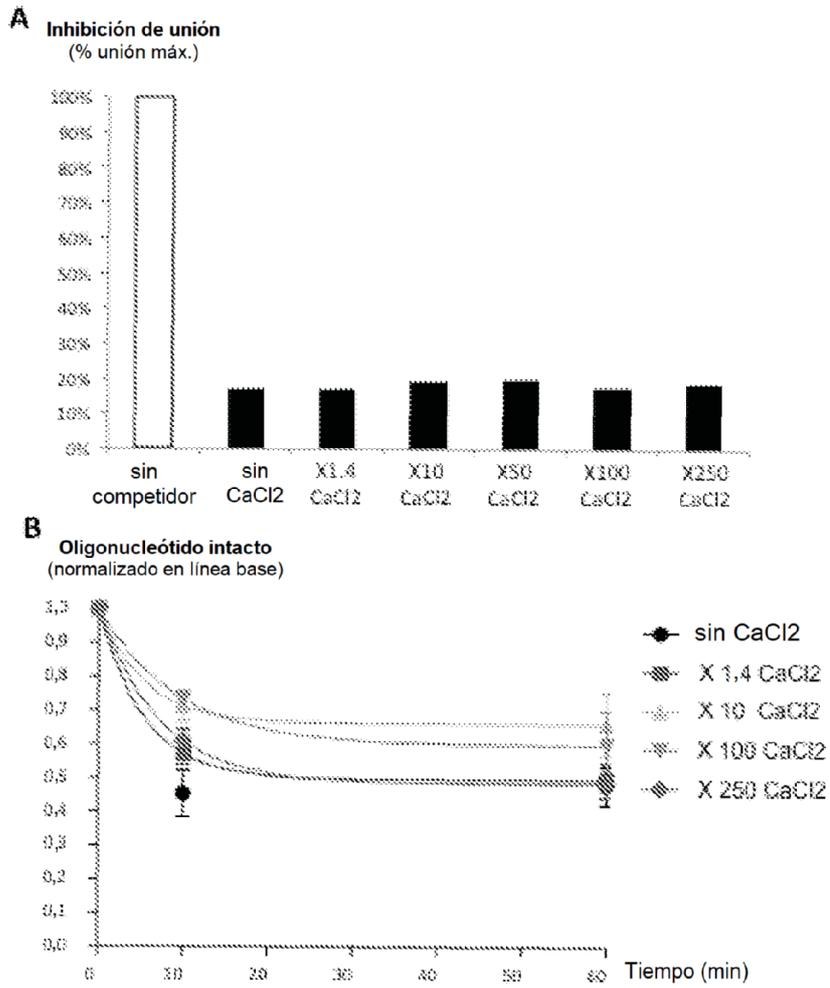
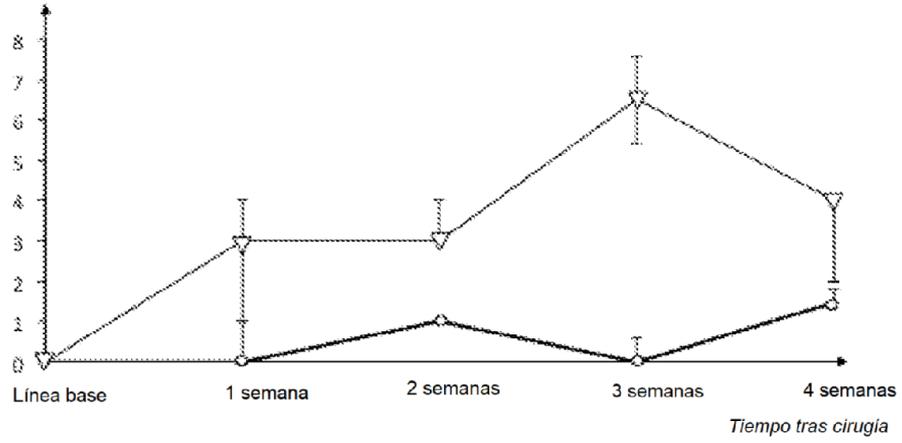


FIGURA 3

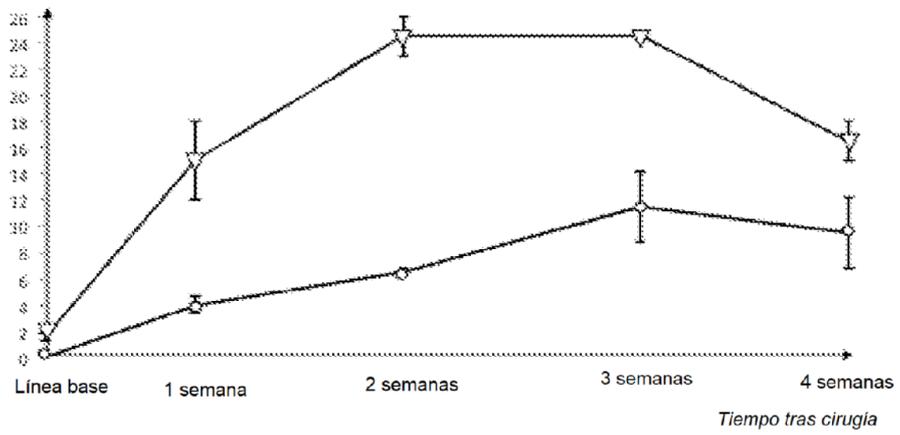


FIGURAS 4A y 4B

A Respuestas totales a VF



B Respuestas totales a VF



FIGURAS 5A y 5B