

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 689**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2015 PCT/US2015/045268**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16025829**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2015 E 15832083 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 3180434**

54 Título: **Señuelos oligonucleotídicos para el tratamiento del dolor**

30 Prioridad:

15.08.2014 US 201462037996 P

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

26.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MAMET, JULIEN;
ORR, RICK;
MANNING, DON;
HARRIS, SCOTT y
MARTIN, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 750 689 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

Señuelos oligonucleotídicos para el tratamiento del dolor

5

Antecedentes**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a agentes terapéuticos tales como ácidos nucleicos bicatenarios, denominados señuelos oligonucleotídicos, a composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos y a métodos relacionados de modulación de la señalización nociceptiva, por ejemplo, para prevenir y/o tratar el dolor.

Descripción de la técnica relacionada

15

El dolor puede definirse como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial, o describirse en términos de dicho daño. El dolor crónico afecta al menos al 40 % de la población de EE.UU. y se asocia a numerosas afecciones médicas perjudiciales. Persistente y altamente debilitante, el dolor crónico generalmente se acompaña de debilidad, insomnio, falta de apetito, irritabilidad y depresión. Con el paso del tiempo, la calidad de vida se ve profundamente afectada y los pacientes a menudo son incapaces de realizar las tareas sencillas de la vida cotidiana.

20

Los tratamientos para el dolor usados actualmente aplican una escala de dolor de tres etapas que recomienda la administración de fármacos de la siguiente manera: no opioides (por ejemplo, aspirina, acetaminofeno, etc.), después, según sea necesario, opioides leves (por ejemplo, codeína) y finalmente opioides fuertes (por ejemplo, morfina). A pesar de este arsenal de fármacos, más del 50 % de los pacientes con dolor crónico no reciben tratamiento eficazmente.

25

La ineficacia de los tratamientos actuales para el dolor se debe, entre otras cosas, a problemas de toxicidad significativos con las terapias farmacológicas existentes. La toxicidad leve a grave está inducida por todas las clases de analgésicos: los fármacos inflamatorios no esteroideos provocan daño gastrointestinal, los coxib están asociados a insuficiencia cardíaca y los opioides son responsables de numerosos efectos secundarios incluyendo depresión respiratoria, sedación, disfunciones digestivas y adicción.

30

Los factores de transcripción son factores importantes en múltiples vías de señalización y con frecuencia controlan la expresión concurrente de numerosos genes. Muchos factores de transcripción están implicados en la regulación de la expresión de genes que están implicados en el dolor, incluyendo, pero no limitado a, *BDNF*, Factor de crecimiento transformante (*TGFB1*), *CDKN1A*, *GFAP*, Factores POU, factores estimulantes en dirección 5' (*USF1*, *USF2*), *EGR1*, Proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc/factores de transcripción activadores (*CREB/ATF*), proteína activadora 1 (*AP1*), factor de respuesta sérica (SRF), factor de transcripción selectiva del promotor (SP1) y el factor de transcripción relacionado con Runt 1 (*CBFA2*).

35

40

De esta manera, puede haber un potencial terapéutico significativo en la inhibición de los factores de transcripción para controlar la expresión de genes implicados en el dolor. En consecuencia, lo que se necesita son inhibidores de factores de transcripción selectivos no tóxicos fácilmente disponibles. El documento WO 2008/141308 A2, el documento AU 2014 201 462 A1 y el documento US 8 741 864 B2 se refieren a oligonucleótidos bicatenarios y a su uso para modular la señalización nociceptiva para prevenir y/o tratar el dolor. El documento WO 2013/170086 A2 se refiere la administración *in vivo* de formulaciones de principios activos.

45

Breve resumen

50

Las realizaciones de la presente invención se refieren generalmente a agentes terapéuticos, tales como oligonucleótidos, que inhiben la unión de al menos un factor de transcripción de la familia similar a Krüppel (KLF) a su sitio o sitios de unión del factor de transcripción endógeno, composiciones farmacéuticas que comprenden tales agentes y métodos relacionados de modulación de la señalización nociceptiva, por ejemplo, para prevenir y/o tratar el dolor en un sujeto en necesidad de los mismos. Los agentes terapéuticos son oligonucleótidos de doble cadena (por ejemplo, señuelos oligonucleotídicos), que comprenden al menos dos sitios de unión del factor de transcripción que se unen a al menos un factor de transcripción KLF que incluye KLF6.

55

Las realizaciones de la presente invención, por lo tanto, incluyen señuelos oligonucleotídicos de acuerdo con la reivindicación 1.

60

En algunas realizaciones, el señuelo oligonucleotídico tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 pares de bases.

65

En realizaciones particulares, el señuelo oligonucleotídico comprende un primer sitio de unión al factor de transcripción

y un segundo sitio de unión al factor de transcripción, en donde el primer y el segundo sitios de unión de transcripción se superponen. En determinadas realizaciones, el primer sitio de unión del factor de transcripción se une a KLF6, y el segundo sitio de unión al factor de transcripción se une a KLF9.

5 En determinadas realizaciones, el señuelo oligonucleotídico tiene un primer sitio de unión al factor de transcripción, un segundo sitio de unión del factor de transcripción y un tercer sitio de unión del factor de transcripción, en donde el primer, el segundo y el tercer sitios de unión del factor de transcripción se superponen. En realizaciones específicas, el primer sitio de unión del factor de transcripción se une a KLF6, el segundo sitio de unión del factor de transcripción se une a KLF9 y el tercer sitio de unión al factor de transcripción se une a KLF15.

10 Algunas realizaciones se refieren a la población o poblaciones de los señuelos oligonucleotídicos, en donde la población de señuelos oligonucleotídicos proporciona una capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9 que es igual o mayor que un valor predeterminado, por ejemplo, un valor de densidad óptica de aproximadamente 0,2 DO₄₅₀ en un ensayo ELISA convencional.

15 En algunas realizaciones, el señuelo oligonucleotídico (por ejemplo, en la población) comprende una secuencia representada por la Fórmula 1 o la Fórmula 2:

20 $a_1t_2c_3c_4T_5T_6Y_7G_8M_9M_{10}T_{11}Y_{12}Y_{13}K_{14}Y_{15}C_{16}N_{17}H_{18}h_{19}n_{20}n_{21}V_{22}n_{23}n_{24}Y_{25}m_{26}h_{27}W_{28}b_{29}V_{30}a_{31}W_{32}$ (Fórmula 1; SEQ ID NO: 1)

$t_1g_2t_3k_4b_5K_6K_7D_8D_9V_{10}D_{11}N_{12}S_{13}D_{14}N_{15}B_{16}N_{17}N_{18}d_{19}V_{20}m_{21}b_{22}V_{23}m_{24}h_{25}r_{26}m_{27}a_{28}$ (Fórmula 2; SEQ ID NO: 2)

25 en donde S es G o C; W es A o T; Y es T o C; D es A, G o T; B es C, G o T; K es T o G; M es C o A; H es C, T o A; V es C, G o A; R es A o G; y N es cualquier nucleótido, en donde las letras minúsculas pueden estar presentes o ausentes, y en donde los números en el subíndice representan la posición de un nucleótido en la secuencia.

30 En algunas realizaciones, el señuelo oligonucleotídico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3-33 y 35 o una variante de la misma. En realizaciones específicas, el señuelo comprende una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 28 (16.6.5), SEQ ID NO: 25 (16.6.2), SEQ ID NO: 19 (17.5) o SEQ ID NO: 35 (T16.6-T17.5 Fu2).

35 Ciertas realizaciones incluyen un señuelo oligonucleotídico que comprende una secuencia representada por la Fórmula 1 o la Fórmula 2:

$a_1t_2c_3c_4T_5T_6Y_7G_8M_9M_{10}T_{11}Y_{12}Y_{13}K_{14}Y_{15}C_{16}N_{17}H_{18}h_{19}n_{20}n_{21}V_{22}n_{23}n_{24}Y_{25}m_{26}h_{27}W_{28}b_{29}V_{30}a_{31}W_{32}$ (Fórmula 1; SEQ ID NO: 1)

$t_1g_2t_3k_4b_5K_6K_7D_8D_9V_{10}D_{11}N_{12}S_{13}D_{14}N_{15}B_{16}N_{17}N_{18}d_{19}V_{20}m_{21}b_{22}V_{23}m_{24}h_{25}r_{26}m_{27}a_{28}$ (Fórmula 2; SEQ ID NO: 2)

40 en donde S es G o C; W es A o T; Y es T o C; D es A, G o T; B es C, G o T; K es T o G; M es C o A; H es C, T o A; V es C, G o A; R es A o G; y N es cualquier nucleótido, en donde las letras minúsculas pueden estar presentes o ausentes, y en donde los números en el subíndice representan la posición de un nucleótido en la secuencia.

45 En algunas realizaciones, el señuelo comprende, consiste, o consiste esencialmente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3-33 y 35, o una variante de la misma. En realizaciones particulares, el señuelo comprende una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 28 (16.6.5), SEQ ID NO: 25 (16.6.2), SEQ ID NO: 19 (17.5) o SEQ ID NO: 35 (T16.6-T17.5 Fu2).

50 También se incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden un señuelo oligonucleotídico o una población de señuelos descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, los señuelos oligonucleotídicos se proporcionan como sales, hidratos, solvatos o derivados de N-óxidos.

55 Algunas realizaciones incluyen uno o más kits que comprenden un señuelo oligonucleotídico o una población de señuelos descritos en el presente documento, opcionalmente una instrucción para el uso del o los señuelos oligonucleotídicos.

60 También se describen métodos para modular la transcripción de un gen presente en una célula implicada en la señalización nociceptiva que comprende administrar a la célula una cantidad eficaz de un señuelo oligonucleotídico o composición farmacéutica descrita en el presente documento.

También se desvelan métodos para modular la señalización nociceptiva en una célula que comprende administrar a la célula una cantidad eficaz de un señuelo oligonucleotídico o composición farmacéutica descrita en el presente documento.

65 Ciertas divulgaciones incluyen métodos para prevenir y/o tratar el dolor en un sujeto que comprende administrar al

sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un señuelo oligonucleotídico o composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas divulgaciones, el dolor es un dolor crónico. En divulgaciones particulares, el dolor es dolor neuropático. En algunas divulgaciones, el dolor está asociado a inflamación. En determinadas divulgaciones, el dolor está asociado a trastorno del sistema nervioso central o visceral. En divulgaciones específicas, el dolor es dolor neuropático asociado a inflamación.

También se desvelan métodos para modular la señalización nociceptiva en una célula que comprende administrar a la célula una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico inhibe la unión de un factor de transcripción a su sitio de unión del factor de transcripción, en donde el factor de transcripción se selecciona del grupo que consiste en KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF6, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF16 y KLF17.

En realizaciones particulares, el agente terapéutico proporciona una capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9 que es igual a o mayor que un valor de densidad óptica de aproximadamente 0,2 DO₄₅₀ en un ensayo ELISA convencional, o un nivel de unión comparable usando unidades de medición ELISA convencionales equivalentes.

También se describen métodos para tratar el dolor en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico inhibe la unión de un factor de transcripción a su sitio de unión de la transcripción, en donde el factor de transcripción se selecciona del grupo que consiste en KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF6, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF16 y KLF17.

En determinadas realizaciones, el agente terapéutico proporciona una capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9 que es igual a o mayor que un valor de densidad óptica de aproximadamente 0,2 DO₄₅₀ en un ensayo ELISA convencional. En divulgaciones particulares, el dolor es dolor neuropático, dolor asociado a inflamación y/o dolor neuropático asociado a inflamación.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra las características de unión a KLF de ciertos de los señuelos oligonucleotídicos, con respecto al control de señuelos KLF (resaltado en gris). Los valores de unión a KLF6, KLF9 y KLF15 se presentan como media y los valores SEM DO₄₅₀ del ensayo de unión ELISA *in vitro* descrito en el Ejemplo 1. El N correspondiente también se lista. La efectividad para tratar el dolor neuropático y/o neuroinflamatorio se presenta como porcentaje (%) de reducción del dolor con respecto al control durante el período de prueba (~ 4-8 semanas en total, ~ 2-4 semanas después del tratamiento dependiendo del estudio) de los estudios en animales correspondientes. N/A = No aplicable.

Las **Figuras 2A-B** muestran la efectividad de ciertos señuelos oligonucleotídicos en el modelo de lesión nerviosa preservada (SNI) del dolor neuropático crónico. El dolor se midió como hipersensibilidad mecánica usando filamentos repetitivos de von Frey. Se inyectaron señuelos oligonucleotídicos (200 nmoles) o vehículo una vez por vía intratecal el día 14 postoperatorio (POD14). Los valores medios + SEM de las respuestas totales a las estimulaciones de von Frey se normalizaron en los valores de dolor basales medidos en POD14 antes de la inyección del vehículo o señuelos; los datos previos a la inyección antes de POD14 se combinan entre grupos, Prueba T frente a vehículo a un punto de tiempo dado: * $p \leq 0,05$, señuelo frente a distribución de datos del vehículo después del tratamiento (POD 17-POD31): $p \leq 0,001$ para TFD16, 16.6.2, 16.6.5, TFD17, 17.5, $p = 0,005$ para 17.1, $p = 0,39$ para 16.9 y $p = 0,46$ para 17.9; $n = 4$ ratas por grupo de prueba. El eje X muestra los días postoperatorios (POD).

Las **Figuras 3A-B** muestran la efectividad de algunos de los señuelos oligonucleotídicos en el modelo de lesión por constricción crónica (CCI) del dolor neuroinflamatorio crónico. El dolor se midió como hipersensibilidad mecánica usando filamentos repetitivos de von Frey. Se inyectaron señuelos oligonucleotídicos (200 nmoles) o vehículo una vez por vía intratecal el día 14 postoperatorio (POD14). Los valores medios + SEM de las respuestas totales a las estimulaciones de von Frey se normalizaron en los valores de dolor basales medidos en POD14 antes de la inyección del vehículo o señuelos; los datos previos a la inyección antes de POD14 se combinan entre grupos, Prueba T frente a vehículo a un punto de tiempo dado: * $p \leq 0,1$, ** $p \leq 0,05$, señuelo frente a distribución de datos del vehículo después del tratamiento (POD 17-POD31): $p = 0,23$ para TFD16, $p = 0,01$ para 16.6.2, $p = 0,03$ para 16.6.5, 0,02 para 16.9, $p = 0,0004$ para TFD17, $p = 0,005$ para 17.1, $p = 0,004$ para 17.5 y $p = 0,12$ para 17.9; $n = 4$ ratas por grupo de prueba (excepto 17.9: $n = 3$ debido a la exclusión de 1 rata debido a un valor de dolor basal insuficiente en POD14). El eje X muestra los días postoperatorios (POD).

La **Figura 4A-C** muestra el nivel de efectividad de algunos de los señuelos oligonucleotídicos con respecto a su relación de unión a KLF15/KLF9 (4A), coeficientes de correlación lineal entre la efectividad para tratar el dolor neuropático crónico y los parámetros de unión a KLF6, KLF9 y KLF15 (4B) y una regresión lineal de los niveles de efectividad para la población de los señuelos probados con respecto a sus relaciones de unión KLF15/KLF9, excluyendo relaciones ~ 0.9 (4C). El nivel de efectividad de cada señuelo se midió como el porcentaje de alivio del dolor frente al control en el modelo SNI de dolor crónico durante el período de prueba (~ 4-8 semanas en total, ~ 2-4 semanas después del tratamiento dependiendo del estudio).

Las **Figuras 5A-C** muestran el nivel de efectividad de algunos de los señuelos oligonucleotídicos con respecto a

su unión combinada a KLF6, KLF9 y KLF15 (5A), los coeficientes de correlación lineal entre la efectividad para tratar el dolor neuroinflamatorio crónico y los parámetros de unión a KLF6, KLF9 y KLF15 (5B) y una regresión lineal del nivel de efectividad para la población de señuelos probados en relación con su capacidad de unión total a KLF6 y KLF9, como se indica por sus relaciones de unión $1/(KLF6 + KLF9)$ (5C). El nivel de efectividad de cada señuelo se midió como el porcentaje de reducción del dolor frente al control en el modelo SNI de dolor crónico durante el período de prueba (~ 4-8 semanas en total, ~ 2-4 semanas después del tratamiento dependiendo del estudio).

La **Figura 6** muestra el patrón diferencial de efectividad de algunos de los señuelos oligonucleotídicos (pastillas blancas) en relación con los señuelos de control KLF de la bibliografía (TFDC1, TFDC2 y TFD3, que contiene dos sitios de unión de caja CACCC-consenso KLF, pastillas negras), a través de etiologías complementarias del dolor, desde neuropático (eje Y) hasta dolor incluyendo componentes inflamatorios (eje X).

La **Figura 7** muestra un gráfico de la relación de unión $1/(KLF6 + KLF9)$ (diamantes), que es indicativo de la efectividad para tratar el dolor neuroinflamatorio (cuanto menor, más efectividad) y de la relación de unión KLF15/KLF9 (cuadrados), que es indicativa de la efectividad para tratar el dolor neuropático (cuanto mayor, más efectividad), para los señuelos oligonucleotídicos de la invención en la Tabla 2 (eje X, señuelos KLF: 1 = 16.5, 2 = 16.6.7, 3 = 17.7, 4 = 17.1, 5 = 16.2, 6 = 16.6.2, 7 = 17.3, 8 = 16.6, 9 = 17.9, 10 = 17.5, 11 = 16.8, 12 = 16.9, 13 = 17.8, 14 = 17.4, 15 = 17.1, 16 = 16.4, 17 = 16.1, 18 = 17.2, 19 = 16.0, 20 = 17.5.3, 21 = 16.6.3, 22 = 17.5.1, 23 = 16.3, 24 = 16.6.5, 25 = 16.10, 26 = 17.6, 27 = T16.6-T17.5 Fu2, 28 = 17.0, 29 = 16.6.4, 30 = 16.6.6, 31 = 17.5.2, 32 = 16.7, T16.6-T17.5 Fu1 no se lista debido a valores no aplicables).

Las **Figuras 8A-B** muestran el efecto de los niveles de dosis ascendentes de señuelo oligonucleotídico de 16.6.5 en el modelo SNI de dolor neuropático crónico (A) y en el modelo CCI de dolor neuroinflamatorio crónico (B). El dolor se midió como hipersensibilidad mecánica usando filamentos repetitivos de von Frey. 16.6.5 o el vehículo se inyectaron una vez por vía intratecal el día 14 postoperatorio (POD14). Los valores medios + SEM de las respuestas totales a las estimulaciones de von Frey se normalizaron en los valores de dolor basales medidos en POD14 antes de la inyección del vehículo o señuelos; los datos previos a la inyección antes de POD14 se combinaron en todos los grupos. Prueba T frente a vehículo a un punto de tiempo dado: * $p \leq 0,05$, 16.6.5 frente a distribución de datos del vehículo después del tratamiento (POD 17-POD31): $p \leq 0,001$ para niveles de dosis de 100, 200 y 300 nmoles en el modelo SNI, $p = 0,02$ para 200 moles y $p \leq 0,001$ para niveles de dosis de 300 nmoles en el modelo CCI; $n = 4$ ratas por grupo de prueba. El eje X muestra los días postoperatorios (POD).

Descripción detallada

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido comúnmente por los expertos habituales en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier método y material similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento pueden usarse en la práctica o el ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos. Para los fines de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

Definiciones

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Por "aproximadamente" se entiende una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía como mucho hasta un 30, un 25, un 20, un 15, un 10, un 9, un 8, un 7, un 6, un 5, un 4, un 3, un 2 o un 1 % a una cantidad de referencia, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud.

"Unión", como se usa en el contexto de factores de transcripción que se unen a agentes terapéuticos tales como señuelos oligonucleotídicos, se refiere a una interacción directa (por ejemplo, unión no covalente entre el factor de transcripción y el señuelo oligonucleotídico, incluyendo uniones de hidrógeno, uniones de van der Waals, etc.) entre un factor de transcripción y un señuelo oligonucleotídico. En consecuencia, un agente terapéutico tal como un oligonucleotido que no se une a un factor de transcripción no interactúa directamente con dicho factor de transcripción y viceversa.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a no ser que el contexto requiera lo contrario, las palabras "comprenden", "comprende", y "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos indicados pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.

Por "que consiste en" se entiende que incluye, y limitado a, lo que sea que sigue a la frase "que consiste en". De esta manera, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios y que no pueden estar presentes otros elementos. La expresión "que consiste esencialmente en" significa que incluye cualquier elemento enumerado después de la expresión y limitado a otros elementos que no interfieren ni contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación de los elementos enumerados. De esta manera, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son

opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o no materialmente a la actividad o acción de los elementos enumerados.

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

5 "Homología" se refiere al número porcentual de nucleótidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservadoras. La homología puede determinarse utilizando programas de comparación de secuencias tales como el Algoritmo de alineación por pares EMBOSS (disponible en el European Bioinformatics Institute (EBI)), el programa ClustalW (también disponible en el European Bioinformatics Institute (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) o GAP (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395). De esta manera, las secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en este documento podrían compararse mediante la inserción de espacios en la alineación, determinándose tales espacios, por ejemplo, por el algoritmo de comparación usado por GAP.

15 Por "aislado" se entiende material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un "polinucleótido aislado" u "oligonucleótido aislado", como se usan en el presente documento, pueden referirse a un polinucleótido que ha sido purificado o retirado de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se retira de las secuencias adyacentes al fragmento en el genoma. El término "aislamiento" en lo que se refiere a las células se refiere a la purificación de las células (por ejemplo, fibroblastos, linfoblastos) a partir de un sujeto fuente (por ejemplo, un sujeto con una enfermedad de repetición polinucleotídica). En el contexto de un ARNm o una proteína, "aislamiento" se refiere a la recuperación de ARNm o proteína de una fuente, por ejemplo, de células.

25 El término "modular" incluye un "aumento" o "disminución" de uno o más parámetros cuantificables, opcionalmente en una cantidad definida y/o estadísticamente significativa. Por "aumento" o "aumentar", "potencia" o "potenciar," o "estimula" o "estimular", se refiere generalmente a la capacidad de uno o más agentes tales como los señuelos oligonucleotídicos de producir o provocar una mayor respuesta fisiológica o celular en una célula o un sujeto, tales como la actividad de un factor de transcripción (por ejemplo, expresión génica), en relación con la respuesta causada por ningún agente o un compuesto de control. Las respuestas fisiológicas o celulares relevantes (*in vivo* o *in vitro*) será evidente para los expertos en la materia. Una cantidad o respuesta "aumentada" o "mejorada" puede ser "estadísticamente significativa" con respecto a una cantidad o respuesta producida por ningún agente o una composición de control y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros e intervalos entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8) la cantidad o respuesta producida por ningún agente o un compuesto de control. El término "reducir" o "inhibir" puede referirse generalmente a la capacidad de uno o más agentes tales como señuelos oligonucleotídicos para "disminuir" una respuesta fisiológica o celular relevante en una célula o un sujeto, tales como la actividad de un factor de transcripción (por ejemplo, expresión génica), un proceso fisiológico (por ejemplo, señalización nociceptiva) o un síntoma de una enfermedad o afección descrita en el presente documento (por ejemplo, dolor), en relación con la respuesta causada por ningún agente o un compuesto de control. Las respuestas fisiológicas o celulares relevantes (*in vivo* o *in vitro*) será evidente para los expertos en la materia y puede medirse de acuerdo con técnicas de rutina. Una "disminución" en una respuesta puede ser "estadísticamente significativa" en comparación con la respuesta producida por ningún agente o una composición de control y puede incluir un 1 %, un 2 %, un 3 %, un 4 %, un 5 %, un 6 %, un 7 %, un 8 %, un 9 %, un 10 %, un 11 %, un 12 %, un 13 %, un 14 %, un 15 %, un 16 %, un 17 %, un 18 %, un 19 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % de disminución, incluyendo todos los números enteros e intervalos intermedios.

50 La "modulación del nivel de expresión génica" incluye cualquier cambio en el nivel de expresión génica, incluyendo una inducción o activación (por ejemplo, un aumento en la expresión génica), una inhibición o supresión (por ejemplo, una disminución en la expresión génica) o una estabilización (por ejemplo, prevención de la regulación positiva o negativa de un gen que generalmente se produce en respuesta a un estímulo, tales como un estímulo inductor de dolor).

55 La "señalización nociceptiva" se refiere a los mecanismos moleculares y celulares implicados en la detección de un estímulo nocivo o de un estímulo potencialmente dañino, lo que lleva a la percepción del dolor. Algunos ejemplos particulares incluyen la síntesis y liberación de neurotransmisores, señalización inducida por neurotransmisores, despolarización de membrana y eventos de señalización intracelular e intercelular relacionados.

60 "Dolor" se refiere a una experiencia sensorial y emocional desagradable que se asocia a daño tisular real o potencial o se describe en dichos términos. Todas las diferentes manifestaciones y cualidades del dolor, incluyendo dolor mecánico (por ejemplo, inducido por un estímulo mecánico o por el movimiento del cuerpo), dolor inducido por la temperatura (por ejemplo, dolor inducido por calor, temperaturas cálidas y/o frías) y dolor inducido químicamente (por ejemplo, dolor inducido por un producto químico). En determinadas realizaciones, el dolor es crónico, subcrónico, agudo o subagudo. En determinadas realizaciones, el dolor presenta hiperalgesia (por ejemplo, una sensibilidad aumentada a un estímulo doloroso) y/o alodinia (por ejemplo, una respuesta dolorosa a un estímulo habitualmente no

doloroso). En determinadas realizaciones, el dolor es preexistente en un paciente. En otras realizaciones, el dolor es iatrogénico, inducido en un paciente (por ejemplo, dolor postoperatorio).

5 "Prevenir" o "prevención" incluye (1) una reducción en el riesgo de adquirir una enfermedad o trastorno (por ejemplo, provocar que al menos uno de los síntomas clínicos de una enfermedad no se desarrolle en un paciente que pueda estar expuesto o predispuesto a la enfermedad pero aún no experimenta o muestra síntomas de la enfermedad) y/o (2) una reducción en la probabilidad de gravedad de un síntoma asociado a una enfermedad o trastorno (por ejemplo, reducir la probabilidad de gravedad de al menos uno de los síntomas clínicos de una enfermedad en un paciente que puede estar expuesto o predispuesto a la enfermedad pero que aún no experimenta o muestra síntomas de la enfermedad).

15 Las frases "identidad de secuencia" o, por ejemplo, que comprende una "secuencia un 50 % idéntica a", como se usan en el presente documento, se refieren al grado en que las secuencias son idénticas en una base nucleótido por nucleótido en una ventana de comparación. De esta manera, puede calcularse un "porcentaje de identidad de secuencia" comparando dos secuencias alineadas de manera óptima sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C o G) tiene lugar en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. En algunas realizaciones, La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede llevarse a cabo usando el algoritmo de alineación por pares EMBOSS (disponible del European Bioinformatics Institute (EBI)), el programa ClustalW (también disponible en el European Bioinformatics Institute (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). En determinadas realizaciones, la alineación de secuencias para alinear una ventana de comparación se realiza contra toda la longitud de la secuencia de referencia (por ejemplo, del Listado de Secuencias). En algunas realizaciones, la alineación de secuencias para alinear una ventana de comparación se realiza contra una parte de la secuencia de referencia, por ejemplo, aproximadamente, al menos aproximadamente, o no más de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 nucleótidos contiguos de la secuencia de referencia.

30 Un "sujeto" o un "sujeto en necesidad del mismo" o un "paciente" incluye un sujeto mamífero tales como un primate o un sujeto humano.

35 "Subagudo" se refiere a un período de tiempo que comprende horas (por ejemplo, 1-24 horas, incluyendo todos los números enteros e intervalos intermedios).

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

40 "Tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en algunas realizaciones, a mejorar la enfermedad o trastorno (por ejemplo, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de los mismos). En algunas realizaciones, "tratar" o "tratamiento" se refiere a mejorar al menos un parámetro físico y/o biológico, que puede no ser discernible por el paciente. En determinadas realizaciones, "tratar" o "tratamiento" se refiere a inhibir la enfermedad o trastorno, ya sea física, (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico) o ambos. En algunas realizaciones, "tratar" o "tratamiento" se refiere a retrasar la aparición de la enfermedad o trastorno. "Tratamiento" o "profilaxis" no necesariamente indica erradicación completa, cura o prevención de la enfermedad o afección, o síntomas asociados de las mismas.

50 "Cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administran a un paciente, es suficiente para efectuar dicho tratamiento de una enfermedad o afección particular. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, la enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la edad, el peso, etc., del paciente a tratar.

55 **Señuelos oligonucleotídicos y otros agentes terapéuticos**

60 Las realizaciones de la presente invención se refieren generalmente a agentes terapéuticos que inhiben la unión de al menos dos factores de transcripción a al menos uno de sus sitios de unión de transcripción (endógenos). Algunos ejemplos particulares incluyen señuelos oligonucleotídicos de acuerdo con la reivindicación 1 y de ese modo alteran la capacidad de los factores de transcripción para modular la expresión génica. En determinadas realizaciones, los factores de transcripción son KLF6 y es uno o más miembros de la familia de factores de transcripción similares a Krüppel (KLF), ejemplos de los cuales incluyen KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF7, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF16 y KLF17.

65 De esta manera, ciertas realizaciones incluyen un señuelo oligonucleotídico que comprende dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.) sitios de unión del factor de transcripción, donde un primer sitio de unión del factor de transcripción se

une a KLF6 y un segundo sitio de unión al factor de transcripción se une a un factor de transcripción seleccionado del grupo que consiste en KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF7, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF16 y KLF17. Los ejemplos particulares de combinaciones de sitios de unión del factor de transcripción incluyen aquellos que se unen a KLF6/KLF9 o KLF6/KLF9/KLF15.

5 El término "oligonucleótido" incluye cualquier polímero que contiene ácidos nucleicos bicatenario o sustancialmente bicatenario, generalmente de menos de aproximadamente 200 nucleótidos (o 100 pares de bases) e incluyendo, pero no limitado a, ADN, ARN e híbridos ARN-ADN.

10 En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene aproximadamente, al menos aproximadamente o no más de aproximadamente, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 nucleótidos de longitud (incluyendo todos los números enteros e intervalos intermedios) y opcionalmente comprende aproximadamente, al menos aproximadamente o no más de aproximadamente, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 nucleótidos de bases apareadas (incluyendo todos los números enteros e intervalos intermedios). En realizaciones particulares, el señuelo oligonucleotídico tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 pares de bases.

20 En algunas realizaciones, el señuelo oligonucleotídico comprende un primer sitio de unión al factor de transcripción y un segundo sitio de unión a la transcripción, opcionalmente en donde el primer sitio de unión a la transcripción y el segundo sitio de unión a la transcripción se solapan.

25 En realizaciones particulares, el primer sitio de unión del factor de transcripción se une a KLF6 y el segundo sitio de unión al factor de transcripción se une a KLF9.

También se incluyen señuelos oligonucleotídicos que tienen un primer sitio de unión al factor de transcripción, un segundo sitio de unión del factor de transcripción y un tercer sitio de unión del factor de transcripción, opcionalmente en donde el primero, el segundo y el tercer sitios de unión de transcripción se superponen. En realizaciones específicas, el primer sitio de unión del factor de transcripción se une a KLF6, el segundo sitio de unión del factor de transcripción se une a KLF9 y el tercer sitio de unión al factor de transcripción se une a KLF15.

30 En determinadas realizaciones, el señuelo oligonucleotídico (por ejemplo, la cadena sensorial del señuelo) comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia (por ejemplo, secuencia bicatenaria) representada por la Fórmula 1 o la Fórmula 2, mostradas en la Tabla 1 a continuación, o una variante de la misma, o un complemento de la misma (por ejemplo, la secuencia antisentido).

Nombre de la secuencia	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO:
Fórmula 1	a ₁ t ₂ c ₃ c ₄ T ₅ T ₆ Y ₇ G ₈ M ₉ M ₁₀ T ₁₁ Y ₁₂ Y ₁₃ K ₁₄ Y ₁₅ C ₁₆ N ₁₇ H ₁₈ h ₁₉ n ₂₀ n ₂₁ v ₂₂ n ₂₃ n ₂₄ y ₂₅ m ₂₆ h ₂₇ W ₂₈ b ₂₉ V ₃₀ a ₃₁ W ₃₂	1
Fórmula 2	t ₁ g ₂ t ₃ k ₄ b ₅ K ₆ K ₇ D ₈ D ₉ V ₁₀ D ₁₁ N ₁₂ S ₁₃ D ₁₄ N ₁₅ B ₁₆ N ₁₇ N ₁₈ d ₁₉ v ₂₀ m ₂₁ b ₂₂ v ₂₃ m ₂₄ h ₂₅ f ₂₆ m ₂₇ a ₂₈	2

en donde S es G o C; W es A o T; Y es T o C; D es A, G o T; B es C, G o T; K es T o G; M es C o A; H es C, T o A; V es C, G o A; R es A o G; y N es cualquier nucleótido, en donde las letras minúsculas pueden estar presentes o ausentes, y en donde los números en el subíndice representan la posición de un nucleótido en la secuencia.

40 En realizaciones específicas, el señuelo oligonucleotídico (por ejemplo, la cadena sensorial del señuelo) comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia en la Tabla 2 a continuación, o una variante de la misma, o un complemento de la misma (por ejemplo, la secuencia antisentido).

Nombre de la secuencia	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO:
16.0	TTTGCCCTCCTTCGATCCC	3
16.1	ATCCTTTGCCTCCTTCGA	4
16.2	ATCCTTTGCCTCCTTCCCTTTGCCTCCTTCAA	5

(continuación)

Tabla 2		
Nombre de la secuencia	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO:
16.3	CCTTTGCCTCCTTCCCTTTGCCTCCTTC	6
16.4	ATCCTTTGCCTCCTTCGAAGGAGGCAAAGGAT	7
16.5	ATCCTTTGCCTCCTTCCCTTTGCCTCCTTCAA	8
16.6	ATCCTTTGCCTCCTTCGCCTCCTTCAA	9
16.7	CCTTTGCCTCCTTCGCCTCCTTC	10
16.8	ATCCTTTGCCTCCTTCTCCTTCAA	11
16.9	ATCCTTTGCCTTTGCCTCCTTCAA	12
16.10	CCTTTGCCTTTGCCTCCTTC	13
17.0	TGTTTGGGAGAGCTT	14
17.1	GCTTTGGGAGGATAC	15
17.2	TGGGAGAGCTTTGGGA	16
17.3	TGTTTGGGAGATTTGGGAGGATAC	17
17.4	TTTGGGAGATTTGGGAGGAT	18
17.5	TGTTTGGGAGAATCCTCCCAAAGC	19
17.6	TTTGGGAGAATCCTCCCAA	20
17.7	TGTTTGGGAGAGCTATCCTCCCAAAGC	21
17.8	TTTGGGAGAGCTATCCTCCCAA	22
17.9	TGTTTGGGAGAGGGAGGATAC	23
17.10	TGTTTGGGTTTGGGAGGATAC	24
16.6.2	CCTTTGCCTCCTTCGCCTCCTTCAA	25
16.6.3	TCCTTTGCCTCCTTCGCCTCCTTCA	26
16.6.4	CCTTTGCCTCCTTCGCCTCCTTCA	27
16.6.5	ATCCTTCGCCTCCTTCAA	28
16.6.6	ATCCTTCGCCTTCGCCTCCTTCAA	29
16.6.7	ATCCTTCGCCTCCTTCGCCTCCTTCAA	30
17.5.1	TGTTTGGGAGAATCCTCCCAA	31
17.5.2	TTTGGGAGAATCCTCCCAAAGC	32
17.5.3	GTTTGGGAGAATCCTCCCAAAG	33
T16.6-T17.5 Fu2	ATCCTTCGAATCCTTCCCAAAGC	35

5 En las fórmulas y secuencias descritas en el presente documento, "A" es un nucleótido de adenina, "C" es un nucleótido de citosina, "G" es un nucleótido de guanina, "T" es un nucleótido de timina, y "N" puede ser cualquier nucleótido, preferentemente A, C, G o T. Aunque las fórmulas y secuencias muestran una sola cadena, debe entenderse que se incluye una cadena antisentido complementaria como parte de la estructura de los señuelos oligonucleotídicos. En determinadas realizaciones, una cualquiera o más "T" puede ser un "U" o nucleótido de uracilo.

10 Ciertos señuelos oligonucleotídicos de esta manera comprenden, consisten o consiste esencialmente en una secuencia en la Tabla 1 o en la Tabla 2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-33 y 35) o una variante o porción o porciones contiguas o no contiguas de la misma. Por ejemplo, ciertos señuelos oligonucleotídicos comprenden aproximadamente

o al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 nucleótidos contiguos o no contiguos de cualquiera de las secuencias de direccionamiento en la Tabla 1 o la Tabla 2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-33 y 35) y que se unen a KLF6 y uno o más factores de transcripción KLF descritos en el presente documento (por ejemplo, KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF7, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF16, KLF17). Para porciones no contiguas, los nucleótidos que intervienen pueden eliminarse o sustituirse con un nucleótido diferente, o pueden añadirse nucleótidos que intervienen. Algunos ejemplos adicionales de variantes incluyen señuelos oligonucleotídicos que tienen al menos o al menos aproximadamente un 70 % de identidad de secuencia u homología (por ejemplo, un 70 %, un 71 %, un 72 %, un 73 %, un 74 %, un 75 %, un 76 %, un 77 %, un 78 %, un 79 %, un 80 %, un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad u homología de secuencia) a toda la longitud o una porción contigua de una secuencia en la Tabla 1 o la Tabla 2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-33 y 35) y que se unen a KLF6 y uno o más factores de transcripción KLF descritos en el presente documento (por ejemplo, KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF7, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF16, KLF17). En algunas realizaciones, la porción contigua tiene aproximadamente, al menos aproximadamente o no más de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 nucleótidos contiguos de una secuencia en la Tabla 1 o la Tabla 2 (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-33 y 35).

Un señuelo oligonucleotídico que tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 %) de "identidad de secuencia" con respecto a otra secuencia significa que, cuando están alineadas, ese porcentaje determina el nivel de correspondencia de la disposición de bases al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad pueden determinarse usando cualquier programa de software adecuado conocido en la técnica que permita la alineación local. En algunas realizaciones, tales programas incluyen, entre otros, el algoritmo de alineación por pares EMBOSS (disponible en el European Bioinformatics Institute (EBI)), el programa ClustalW (también disponible en el European Bioinformatics Institute (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).

Como se ha indicado anteriormente, un experto en la materia reconocerá que las secuencias abarcadas por la invención incluyen aquellas que son completa o parcialmente complementarias a las secuencias descritas en el presente documento, incluyendo aquellos que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia ejemplificada 1-33 y 35 (por ejemplo, Tablas 1 y 2; SEQ ID NO: 1-33 y 35). Un ácido nucleico es hibridable a otro ácido nucleico cuando una forma monocatenaria del ácido nucleico puede hibridarse con el otro ácido nucleico monocatenario en condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica de la solución. Las condiciones de hibridación son bien conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la hibridación puede producirse durante una lenta disminución de la temperatura desde una temperatura desnaturalizante (por ejemplo, 100 °C) a temperatura ambiente en un disolvente que contiene sal (por ejemplo, tampón Tris-EDTA).

También se incluyen poblaciones de señuelos oligonucleotídicos, incluyendo aquellos que proporcionan una capacidad de unión de transcripción total a uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, etc.) factores de transcripción de KLF (por ejemplo, KLF6 + KLF9), que se define con respecto a una cantidad predeterminada. En algunas realizaciones, la capacidad total de unión a la transcripción es aproximadamente igual a, menor que o mayor que un nivel o cantidad predeterminados. Puede establecerse un "nivel predeterminado" para definir una capacidad de unión total utilizando diversas técnicas, tales como ensayos ELISA convencionales (véanse los Ejemplos).

En algunas realizaciones, la población de señuelos oligonucleotídicos proporciona una capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9 que es igual o mayor que una cantidad predeterminada. En algunos casos, la cantidad predeterminada es un valor de densidad óptica (o una unidad de medida ELISA convencional equivalente, por ejemplo, fluorescencia) de aproximadamente 0,2 DO₄₅₀ o más alto medido en un ensayo ELISA convencional (véanse los ejemplos). En algunas realizaciones, la cantidad predeterminada o la capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9 es igual o mayor que aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0 o más alto (incluyendo todos los intervalos y números enteros intermedios) basándose en los valores de DO₄₅₀ (o unidades de medida ELISA convencionales equivalentes) de un ensayo ELISA convencional.

En algunas realizaciones, la población de señuelos oligonucleotídicos proporciona una capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9 que es igual o menor que una cantidad predeterminada. En algunas realizaciones, la cantidad predeterminada o la capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9 se indica como 1/(KLF6 + KLF9) basándose en un valor de densidad óptica (o una unidad de medida ELISA convencional equivalente, por ejemplo, fluorescencia) de un ensayo ELISA convencional (véanse los Ejemplos). Por ejemplo, en realizaciones particulares, la capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9 (como se indica por 1/(KLF6 + KLF9)) es aproximadamente 5 o menos en función de valores de DO₄₅₀ (o una unidad de medida ELISA convencional equivalente) de un ensayo ELISA convencional. En algunas realizaciones, la capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9 (según lo indicado por 1/(KLF6 + KLF9)) es igual o menor que aproximadamente 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1 o menos (incluidos todos los intervalos y números enteros intermedios) basados en valores de DO₄₅₀ (o una unidad de medida ELISA convencional equivalente) de un ensayo ELISA convencional.

La población de señuelos oligonucleotídicos puede estar compuesta por un señuelo oligonucleotídico o una combinación de dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.) señuelos oligonucleotídicos. En determinadas realizaciones, la población de señuelos oligonucleotídicos está compuesta por un señuelo oligonucleotídico de acuerdo con la reivindicación 1. En algunas realizaciones, la población de señuelos oligonucleotídicos comprende un señuelo oligonucleotídico con la combinación de al menos tres (por ejemplo, 3, 4, 5, etc.) sitios de unión del factor de transcripción, que se unen al mismo o diferentes (por ejemplo, tres o al menos tres) factores de transcripción KLF. Otras combinaciones serán evidentes para los expertos en la materia.

Generalmente, los señuelos oligonucleotídicos descritos en el presente documento pueden usarse para unir y, por ejemplo, inhibir de esta manera, Los factores de transcripción que modulan la expresión de genes implicaron la señalización nociceptiva y/o la percepción del dolor de un sujeto (por ejemplo, el paciente). Un señuelo oligonucleotídico que está diseñado para unirse a un factor de transcripción específico tiene una secuencia de ácido nucleico que imita la secuencia de ADN genómico endógeno normalmente unida por el factor de transcripción. En consecuencia, en algunos aspectos los señuelos oligonucleotídicos descritos en el presente documento inhiben una etapa necesaria para la expresión y regulación génica. Además, los señuelos oligonucleotídicos desvelados en el presente documento pueden unirse a uno o varios factores de transcripción diferentes.

El término oligonucleótido abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN incluyendo, pero no limitado a, 2,6-diaminopurina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, ácido uracil-5-oxiacético, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, metiléster de ácido N-uracil-5-oxiacético, queosina, 2-tiocitosina, 5-bromouracilo, metilfosfonato, fosforoditioato, ormacetil, 3'-tioformacetil, esqueleto de nitróxido, sulfona, sulfamato, derivados morfolino, derivados de ácido nucleico bloqueado (LNA) y/o derivados de ácido nucleico peptídico (PNA). En algunas realizaciones, el oligonucleótido se compone de dos oligonucleótidos monocatenarios complementarios que se hibridan juntos. En algunas realizaciones, el oligonucleótido está compuesto por un oligonucleótido monocatenario que forma pares de bases intramoleculares para crear una estructura sustancialmente bicatenaria.

En algunas realizaciones, los señuelos oligonucleotídicos desvelados en el presente documento se modifican químicamente por métodos bien conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, incorporación de fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforamidatos, carbonato, tioéter, siloxano, enlaces acetamidato o éster de carboximetilo entre nucleótidos), por ejemplo, para evitar la degradación por nucleasas dentro de las células y/o en fluidos extracelulares (por ejemplo, suero, líquido cefalorraquídeo). En algunas realizaciones, los señuelos oligonucleotídicos están diseñados para formar estructuras de horquilla y mancuernas, que también puede prevenir o dificultar la degradación de nucleasas. En realizaciones particulares, los señuelos oligonucleotídicos se insertan como una porción de un plásmido más grande capaz de mantenimiento episómico o replicación constitutiva en la célula diana para proporcionar a más largo plazo, exposición intracelular mejorada a la secuencia señuelo y/o reducir su degradación. En consecuencia, cualquier modificación química o alteración estructural conocida en la técnica para mejorar la estabilidad de los oligonucleótidos está dentro del alcance de la presente divulgación. En algunas realizaciones, los señuelos oligonucleotídicos desvelados en el presente documento pueden estar unidos, por ejemplo, a polímeros de polietilenglicol, péptidos (por ejemplo, un dominio de translocación de proteínas) o proteínas que mejoran el efecto terapéutico de los señuelos oligonucleotídicos. Tales señuelos oligonucleotídicos modificados pueden atravesar preferentemente la membrana celular.

Los señuelos oligonucleotídicos descritos en el presente documento generalmente pueden utilizarse como ácido libre o base libre. Como alternativa, los señuelos oligonucleotídicos pueden usarse en forma de sales de adición de ácido o base. Las sales de adición de ácido de los compuestos amino libres de la presente invención pueden prepararse por métodos bien conocidos en la técnica y pueden formarse a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen ácido maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, succínico, metanosulfónico, acético, trifluoroacético, oxálico, propiónico, tartárico, salicílico, glucónico, láctico, mandélico, cinámico, aspártico, esteárico, palmítico, glicólico, glutámico y bencenosulfónico.

Los ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico y nítrico. Las sales de adición de bases incluyen aquellas sales que se forman con el anión carboxilato e incluyen sales formadas con cationes orgánicos e inorgánicos, como los elegidos entre los metales alcalinos y alcalinotérreos (por ejemplo, litio, sodio, calcio, potasio, magnesio, bario y calcio), así como el ion amonio y derivados sustituidos del mismo (por ejemplo, dibencilamonio, bencilamonio, 2-hidroxiethylamonio y similares). De esta manera, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" pretende abarcar cualquiera y todas las formas de sal aceptables.

Los profármacos también están incluidos. Los profármacos son vehículos unidos covalentemente que liberan un compuesto *in vivo* cuando dicho profármaco se administra a un paciente. Los profármacos generalmente se preparan modificando grupos funcionales de tal manera que la modificación se escinde, ya sea mediante manipulación rutinaria o *in vivo*, produciendo el compuesto parental. Los profármacos incluyen, por ejemplo, compuestos de la presente invención en donde los grupos hidroxilo, amina o sulfhidrilo están unidos a cualquier grupo que, cuando se administran a un paciente, se escinde para formar los grupos hidroxilo, amina o sulfhidrilo. De esta manera, Los ejemplos representativos de profármacos incluyen derivados de acetato, formiato y benzoato de grupos funcionales alcohol y

amina de los señuelos oligonucleotídicos descritos en el presente documento. Además, en el caso de un ácido carboxílico (-COOH), pueden emplearse ésteres, tales como ésteres metílicos, ésteres etílicos y similares.

5 En determinadas realizaciones, los señuelos oligonucleotídicos se proporcionan como sales, hidratos, solvatos o derivados de N-óxidos. En determinadas realizaciones, los señuelos oligonucleotídicos se proporcionan en solución (por ejemplo, una solución salina que tiene un pH fisiológico) o en forma liofilizada. En algunas realizaciones, los señuelos oligonucleotídicos se proporcionan en liposomas.

10 Los señuelos oligonucleotídicos descritos en el presente documento pueden fabricarse mediante métodos convencionales conocidos en la técnica y, por lo tanto, están bien dentro del conocimiento del experto en la materia. La actividad de los señuelos oligonucleotídicos y las variantes de los mismos pueden analizarse de acuerdo con las técnicas de rutina en la técnica (véanse los Ejemplos). En realizaciones particulares, el señuelo oligonucleotídico es un oligonucleótido sintético (es decir, un oligonucleótido no natural sintetizado químicamente).

15 También se desvelan agentes terapéuticos no basados en oligonucleótidos, incluyendo aquellos que inhiben la unión de un factor de transcripción a su sitio de unión a la transcripción endógeno, por ejemplo, uniéndose específicamente a un factor de transcripción KLF, o uniéndose específicamente a su sitio de unión del factor de transcripción endógeno (por ejemplo, imitando el sitio de unión del factor de transcripción KLF). Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen agentes de unión tales como anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos, adnectinas, anticalinas, Darpinas, anáfonos y aptámeros, que exhiben especificidad de unión por un factor de transcripción KLF, por ejemplo, un dominio del sitio de unión del factor de transcripción del factor KLF, o que exhiben especificidad de unión para un sitio de unión del factor de transcripción del KLF endógeno.

25 Se dice que un agente de unión "exhibe especificidad de unión por", "se unen específicamente a", un polipéptido KLF (por ejemplo, un dominio de unión al factor de transcripción del mismo), o un sitio de unión al factor de transcripción KLF endógeno (por ejemplo, secuencia de ADN bicatenario), si reacciona a un nivel detectable (dentro de, por ejemplo, un ensayo ELISA) con el polipéptido o ácido nucleico, y no reacciona de manera detectable de manera significativa (por ejemplo, estadísticamente significativa) con estructuras no relacionadas en condiciones similares.

30 El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina ya sea producida de forma natural o parcial o totalmente sintética. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que sea, o sea homólogo a, un dominio de unión a antígeno. Los anticuerpos injertados con CDR también están contemplados por este término. Las expresiones "porción de unión a antígeno de un anticuerpo", "fragmento de unión a antígeno", "dominio de unión a antígeno", "fragmento de anticuerpo" o un "fragmento funcional de un anticuerpo" se usan
35 indistintamente en la presente invención para incluir uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (véase, por ejemplo, Holliger y col., Nature Biotech. 23 (9): 1126-1129 (2005)).

Los anticuerpos pueden prepararse mediante cualquiera de diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido de interés, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976 y las mejoras a la misma. También se incluyen métodos que utilizan animales transgénicos tales como ratones para expresar anticuerpos humanos. Véase, por ejemplo, Neuberger et al., Nature Biotechnology 14:826, 1996; Lonberg et al., Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101, 1994; y Lonberg et al., Internal Review of Immunology 13:65-93, 1995. Algunos ejemplos particulares incluyen la plataforma VELOCIMMUNE® de REGENEREX® (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 6.596.541). Los anticuerpos también pueden generarse o identificarse mediante el uso de bibliotecas de exhibición de fagos o de levaduras (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 7.244.592; Chao et al., Nature Protocols. 1:755-768, 2006).

50 Como se ha indicado anteriormente, Los "péptidos" que inhiben la unión de un factor de transcripción KLF a su sitio de unión del factor de transcripción se incluyen como agentes de unión. El término péptido se refiere normalmente a un polímero de restos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos de los mismos. El término "péptido" se refiere a polipéptidos relativamente cortos, incluyendo péptidos que consisten en aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más aminoácidos, incluyendo todos los números enteros e intervalos (por ejemplo, 5-10, 8-12, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50) entremedias y que, por ejemplo, se unen a una o más regiones de un factor de transcripción KLF, por ejemplo, un dominio de unión del factor de transcripción, o imitan el factor de transcripción KLF uniéndose a al menos uno de sus sitios de unión del factor de transcripción endógeno. Los péptidos pueden estar compuestos por aminoácidos naturales y/o aminoácidos no naturales.

60 En el presente documento se desvelan moléculas pequeñas que inhiben la unión de un factor de transcripción KLF a su sitio de unión del factor de transcripción. Una "molécula pequeña" se refiere a un compuesto orgánico o inorgánico que es de origen sintético o biológico, pero normalmente no es un polímero. Los compuestos orgánicos incluyen una gran clase de compuestos químicos cuyas moléculas contienen carbono, excluyendo normalmente aquellos que contienen solo carbonatos, óxidos sencillos de carbono o cianuros. Un "polímero" se refiere generalmente a una
65 molécula grande o macromolécula compuesta por unidades estructurales repetitivas, que están normalmente conectadas por enlace químico covalente. En determinadas realizaciones, una molécula pequeña tiene un peso

molecular de menos de 1000-2000 Dalton, normalmente entre aproximadamente 300 y 700 Dalton, e incluye aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 o 2000 Dalton.

5 Los aptámeros que inhiben la unión de un factor de transcripción KLF a su sitio de unión al factor de transcripción también se incluyen como agentes de unión (véase, por ejemplo, Ellington et al., *Nature*. 346, 818-22, 1990; y Tuerk et al., *Science*. 249, 505-10, 1990). Los ejemplos de aptámeros incluyen aptámeros de ácido nucleico (por ejemplo, aptámeros de ADN, aptámeros de ARN) y aptámeros de péptido. Los aptámeros de ácido nucleico se refieren generalmente a especies de ácido nucleico con estructuras secundarias y terciarias que se han diseñado mediante
10 rondas repetidas de selección *in vitro* o método equivalente, tales como SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial), para unirse a diversas dianas moleculares tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos e incluso células, tejidos y organismos. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 6.376.190; y 6.387.620. Por lo tanto, se incluyen aptámeros de ácido nucleico que se unen a una o más regiones de un factor de transcripción KLF, por ejemplo, un dominio de unión al factor de transcripción, o que se une a al menos uno de sus
15 sitios de unión al factor de transcripción endógeno.

Los aptámeros peptídicos normalmente incluyen un bucle peptídico variable unido en ambos extremos a un andamio de proteínas, una restricción estructural doble que normalmente aumenta la afinidad de unión del aptámero peptídico a niveles comparables a los de un anticuerpo (por ejemplo, en el intervalo nanomolar).

20 La longitud del bucle variable puede estar compuesta por aproximadamente 10-20 aminoácidos (incluyendo todos los números enteros intermedios) y el andamio puede incluir cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad y compacidad. Ciertos aptámeros a modo de ejemplo pueden utilizar la proteína bacteriana Tiorredoxina-A como proteína de armazón, insertándose el bucle variable dentro del sitio activo reductor (bucle -Cys-Gly-Pro-Cys-
25 en la proteína silvestre), siendo capaces las dos cadenas laterales de cisteína de formar un puente disulfuro. Se describen métodos para identificar aptámeros peptídicos, por ejemplo, en la Solicitud de EE.UU. N.º 2003/0108532. Por lo tanto, se incluyen aptámeros peptídicos que se unen a una o más regiones de un factor de transcripción KLF, por ejemplo, un dominio de unión al factor de transcripción, o que se une a al menos uno de sus sitios de unión al factor de transcripción endógeno. La selección del aptámero peptídico puede realizarse usando diferentes sistemas
30 conocidos en la técnica, incluyendo el sistema de levadura de dos híbridos.

También se describen ADNECTINS™, AVIMERS™ y ANTICALINAS que se unen específicamente al factor de transcripción KLF. ADNECTINS™ se refiere a una clase de productos biológicos dirigidos derivados de la fibronectina humana, una proteína extracelular abundante que se une de forma natural a otras proteínas. Véase, por ejemplo, la
35 Solicitud de EE.UU. N.º 2007/0082365; 2008/0139791; y 2008/0220049. ADNECTINS™ normalmente consiste en un esqueleto de fibronectina natural, así como los dominios de direccionamiento múltiple que una porción específica de fibronectina humana. Los dominios de orientación pueden diseñarse para permitir que una Adnectin™ reconozca específicamente una diana terapéutica de interés, tales como un polipéptido del factor de transcripción KLF, o un fragmento del mismo, por ejemplo, un dominio de unión al factor de transcripción, o al menos uno de sus sitios de
40 unión al factor de transcripción endógeno.

AVIMERS™ se refiere a proteínas o péptidos de unión multiméricos diseñados mediante redistribución de exones *in vitro* y visualización de fagos. Se enlazan múltiples dominios de unión, dando como resultado una mayor afinidad y especificidad en comparación con los dominios de inmunoglobulina de epítopos individuales. Véase, por ejemplo,
45 Silverman et al., *Nature Biotechnology*. 23:1556-1561, 2005; la Patente de EE.UU. N.º 7.166.697; y las Solicitudes de EE.UU. N.º 2004/0175756, 2005/0048512, 2005/0053973, 2005/0089932 y 2005/0221384.

También se describen proteínas de repetición de anquirina diseñadas (DARPin), que incluyen una clase de proteínas distintas de inmunoglobulinas que pueden ofrecer ventajas sobre los anticuerpos para la unión a dianas en el
50 descubrimiento de fármacos y el desarrollo de fármacos. Entre otros usos, Las DARPin son ideales para la formación de imágenes *in vivo* o el suministro de toxinas u otras cargas útiles terapéuticas debido a sus propiedades moleculares favorables, incluyendo tamaño pequeño y alta estabilidad. La producción de bajo coste en bacterias y la rápida generación de muchas DARPin específicas de diana hacen que el enfoque DARPin sea útil para el descubrimiento de fármacos. Adicionalmente, las DARPin pueden generarse fácilmente en formatos multiespecíficos, ofreciendo el
55 potencial para dirigir una DARPin efectora a un órgano específico o para dirigir múltiples polipéptidos/ácidos nucleicos con una molécula compuesta por varias DARPin. Véase, por ejemplo, Stumpp et al., *Curr Opin Drug Discov Devel*. 10:153-159, 2007; Solicitud de EE.UU. N.º 2009/0082274; y PCT/EP2001/10454.

Los agentes aglutinantes incluyen "monocuerpos", que normalmente utilizan el 10º dominio de fibronectina tipo III de fibronectina humana (FNfn10) como un andamio para mostrar múltiples bucles de superficie para la unión a la diana. FNfn10 es una proteína pequeña (94 residuos) con una estructura de sándwich β similar al pliegue de inmunoglobulina. Es altamente estable sin enlaces disulfuro o iones metálicos, y puede expresarse en la forma plegada correctamente a un alto nivel en bacterias. El andamio FNfn10 es compatible con prácticamente cualquier tecnología de visualización. Véase, por ejemplo, Batori et al., *Protein Eng*. 15:1015-20, 2002; y Wojcik et al., *Nat Struct Mol Biol*., 2010; y la Patente
65 de EE.UU. N.º 6.673.901.

Las anticalinas se refieren a una clase de miméticos de anticuerpos, que normalmente se sintetizan a partir de lipocalinas humanas, una familia de proteínas de unión con una región de bucle hipervariable soportada por un marco estructuralmente rígido. Véase, por ejemplo, Solicitud de EE.UU. N.º 2006/0058510. Las anticalinas normalmente tienen un tamaño de aproximadamente 20 kDa. Las anticalinas pueden caracterizarse por una estructura de barril formada por ocho cadenas β antiparalelas (un andamio de barril β estable) que están conectadas por pares por cuatro bucles de péptidos y una hélice α unida. En determinados aspectos, las desviaciones conformacionales para lograr la unión específica se realizan en la región o regiones de bucle hipervariable. Véase, por ejemplo, Skerra, FEBS J. 275:2677-83, 2008.

Los agentes terapéuticos, por ejemplo, agentes de unión, descritos en el presente documento que inhiben la unión de un factor de transcripción KLF a su sitio o sitios de unión del factor de transcripción endógeno, puede usarse en cualquiera de los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

Métodos de uso

En el presente documento se describen métodos para el uso de agentes terapéuticos descritos en el presente documento (por ejemplo, señuelos oligonucleotídicos), que inhiben o reducen de otro modo la unión de KLF6 y uno o más factores de transcripción de KLF a sus sitios de unión de transcripción endógenos, y composiciones relacionadas, para modular la actividad de KLF6 y uno o más factores de transcripción de KLF seleccionados del grupo que consiste en KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF16 y KLF17.

Los métodos pueden usarse, por ejemplo, para tratar el dolor en un sujeto, para modular la transcripción de un gen presente en una célula implicada en la señalización nociceptiva, para modular la transcripción de un gen presente en una célula implicada en la percepción del dolor en un sujeto y/o para modular la señalización nociceptiva en una célula, por ejemplo, en un sujeto. Tales métodos pueden practicarse *in vitro*, por ejemplo, poniendo en contacto una célula con un agente terapéutico (por ejemplo, señuelo oligonucleotídico) o composición relacionada, o *in vivo*, por ejemplo, administrando a un sujeto que lo necesite un agente terapéutico (por ejemplo, señuelo oligonucleotídico) o composición relacionada. El agente terapéutico puede ser un señuelo oligonucleotídico o una población de señuelos oligonucleotídicos, como se describe en el presente documento.

Aquí se describen métodos para tratar el dolor en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico inhibe la unión de un factor de transcripción a su sitio de unión a la transcripción, y en donde el primer factor de transcripción es KLF6 y el segundo factor de transcripción se selecciona del grupo que consiste en KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF16 y KLF17. En el presente documento se describen métodos para tratar el dolor en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más señuelos oligonucleotídicos descritos en el presente documento. Se describen métodos para prevenir el dolor en un sujeto, por ejemplo, métodos profilácticos para tratar o controlar el dolor. Dichos métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesite (por ejemplo, un paciente con probabilidad de desarrollar dolor, por ejemplo, dolor postoperatorio), una cantidad terapéuticamente eficaz de un señuelo oligonucleotídico descrito en el presente documento.

Como se desvela en el presente documento, un señuelo oligonucleotídico y/o composición farmacéutica que comprende el mismo puede administrarse a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, tales como un animal (por ejemplo, un ave, mamífero, primate, paciente humano), que sufre o espera sufrir dolor. Los ejemplos particulares de dolor incluyen, dolor mecánico (por ejemplo, hiperalgesia mecánica y/o alodinia), dolor químico, dolor por temperatura, dolor crónico, dolor subcrónico, dolor agudo, dolor subagudo, dolor inflamatorio, dolor neuropático, dolor muscular, dolor esquelético, dolor postoperatorio, dolor radicular, dolor de espalda, dolor por artritis y/o dolor por diabetes. Como se desvela en el presente documento, los señuelos oligonucleotídicos y/o las composiciones farmacéuticas de los mismos se administran a un paciente, tales como un animal, como una medida preventiva contra el dolor incluyendo, pero no limitado a, cualquiera o más de los ejemplos anteriores de dolor. El dolor puede ser dolor postoperatorio, dolor crónico, dolor inflamatorio, dolor neuropático, dolor muscular y/o dolor esquelético. En determinadas realizaciones, los señuelos oligonucleotídicos y/o las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden usarse para la prevención de una faceta del dolor mientras se trata simultáneamente otro síntoma de dolor.

En realizaciones particulares, el dolor es dolor crónico. En algunas realizaciones, el dolor es dolor neuropático, por ejemplo, dolor neuropático crónico y/o dolor neuropático (crónico) asociado a inflamación (por ejemplo, neuroinflamación). En determinadas realizaciones, el dolor está asociado a inflamación, por ejemplo, dolor crónico asociado a inflamación, dolor neuropático crónico asociado a inflamación. En algunas realizaciones, el dolor está asociado al sistema nervioso central y/o un trastorno visceral. En algunas realizaciones, el dolor es dolor posquirúrgico.

Como se desvela en el presente documento, el agente terapéutico (por ejemplo, señuelo oligonucleotídico, población de señuelos oligonucleotídicos), o composición que se administra para tratar, manejar y/o prevenir el dolor proporciona una capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9 que es igual o superior a una cantidad predeterminada, por ejemplo, un valor de densidad óptica de aproximadamente 0,2 DO_{450} (o nivel de unión comparable usando unidades de medida ELISA convencionales equivalentes) en un ensayo ELISA convencional (véase arriba).

En algunas divulgaciones, la capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9 (según lo indicado por $1/(KLF6 + KLF9)$) es igual o menor que aproximadamente 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1 o menos (incluyendo todos los intervalos y números enteros intermedios) basados en valores de DO_{450} (o una unidad de medida ELISA convencional equivalente, por ejemplo, fluorescencia) de un ensayo ELISA convencional. En divulgaciones específicas, lo anterior se utiliza en el tratamiento del dolor o dolor neuropático asociado a inflamación.

También se describen métodos para modular la transcripción de un gen presente en una célula implicada en la señalización nociceptiva y/o la percepción de dolor en un sujeto, que comprende administrar a la célula una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico inhibe la unión de un factor de transcripción a su sitio de unión del factor de transcripción, en donde un primer factor de transcripción es KLF6 y un segundo factor de transcripción se selecciona del grupo que consiste en KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF16 y KLF17. En algunas divulgaciones, el agente terapéutico incluye uno o más señuelos oligonucleotídicos descritos en el presente documento. En determinadas divulgaciones, la modulación de la transcripción comprende suprimir o reprimir la expresión génica. En algunas divulgaciones, la modulación de la transcripción comprende activar o inducir la expresión génica. En determinadas divulgaciones, el gen está implicado en la señalización nociceptiva. Los genes implicados en la señalización nociceptiva incluyen, genes que codifican 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. Los ejemplos específicos de tales proteínas incluyen, BDNF (regulado por KLF9), TGFB1 (regulado por KLF6), CDKN1A, JUN, GFAP (regulado por KLF15); y otros tales como BDKRB2, HTR3A, SCN9A, GRM5, NOS1, GCH1, CDK5R1, CACNA1B, P2XR3 y PNMT.

En el presente documento se describen métodos para modular la señalización nociceptiva en una célula, que comprende administrar a la célula una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico inhibe la unión de un factor de transcripción a su sitio de unión del factor de transcripción, en donde el primer factor de transcripción es KLF6 y el segundo factor de transcripción se selecciona del grupo que consiste en KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF15, KLF16 y KLF17. En algunas realizaciones, el agente terapéutico incluye uno o más señuelos oligonucleotídicos descritos en el presente documento. En determinadas divulgaciones, la modulación de la señalización nociceptiva comprende suprimir o reprimir la señalización nociceptiva. En algunas divulgaciones, la modulación de la señalización nociceptiva comprende la activación de un inhibidor de la señalización nociceptiva. En divulgaciones particulares, la modulación de la señalización nociceptiva comprende el aumento de la degradación proteolítica de una proteína implicada en la señalización nociceptiva en una célula. En determinadas divulgaciones, la modulación de la degradación de proteínas comprende la función estimulante del proteasoma. En determinadas divulgaciones, la proteína está implicada en la señalización nociceptiva. Las proteínas implicadas en la señalización nociceptiva incluyen 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. Los ejemplos específicos de tales proteínas incluyen, BDNF (regulado por KLF9), TGFB1 (regulado por KLF6), CDKN1A, JUN, GFAP (regulado por KLF15); y otros tales como BDKRB2, HTR3A, SCN9A, GRM5, NOS1, GCH1, CDK5R1, CACNA1B, P2XR3 y PNMT.

En determinadas divulgaciones, la célula de los diversos métodos se proporciona *in vivo* (por ejemplo, en un sujeto que sufre de dolor o es probable que sufra de dolor). Una celda proporcionada *in vivo* puede ubicarse en diferentes lugares incluyendo, pero no limitado a, ganglios de la raíz dorsal y/o la médula espinal. En otras realizaciones, se proporciona la célula de los diversos métodos *in vitro* (por ejemplo, en una placa de Petri). La célula puede ser cualquier célula implicada en la señalización nociceptiva, incluyendo, pero no limitado a, una neurona (por ejemplo, una neurona del dolor de los ganglios de la raíz dorsal y/o la médula espinal o del sistema nervioso simpático), una célula glial, una célula de soporte tisular (por ejemplo, fibroblasto), una célula inmunológica o una célula de una línea celular (por ejemplo, una célula PC12).

En algunas realizaciones, los señuelos oligonucleotídicos y/o las composiciones farmacéuticas de los mismos se usan en terapia de combinación con al menos un agente terapéutico distinto. Algunos ejemplos de otros agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a uno o más señuelos oligonucleotídicos adicionales. El señuelo oligonucleotídico y/o la composición farmacéutica del mismo y el agente terapéutico pueden actuar de forma aditiva o, más preferentemente, de manera sinérgica. En algunas divulgaciones, un señuelo oligonucleotídico y/o una composición farmacéutica del mismo se administra simultáneamente con la administración de otro agente terapéutico, incluyendo otro señuelo oligonucleotídico. En otras realizaciones, un señuelo oligonucleotídico o una composición farmacéutica del mismo se administra antes o después de la administración de otro agente terapéutico, incluyendo otro señuelo oligonucleotídico.

Para la administración a un sujeto que lo necesite, los señuelos oligonucleotídicos y/o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse por cualquier vía conveniente. Algunos ejemplos particulares incluyen la administración por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y por administración oral. La administración puede ser sistémica o local. Se conocen diversos sistemas de administración en la técnica, incluyendo,

por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., que puede usarse para administrar un compuesto y/o composición farmacéutica del mismo. Los métodos de administración incluyen, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural/peridural, oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, rectal, por inhalación o por vía tópica, particularmente a los oídos, la nariz, los ojos o la piel. En determinadas divulgaciones, el señuelo oligonucleotídico se administra perineuralmente, epidural/periduralmente, intratecal o intradérmicamente. En determinadas divulgaciones, se administra más de un señuelo oligonucleotídico a un paciente. El modo de administración preferido se deja a discreción del profesional y dependerá en parte del sitio de la afección médica.

En divulgaciones específicas, puede ser deseable administrar uno o más señuelos oligonucleotídicos localmente en el área en necesidad de tratamiento. Esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante cirugía, aplicación tópica (por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de la cirugía), mediante inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialísticas, o fibras. En algunas divulgaciones, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (por ejemplo, el sitio anterior, actual o esperado) de dolor.

En determinadas divulgaciones, puede ser deseable introducir uno o más señuelos oligonucleotídicos en el sistema nervioso por cualquier vía adecuada, incluyendo pero no restringido a inyección intraventricular, intratecal, perineural y/o epidural/peridural. La inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tales como un depósito Ommaya.

Puede emplearse también la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante, o mediante perfusión en un tensioactivo pulmonar de fluorocarbono o sintético.

La cantidad de señuelo oligonucleotídico que será eficaz en el tratamiento o prevención del dolor en un paciente dependerá de la naturaleza específica de la afección y puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales conocidas en la técnica. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La cantidad de un señuelo oligonucleotídico administrado será, por supuesto, dependiente de, entre otros factores, el sujeto a tratar, el peso del sujeto, la gravedad de la afección, la forma de administración y el criterio del médico que la receta. En determinadas realizaciones, una dosis única de señuelo oligonucleotídico comprende aproximadamente 5 µg a aproximadamente 15 mg, aproximadamente 50 µg a aproximadamente 7,5 mg, aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1 mg, aproximadamente 250 µg a aproximadamente 750 µg, o aproximadamente 500 µg de señuelo oligonucleotídico por kilogramo (kg) de peso corporal.

En algunas divulgaciones, las formas de dosificación están adaptadas para administrarse a un paciente no más de dos veces al día, más preferentemente, solamente una vez al día. La dosificación puede proporcionarse sola o en combinación con otros medicamentos y puede continuar tanto tiempo como sea necesario para un tratamiento eficaz o prevención del dolor.

Composiciones y kits

Ciertas realizaciones incluyen composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas o terapéuticas, que comprende uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, señuelos oligonucleotídicos), descritos en el presente documento, opcionalmente en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, vehículos de grado farmacéutico).

Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, señuelos oligonucleotídicos), preferentemente, en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de un vehículo farmacéuticamente aceptable, para proporcionar un formulario para la administración adecuada a un paciente. Cuando se administran a un paciente, los agentes terapéuticos tales como los señuelos oligonucleotídicos y los vehículos farmacéuticamente aceptables son preferentemente estériles. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), tampón Tris, agua, etanol acuoso, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua o emulsiones de triglicéridos, comprimidos y cápsulas. El agua es un vehículo preferido cuando los señuelos oligonucleotídicos se administran por vía intravenosa. Pueden emplearse también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las composiciones farmacéuticas, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Además, pueden usarse agentes auxiliares, estabilizadores, espesantes, lubricantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse por medio de mezcla convencional, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsionado, encapsulación, atrapamiento o procesos de liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables, que facilitan el procesamiento de los compuestos descritos en el presente documento en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

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

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleaginosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires, por ejemplo. Las composiciones administradas por vía oral pueden contener uno o más agentes opcionales, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartamo o sacarina, agentes aromatizantes tales como menta piperita, aceite de gaulteria o agentes colorantes de cereza y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéuticamente agradable al paladar. Por otro lado, cuando están en forma de comprimido o píldora, las composiciones pueden recubrirse para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal, proporcionando de esta manera una acción sostenida durante un período prolongado de tiempo. Las composiciones orales pueden incluir vehículos convencionales tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Tales vehículos son preferentemente de calidad farmacéutica.

Para preparaciones líquidas orales tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, los vehículos adecuados, excipientes o diluyentes incluyen agua, solución salina, alquilenglicoles (por ejemplo, propilenglicol), polialquilenglicoles (por ejemplo, polietilenglicol), aceites, alcoholes, tampones ligeramente ácidos entre pH 4 y pH 6 (por ejemplo, acetato, citrato o ascorbato entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM), etc. Adicionalmente, pueden añadirse agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes, sales biliares, disolventes, acilcarnitinas y similares.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos, pastillas para chupar, etc., formulados de manera convencional. Las formulaciones de fármacos líquidos adecuadas para su uso con nebulizadores y dispositivos de pulverización líquida y dispositivos de aerosol EHD normalmente incluirán un compuesto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un líquido tales como alcohol, agua, polietilenglicol o un perfluorocabono. Opcionalmente, puede añadirse otro material para alterar las propiedades del aerosol de la solución o suspensión de compuestos. En algunos aspectos, el material es líquido tales como un alcohol, glicol, poliglicol o un ácido graso. Otros métodos para formular soluciones o suspensiones de fármacos líquidos adecuadas para su uso en dispositivos de aerosol se conocen por aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, Biesalski, Patente de EE.UU. N.º 5.112.598; Biesalski, patente de EE.UU. N.º 5.556.611). Un compuesto también puede formularse en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contengan bases para supositorio convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos. Además de las formulaciones descritas previamente, un compuesto también puede formularse como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. De esta manera, por ejemplo, un compuesto puede formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Puede incluirse un señuelo oligonucleotídico en cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, o en cualquier otra formulación adecuada, tales como una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato o hidrato. Las sales farmacéuticamente aceptables retienen sustancialmente la actividad del compuesto original y pueden prepararse por reacción con bases o ácidos apropiados y tienden a ser más solubles en solventes acuosos y otros disolventes próticos que la forma original correspondiente.

En algunos casos, los liposomas pueden emplearse para facilitar la captación de los señuelos oligonucleotídicos en las células, por ejemplo, *in vitro* o en un sujeto (véase, por ejemplo, Williams, S.A., Leukemia 10(12):1980-1989, 1996; Lappalainen et al., Antiviral Res. 23:119, 1994; Uhlmann et al., Chemical Reviews, Volumen 90, N.º 4, 25 páginas 544-584, 1990; Gregoriadis, G., Capítulo 14, Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine, págs. 287-341, Academic Press, 1979). Los hidrogeles también pueden usarse como vehículos para la administración de señuelos oligonucleotídicos, por ejemplo, como se describe en el documento WO 93/01286. Como alternativa, los señuelos oligonucleotídicos pueden administrarse en microesferas o micropartículas. (Véase, por ejemplo, Wu, G.Y. y Wu, C.H., J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 30 1987). Como alternativa, el uso de microburbujas llenas de gas complejadas con los señuelos oligonucleotídicos puede mejorar la administración a los tejidos diana, como se describe en la Patente de EE.UU. N.º 6.245.747. También pueden usarse composiciones de liberación sostenida. Estos pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados tales como películas o microcápsulas.

Los señuelos oligonucleotídicos pueden introducirse en las células utilizando técnicas reconocidas en la técnica (por ejemplo, transfección, electroporación, fusión, liposomas, partículas poliméricas coloidales y vectores víricos y no víricos, así como otros medios conocidos en la técnica). El método de suministro seleccionado dependerá al menos de la química del oligonucleótido, las células a tratar y la ubicación de las células serán evidentes para el experto en la materia. Por ejemplo, la localización puede lograrse mediante liposomas con marcadores específicos en la superficie para dirigir el liposoma, inyección directa en tejido que contiene células diana, captación mediada por receptor específico o similar.

Como se conoce en la técnica, los señuelos oligonucleotídicos pueden administrarse usando, por ejemplo, métodos que implican la captación mediada por liposomas, conjugados de lípidos, captación mediada por polilisina, captación mediada por nanopartículas y endocitosis mediada por receptor, así como modos de entrega no endocíticos adicionales, tales como microinyección, permeabilización (por ejemplo, permeabilización de estreptolisina-O, permeabilización de péptidos aniónicos), electroporación y diversos métodos de administración no endocíticos no invasivos que se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Dokka y Rojanasakul, *Advanced Drug Delivery Reviews* 44:35-49).

En determinadas realizaciones, uno o más señuelos oligonucleotídicos se proporcionan en un kit. En determinadas realizaciones, el kit incluye una instrucción, por ejemplo, para el uso de dicho uno o más señuelos oligonucleotídicos. En determinadas realizaciones, dicha instrucción describe uno o más de los métodos de la presente invención, por ejemplo, un método para prevenir o tratar el dolor, un método para modular la expresión génica en una célula, un método para modular la señalización nociceptiva en una célula, un método para modular la degradación de proteínas en una célula, etc. En determinadas realizaciones, los señuelos oligonucleotídicos proporcionados en un kit se proporcionan en forma liofilizada. En ciertas realizaciones relacionadas, un kit que comprende uno o más señuelos oligonucleotídicos liofilizados comprende además una solución (por ejemplo, una solución salina farmacéuticamente aceptable) que puede usarse para resuspender uno o más de los señuelos oligonucleotídicos.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, la invención.

30 Ejemplos

Ejemplo 1

35 Marcaje como diana de la familia KLF para el tratamiento del dolor

Se diseñaron señuelos oligonucleotídicos dirigidos contra miembros de la familia de factores de transcripción tipo Krüppel (KLF), caracterizado por la unión a KLF y probado en modelos animales de dolor neuropático y neuroinflamatorio.

El análisis cruzado de los patrones de unión de KLF, la amplitud de la eficacia y la duración en dos modelos de dolor neuropático y neuroinflamatorio separados (descritos a continuación) mostraron que los señuelos oligonucleotídicos **TFD16** (GATCCTTT-GCCTCCTTCGATCCTTTGCCTCCTTCAA; SEQ ID NO: 37) y **TFD17** (GGTGTGGGAGAGCTTTGGGAGGA-TACG; SEQ ID NO: 38) fueron eficaces en ambos modelos y actuaron inhibiendo KLF6, 9 y/o 15 (datos no mostrados). Estos datos mostraron que la efectividad para reducir el dolor neuropático crónico es eficaz a través de la inhibición combinada de KLF9 y KLF15 y la efectividad para reducir el dolor neuroinflamatorio crónico es eficaz a través de la inhibición combinada de KLF6 y KLF9.

En consecuencia, TFD16 y TFD17 se seleccionaron como matrices de secuencia para generar secuencias adicionales de señuelo oligonucleotídico con patrones de unión KLF6, 9 y 15 complementarios. Basándose en este análisis, los señuelos oligonucleotídicos en la **Tabla 2** (arriba) se prepararon para evaluar la unión de KLF y aquellos en la **Tabla E1** (abajo) se probaron adicionalmente en modelos animales de dolor, como se describe a continuación.

Tabla E1		
Nombre	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO:
16.6.2	CCTTTGCCTCCTTCGCTCCTTCAA	25
16.6.5	ATCCTTCGCCTCCTTCAA	28
16.9	ATCCTTTGCCTTTGCCTCCTTCAA	12
17.1	GCTTTGGGAGGATAC	15
17.5	TGTTTGGGAGAATCCTCCCAAAGC	19

(continuación)

Tabla E1		
Nombre	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO:
17.9	TGTTTGGGAGAGGGAGGATAC	23
TFD3	GCGCACCCCAGCCTGGCTCACCCACGCG	36
TFD16	GATCCTTTGCCTCCTTCGATCCTTTGCCTCCTTCAAG	37
TFD17	GGTGTGGGAGAGCTTTGGGAGGATACG	38

Ensayo ELISA. La unión de KLF de los señuelos oligonucleotídicos se midió usando una versión personalizada de un kit ELISA comercial SP1 (Kit ELISA SP1, número de catálogo EK-1090, Affymetrix). Brevemente, las sondas de señuelo de biotina (12,8 pmoles/pocillo) se incubaron con 15 µg de extractos de proteínas nucleares que contienen factores de transcripción KLF de cualquiera de las células (a) HELA: para detección de KLF1-6, 8-14 y 16-17 (n.º de catálogo 36010, Motivo activo, CA) o (b) HEK290: para detección de KLF15 (n.º de catálogo 36033, Motivo activo, CA). Para la detección de KLF 7, se utilizaron 0,5 y 1 µg de una proteína KLF7 humana recombinante (Novus, CA, n.º de catálogo NBP2-23176).

El procesamiento de la mezcla sonda-proteína señuelo se realizó de acuerdo con el proveedor del kit ELISA: la mezcla se cargó en placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina y la cantidad de KLF capturado se midió con una detección colorimétrica basada en anticuerpos (anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP) en un lector de microplacas (DO₄₅₀ nm). Cuando se aumenta la concentración de señuelos no biotinilados que compiten añadidos a la reacción de mezcla de unión, una reducción de la unión del factor de transcripción a la sonda biotinilada es una demostración de especificidad de unión. Todos los datos se corrigieron contra la señal de fondo medida internamente para cada prueba ELISA y todas las etapas de prueba y las condiciones de prueba se normalizaron de acuerdo con la recomendación del proveedor del kit, incluyendo el tiempo de detección con el tampón de detección (es decir, 5,2 min determinado como óptimo para este ensayo), para asegurar una comparación adecuada de los valores de unión de DO₄₅₀ brutos entre ejecuciones de ELISA.

Para los ensayos ELISA, las cadenas individuales de cada señuelo fueron fabricados por Invitrogen (CA), se resuspendieron en una solución madre de 100 µM en TE pH 8, NaCl 50 µM y se hibridaron en soluciones de trabajo 4 µM de la siguiente manera: (a) mezcla señuelo (100 µl): 4 µl de cadena sentido (100 µM) + 4 µl de cadena antisentido (100 µM) + 89,5 µl de TE pH 8 + 2,5 µl de NaCl (1,94 M); (b) hibridación: 7 min a 95 °C seguido de enfriamiento lento a TA durante 1 h antes de su uso o almacenamiento a - 20 °C.

La especificidad de unión se evaluó midiendo la linealidad de la señal de unión, la reducción de la unión con el señuelo KLF competidor libre, y por la falta de unión de KLF a los señuelos mutantes (véase la Tabla E2 a continuación).

Tabla E2. Señuelos mutantes		
Nombre	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO:
MUT1 S	ATGCAGGAGAAAGATTGGCGTAGTATCTACTAG	39
MUT1 AS	CTTCATGATTTTATTGCTTTCAAATCCAAAAT	40
MUT2 S	GTTATGCGTTTGTAGATGCTTTCGTTATAG	41
MUT2 AS	CTATTTCGAAACGATCTACATTGGCATAAC	42

Los anticuerpos KLF primarios de conejo se obtuvieron de fuentes disponibles en el mercado y el anticuerpo anticonejo secundario conjugado con HRP usado para el ensayo KLF fue el anticuerpo proporcionado en el kit ELISA (dilución 1:200).

Estudios de efectividad *in vivo*. Los materiales y métodos para los modelos animales de dolor se describen a continuación.

Animales. Ratas Sprague-Dawley, 250-300 g, machos, Harlan Industries (Livermore, CA).

Artículos de prueba y control. Para pruebas en animales, los señuelos oligonucleotídicos se fabricaron por Trilink Biotechnologies (CA) y se formularon como soluciones madre 10 mM o 15 mM (Tris-pH 7,5, CaCl₂). Cada señuelo se preparó para inyecciones de 20 µl a la concentración apropiada para la administración de la dosis seleccionada. El señuelo oligonucleotídico y los controles vehículo (Tris-10 mM, NaCl 140 mM, pH 7,5) se proporcionaron al sitio de prueba de forma ciega y en viales listos para su uso.

Modelo de lesión nerviosa preservada (SNI). Se indujo anestesia con isoflurano al 2 % en O₂ a 2 l/min y se mantuvo con 0,5 % de isoflurano en O₂. Las ratas fueron se afeitaron y se prepararon asépticamente para cirugías. La lesión nerviosa preservada se realizó basándose en el método descrito por Decosterd et al. (Decosterd y Woolf, 2000).

5 Brevemente, se realizó una incisión en la piel y la fascia del muslo izquierdo, se separaron las dos cabezas de m. bíceps femoral y se expusieron 3 ramas terminales del nervio ciático. El tibial y el peroneal común se ligaron ajustadamente, se diseccionó distalmente a la ligadura y se extrajeron 2-3 mm del tronco del nervio. La rama sural se dejó intacta. La herida se cerró en capas.

10 *Modelo de lesión por constricción crónica (CCI).* Siguiendo el modelo de lesión por constricción crónica (Bennett y Xie, 1988), el nervio ciático común derecho se expuso a la mitad del muslo mediante disección roma a través del bíceps femoral. Proximal a la trifurcación de la ciática, aproximadamente 12 mm de nervio se liberó del tejido adherido y cuatro ligaduras se ataron sin apretar alrededor de éste con un espacio de aproximadamente 1 mm. La longitud del nervio afectado de esta manera fue de ~ 6-8 mm de largo. Se tuvo cuidado de atar las ligaduras de tal manera que se viera
15 que el diámetro del nervio apenas se contraía cuando se observaba con un aumento de 40 X. El grado deseado de constricción retrasó, pero no detuvo, la circulación a través de la vasculatura epineural superficial y a veces produjo una pequeña, contracción breve en el músculo que rodea la exposición. La incisión se cerró en capas.

20 *Hipersensibilidad mecánica.* El dolor se midió como hipersensibilidad mecánica usando pruebas repetitivas de filamentos de von Frey. Brevemente, se usaron filamentos de von Frey (1-4-6-8-10-10-26 g) para evaluar la capacidad de respuesta a la estimulación mecánica de la pata trasera. Los animales se habituaron en un suelo de malla 1 hora antes de la prueba y se aplicaron cinco aplicaciones de cada filamento. Para cada aplicación, el cabello se presionó perpendicularmente contra la pata con fuerza suficiente para causar una ligera flexión y se mantuvo durante aproximadamente 1-2 segundos. Se observó una respuesta positiva si la pata se retiraba bruscamente. El parpadeo
25 inmediatamente después de la eliminación del vello también se consideró una respuesta positiva. Los estímulos se presentaron sucesivamente siguiendo el patrón descrito anteriormente. Los animales se probaron al inicio del estudio justo antes de la cirugía y en puntos de tiempo determinados antes y después de las inyecciones.

30 *Cegamiento y aleatorización.* Todos los experimentos se realizaron cegados. Los sitios de prueba recibieron viales cegados y el código de cegamiento se rompió después de completar las pruebas.

La aleatorización se realizó en POD14 después de la prueba de dolor inicial y antes de la dosificación. Para cada cohorte probada, los animales se distribuyeron en grupos de 2 a 3 ratas, por lo que los valores medios de POD14 von Frey fueron lo más cercanos posibles entre los grupos de prueba, marcando como diana dentro del 15 % entre sí si
35 los valores lo permiten. Una vez que los animales se distribuyeron en grupos, la atribución del tratamiento de la solución a los grupos quedó a criterio del experimentador.

40 *Criterios de inclusión y exclusión predefinidos.* Los animales con valores de von Frey ≤ 5 en el día de la primera inyección (es decir, POD14) se excluyeron del análisis de resultados. El valor de von Frey de 5 se basa en datos históricos internos en múltiples sitios de prueba donde las ratas pueden alcanzar este valor en condiciones basales, preoperatorio y por lo tanto es un umbral para la ausencia/presencia de hipersensibilidad inducida por el modelo. Si el promedio de los valores de hipersensibilidad mecánica de los vehículos tratados se redujo en un 50 % o más durante la primera semana después de la inyección, la cohorte se excluyó porque el modelo de dolor no funcionó
45 adecuadamente.

50 *Administración intratecal.* Los señuelos oligonucleotídicos se administraron por vía intratecal. Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley con isoflurano al 2 %, sus espaldas se afeitaron y se prepararon con Betadine. La rata se colocó en una botella para mantener la espalda arqueada. Una aguja 17G 1/2 se deslizó rostralmente a lo largo del lado izquierdo del proceso transversal del nivel de la vértebra L6 hasta que alcanzó el nivel de la vértebra L5. Después se insertó la aguja entre L5 y L6 hasta que se alcanzó el espacio intratecal como lo indica la contracción de la cola. Después se inyectaron 20 μ l de señuelo o vehículo por vía intratecal (IT). Dependiendo del estudio, las ratas recibieron una inyección IT única una vez en POD14 después de la cirugía, o una vez en POD14 y una vez en POD17.

55 *Análisis Estadístico.* Se utilizó la prueba T no paramétrica de Student seguida de un análisis T-Welsh para la corrección de la varianza desigual para analizar los puntos de tiempo individuales y la comparación de la distribución de datos entre condiciones experimentales.

60 Los resultados del análisis ELISA de unión a KLF y los modelos animales de dolor CCI y SNI con un nivel de dosificación único de señuelos se muestran en las Figuras 1-3B. La Figura 1 muestra las características de unión a KLF de los señuelos oligonucleotídicos de las Tablas 2 y E1, con respecto a los señuelos KLF control independientes (resaltado en gris; véase, por ejemplo, Shields y Yang, 1998; Matsumoto et al., 1998). Los valores de unión a KLF6, KLF9 y KLF15 se presentan como media y los valores SEM DO₄₅₀ del ensayo de unión ELISA *in vitro* descrito en el Ejemplo 1. El N correspondiente también se lista. La efectividad para tratar el dolor neuropático y/o neuroinflamatorio se presenta como porcentaje (%) de reducción del dolor con respecto al control durante el período de prueba de los
65 estudios en animales correspondientes.

Las **Figuras 2A-B** muestran la efectividad de los señuelos oligonucleotídicos probados en el modelo SNI de dolor neuropático crónico y las **Figuras 3A-B** muestran la efectividad de los señuelos oligonucleotídicos probados en el modelo CCI de dolor neuroinflamatorio crónico.

5 Un meta-análisis detallado de los resultados de efectividad *in vivo* y unión *in vitro* combinados para todos los señuelos oligonucleotídicos probados *in vivo* se llevó a cabo para caracterizar la relación entre el patrón de unión de KLF y la efectividad de los señuelos oligonucleotídicos. La **Figura 4A-C** muestra el nivel de efectividad de los señuelos oligonucleotídicos para tratar el dolor neuropático crónico con respecto a su relación de unión de KLF15/KLF9 (**4A**), coeficientes de correlación lineal entre la efectividad para tratar el dolor neuropático crónico y los parámetros de unión a KLF6, KLF9 y KLF15 (**4B**) y una regresión lineal de los niveles de efectividad con respecto a las relaciones de unión de KLF15/KLF9 (**4C**).

15 De manera similar, las **Figuras 5A-C** muestran el nivel de efectividad de los señuelos oligonucleotídicos para el tratamiento del dolor neuroinflamatorio crónico con respecto a su unión combinada a KLF6, KLF9 y KLF15 (**5A**), coeficientes de correlación lineal entre la efectividad para tratar el dolor neuroinflamatorio crónico y los parámetros de unión a KLF6, KLF9 y KLF15 (**5B**) y una regresión lineal del nivel de efectividad en relación con la capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9, como se indica por la relación de unión $1/(KLF6 + KLF9)$ (**5C**).

20 La **Figura 6** muestra el patrón de efectividad diferencial y superior de los señuelos de la invención con respecto al control de los señuelos consenso de KLF de la bibliografía (TFDC1, TFDC2 y TFD3), a través de etiologías complementarias de dolor, desde neuropático (eje Y) hasta dolor incluyendo componentes inflamatorios (eje X).

25 La **Figura 7** muestra un gráfico de la relación de unión $1/(KLF6 + KLF9)$, que es indicativa de la efectividad para tratar el dolor neuroinflamatorio (cuanto menor, más efectividad), y la relación de unión KLF15/KLF9, que es indicativa de la efectividad para tratar el dolor neuropático (cuanto mayor, más efectividad), para los señuelos oligonucleotídicos en la Tabla 2. Cada número en el eje X corresponde a un señuelo individual.

30 Para caracterizar aún más el perfil terapéutico del señuelo oligonucleotídico 16.6.5, se realizaron estudios de respuesta a la dosis en los modelos animales de SNI y CCI. Las **Figuras 8A-B** muestran la efectividad robusta y duradera de los niveles de dosis ascendentes de 50 a 300 nmoles en estos dos modelos animales de dolor.

35 En conjunto, estos estudios no solo identifican la familia de factores de transcripción KLF como dianas de relevancia terapéutica para el tratamiento del dolor, sino también identifica un conjunto de secuencias de oligonucleótidos con un perfil de unión único a los factores de transcripción de KLF, con respecto a las secuencias KLF descritas anteriormente, que están asociados a un potencial único y robusto para tratar el dolor *in vivo* a través de múltiples etiologías.

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Adynxx, Inc. Mamet, Julien Orr, Rick Manning, Don Harris, Scott Martin, William

<120> SEÑUELOS OLIGONUCLEOTÍDICOS PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR

<130> ADDY-003/01WO

45 <150> US 62/037.996

<151> 15-08-2014

<160> 42

50 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 32

<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido señuelo KLF

60 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> los nucleótidos 1-4 pueden estar o no presentes

65 <220>

<221> misc_feature

	<222> (17)..(17)	
	<223> n es a, c, g o t	
5	<220> <221> misc_feature <222> (20)..(21) <223> n es a, c, g o t	
10	<220> <221> misc_feature <222> (23)..(24) <223> n es a, c, g o t	
15	<220> <221> misc_feature <222> (19)..(32) <223> los nucleótidos 19-32 pueden estar o no presentes	
20	<400> 1 atccttygmm tykycnhhh nvnnyhmhwbv aw	32
25	<210> 2 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
35	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(5) <223> los nucleótidos 1-5 pueden estar o no presentes	
40	<220> <221> misc_feature <222> (12)..(12) <223> n es a, c, g o t	
45	<220> <221> misc_feature <222> (15)..(15) <223> n es a, c, g o t	
50	<220> <221> misc_feature <222> (17)..(18) <223> n es a, c, g o t	
55	<220> <221> misc_feature <222> (19)..(28) <223> los nucleótidos 19-28 pueden estar o no presentes	
60	<400> 2 tgtkbkkddv dnsdnbnndv mbvmhrma	28
65	<210> 3 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 3	

ES 2 750 689 T3

	ttgcctcct tcgatccc	18
5	<210> 4 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 4 atcctttgcc tccttcga	18
15	<210> 5 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 5 atcctttgcc tccttcctt tgctccttc aa	32
25	<210> 6 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 6 cctttgcctc cttccctttg cctccttc	28
35	<210> 7 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
45	<400> 7 atcctttgcc tccttcgaag gaggcaaagg at	32
50	<210> 8 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
55	<400> 8 atcctttgcc tccttcctt gcctcctca a	31
60	<210> 9 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
65	<400> 9	

ES 2 750 689 T3

	atcctttgcc tccttcgct ccttcaa	27
5	<210> 10 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 10 cctttgcctc cttgcctcc ttc	23
15	<210> 11 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 11 atcctttgcc tccttcctc tcaa	24
25	<210> 12 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 12 atcctttgcc tttgcctcct tcaa	24
35	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
45	<400> 13 cctttgcctt tgcctcctc	20
50	<210> 14 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
55	<400> 14 tgttgggag agctt	15
60	<210> 15 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 15	

ES 2 750 689 T3

	gctttgggag gatac	15
5	<210> 16 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 16 tgggagagct ttggga	16
15	<210> 17 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 17 tgtttgggag atttgggagg atac	24
25	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 18 tttgggagat ttgggaggat	20
35	<210> 19 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 19 tgtttgggag aatcctccca aagc	24
45	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 20 tttgggagaa tcctcccaaa	20
55	<210> 21 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
65	<400> 21	

ES 2 750 689 T3

	tgttgggag agctatcctc ccaaagc	27
	<210> 22	
	<211> 23	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 22	
	tggggagag ctatcctccc aaa	23
	<210> 23	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 23	
	tgttgggag agggaggata c	21
25	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 24	
35	tgttggggtt tgggaggata c	21
	<210> 25	
	<211> 25	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 25	
45	cccttgctc cctcgctcc ttaa	25
	<210> 26	
	<211> 25	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido señuelo KLF	
55	<400> 26	
	tccttgct cctcgctc ctca	25
	<210> 27	
60	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido señuelo KLF	
65	<400> 27	

ES 2 750 689 T3

	ctttgcctc cttgcctcc tca	24
5	<210> 28 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 28 atccttcgcc tcctcaa	18
15	<210> 29 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 29 atccttcgcc ttcgcctcct tcaa	24
25	<210> 30 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 30 atccttcgcc tccttcgcct cctcaa	27
35	<210> 31 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
45	<400> 31 tgttgggag aatcctccca aa	22
50	<210> 32 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
55	<400> 32 ttgggagaa tcctcccaaa gc	22
60	<210> 33 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 33	

ES 2 750 689 T3

	gtttgggaga atcctcccaa ag	22
5	<210> 34 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 34 atccttcgcc tccttccc aaagc	25
15	<210> 35 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 35 atccttcgaa tcctccaaa gc	22
25	<210> 36 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 36 gcgcacccca gcctggctca cccacgcg	28
35	<210> 37 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
	<400> 37 gatcctttgc ctcttcgat cctttgcctc ctcaag	37
50	<210> 38 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF	
55	<400> 38 ggtgtttggg agagctttgg gaggatacg	29
60	<210> 39 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF competidor libre	
65	<400> 39	

ES 2 750 689 T3

	atgcaggaga aagattggcg tagtatctac tag	33
5	<210> 40 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF competidor libre	
	<400> 40 ctctatgatt ttattgcttt caaaatccaa aat	33
15	<210> 41 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF competidor libre	
	<400> 41 gttatgcgtt tgtagatgct ttcgttatag	30
25	<210> 42 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> oligonucleótido señuelo KLF competidor libre	
35	<400> 42 ctatttcgaa acgatctaca ttggcataac	30

REIVINDICACIONES

1. Un señuelo oligonucleotídico que comprende una combinación de al menos dos sitios de unión del factor de transcripción, que comprende un primer sitio de unión de factor de transcripción que se une a KLF6 y un segundo sitio de unión de factor de transcripción que se une a un factor de transcripción seleccionado del grupo que consiste en KLF9, KLF15, KLF1, KLF2, KLF3, KLF4, KLF5, KLF7, KLF8, KLF10, KLF11, KLF12, KLF13, KLF14, KLF16 y KLF17.
2. El señuelo oligonucleotídico de la reivindicación 1, en donde el señuelo oligonucleotídico tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 pares de bases.
3. El señuelo oligonucleotídico de la reivindicación 1, en donde el primer y el segundo sitios de unión del factor de transcripción se solapan; y en donde el oligonucleótido opcionalmente comprende además un tercer sitio de unión del factor de transcripción, y en donde el primer, el segundo y el tercer sitios de unión del factor de transcripción se superponen.
4. El señuelo oligonucleotídico de la reivindicación 3, en donde el primer sitio de unión del factor de transcripción se une a KLF6, el segundo sitio de unión del factor de transcripción se une a KLF9 y el tercer sitio de unión al factor de transcripción se une a KLF15.
5. Una población de señuelos oligonucleotídicos de la reivindicación 1, en donde la población de señuelos oligonucleotídicos proporciona una capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9 que es igual o mayor que un valor de densidad óptica de aproximadamente 0,2 DO₄₅₀ en un ensayo ELISA convencional.
6. El señuelo oligonucleotídico de la reivindicación 1, en donde el señuelo comprende una secuencia representada por la Fórmula 1 o la Fórmula 2:
- a₁t₂C₃C₄T₅T₆Y₇G₈M₉M₁₀T₁₁Y₁₂Y₁₃K₁₄Y₁₅C₁₆N₁₇H₁₈h₁₉n₂₀n₂₁V₂₂n₂₃n₂₄Y₂₅m₂₆h₂₇W₂₈b₂₉V₃₀a₃₁W₃₂ (Fórmula 1; SEQ ID NO: 1)
- t₁g₂t₃k₄b₅K₆K₇D₈D₉V₁₀D₁₁N₁₂S₁₃D₁₄N₁₅B₁₆N₁₇N₁₈d₁₉V₂₀m₂₁b₂₂V₂₃m₂₄h₂₅f₂₆m₂₇a₂₈ (Fórmula 2; SEQ ID NO: 2)
- en donde S es G o C; W es A o T; Y es T o C; D es A, G o T; B es C, G o T; K es T o G; M es C o A; H es C, T o A; V es C, G o A; R es A o G; y N es cualquier nucleótido, en donde las letras minúsculas pueden estar presentes o ausentes, y en donde los números en el subíndice representan la posición de un nucleótido en la secuencia.
7. El señuelo oligonucleotídico de la reivindicación 1, en donde el señuelo comprende una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 28 (16.6.5), SEQ ID NO: 25 (16.6.2), SEQ ID NO: 19 (17.5) o SEQ ID NO: 35 (T16.6-T17.5 Fu2) y en donde el señuelo se une a KLF6, KLF9 y KLF15.
8. El señuelo oligonucleotídico de la reivindicación 1, en donde el señuelo comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3-33 y 35 y en donde el señuelo se une a KLF6, KLF9 y KLF15.
9. Una composición farmacéutica que comprende un señuelo o población de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Un kit que comprende un señuelo oligonucleotídico o una población de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y opcionalmente una instrucción para el uso de dicho señuelo oligonucleotídico.
11. Un método *in vitro* para modular la transcripción de un gen presente en una célula implicada en la señalización nociceptiva o para modular la señalización nociceptiva en una célula, en donde el método comprende administrar a la célula una cantidad eficaz de un señuelo o de una población de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
12. Un señuelo o una población de oligonucleótidos para su uso en un método de tratamiento del dolor en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del señuelo o de la población de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
13. El señuelo o la población de oligonucleótidos para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el dolor es un dolor crónico, dolor neuropático, dolor asociado a inflamación o dolor asociado al sistema nervioso central o trastorno visceral.
14. Un agente terapéutico para su uso en un método de terapia mediante la modulación de la señalización nociceptiva en una célula, comprendiendo el método administrar a la célula una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del señuelo oligonucleotídico de la reivindicación 1.
15. El agente terapéutico para su uso en un método de terapia de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el agente

ES 2 750 689 T3

terapéutico proporciona una capacidad de unión del factor de transcripción total a KLF6 y KLF9 que es igual a o mayor que un valor de densidad óptica de aproximadamente 0,2 DO₄₅₀ en un ensayo ELISA convencional.

Nombre de secuencia	Rasgos de secuencia	Tamaño (pb)	KLF6		KLF3		KLF13		N	relación KLF15/KLF9	relación 1/(KLF6+KLF9)	efectividad in vivo	
			Media	SE%	Media	SE%	Media	SE%				dolor	inflamación
16.0	sitio único	18	0.15	0.03	0.26	0.03	0.14	0.00	2	0.54	2.48	No probado	No probado
16.1	sitio único	18	0.15	0.02	0.30	0.03	0.16	0.01	2	0.56	2.40	No probado	No probado
16.2	sin espaciador	32	0.32	0.02	0.32	0.00	0.33	0.01	2	1.03	1.56	No probado	No probado
16.3	sin espaciador, sin flanco	28	0.21	0.03	0.15	0.00	0.30	0.03	2	2.07	2.84	No probado	No probado
16.4	inversión	32	0.21	0.00	0.30	0.01	0.20	0.07	2	0.66	1.95	No probado	No probado
16.5	fusión	31	0.41	0.03	0.33	0.01	0.33	0.01	2	1.60	1.36	No probado	No probado
16.6	fusión	27	0.34	0.03	0.28	0.06	0.29	0.06	2-4	1.54	1.68	No probado	No probado
16.7	fusión, sin flanco	23	0.04	0.01	0.15	0.00	0.24	0.00	2	1.57	5.26	No probado	No probado
16.8	fusión	24	0.29	0.02	0.29	0.01	0.26	0.02	2	0.39	1.74	No probado	No probado
16.9	fusión	24	0.26	0.04	0.31	0.02	0.28	0.02	4	0.39	1.75	No probado	No probado
16.10	fusión, sin flanco	29	0.07	0.01	0.25	0.00	0.21	0.02	2	0.85	3.12	No probado	No probado
16.0.2	sin flanco 5'	25	0.32	0.03	0.32	0.05	0.45	0.04	2	1.39	1.59	4.3%	3.2%
16.0.3	flancos cortos	25	0.18	0.02	0.21	0.00	0.55	0.01	2	2.56	2.62	No probado	No probado
16.6.4	sin flanco 5', flanco 3' corto	24	0.11	0.01	0.16	0.02	0.47	0.01	2	3.05	3.73	No probado	No probado
16.6.5	sitio único fusionado	18	0.14	0.01	0.20	0.01	0.50	0.07	2	1.52	2.93	0.3%	2.2%
16.6.6	fusión con el sitio 16.6.5	24	0.14	0.05	0.10	0.01	0.47	0.01	2	4.93	4.18	No probado	No probado
16.6.7	fusión	27	0.54	0.13	0.15	0.01	0.49	0.02	4	3.28	1.44	No probado	No probado
116.5-117.5.F.01	fusión	25	0.00	0.01	0.00	0.00	0.27	0.02	2	N/A	N/A	No probado	No probado
116.5-117.5.F.02	fusión	22	0.10	0.01	0.18	0.01	0.42	0.01	2	2.34	3.59	No probado	No probado
17.0	sitio único	15	0.02	0.04	0.25	0.03	0.17	0.01	2	0.57	3.66	No probado	No probado
17.1	sitio único	15	0.16	0.03	0.37	0.14	0.17	0.02	4	0.46	1.90	2.0%	2.6%
17.2	sitio único	16	0.14	0.08	0.28	0.00	0.16	0.02	2	0.59	2.44	No probado	No probado
17.3	sin espaciador	24	0.28	0.02	0.34	0.01	0.24	0.02	2	0.70	1.61	No probado	No probado
17.4	sin espaciador, sin flanco	20	0.21	0.02	0.33	0.01	0.18	0.02	2	0.54	1.83	No probado	No probado
17.5	inversión	24	0.30	0.06	0.29	0.06	0.35	0.06	4	1.23	1.22	3.7%	2.9%
17.6	inversión, fusión, sin flanco	20	0.05	0.03	0.23	0.00	0.18	0.00	2	0.77	3.55	No probado	No probado
17.7	inversión	27	0.30	0.00	0.36	0.00	0.24	0.02	2	0.67	1.52	No probado	No probado
17.9	inversión, sin flanco	23	0.32	0.04	0.23	0.02	0.22	0.02	2	0.36	1.85	No probado	No probado
17.9	fusión	21	0.35	0.05	0.24	0.04	0.21	0.01	4	0.39	1.70	1%	1.5%
17.10	fusión	23	0.36	0.02	0.29	0.02	0.17	0.02	2	0.59	1.54	No probado	No probado
17.5.1	sin flanco 3'	22	0.15	0.03	0.23	0.05	0.43	0.01	2	1.89	2.69	No probado	No probado
17.5.2	sin flanco 5'	22	0.07	0.00	0.13	0.01	0.38	0.01	2	2.96	5.05	No probado	No probado
17.5.3	flancos cortos	22	0.17	0.02	0.22	0.01	0.35	0.04	4	1.48	2.58	No probado	No probado
17.0.6	dos sitios de unión a KLF	37	0.38	0.01	0.26	0.02	0.38	0.00	2-10	1.46	1.55	4.9%	1.8%
17.0.7	dos sitios de unión a KLF	29	0.27	0.03	0.21	0.02	0.30	0.03	2-10	1.42	2.09	3.7%	3.5%
17.0.3	consenso KLF replicado	28	0.21	0.07	0.18	0.04	0.59	0.07	3-4	0.45	2.99	4.4%	4.4%
17.0.1	consenso KLF independiente	24	0.07	0.03	0.15	0.04	0.21	0.01	3-4	1.33	3.27	5.5%	3.6%
17.0.2	consenso KLF independiente	21	0.10	0.04	0.21	0.14	0.13	0.03	3-4	0.86	2.56	1.0%	8.5%

FIG. 1

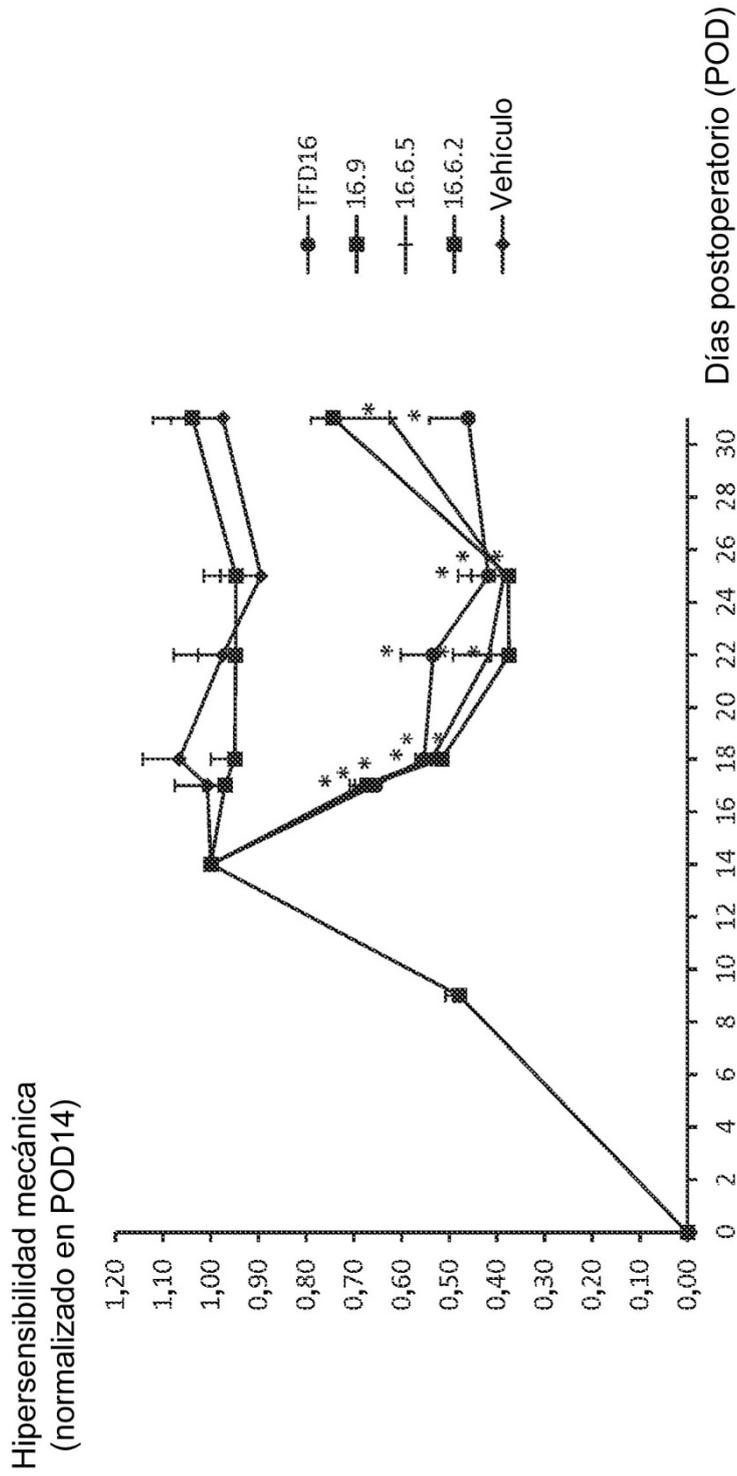


FIG. 2A

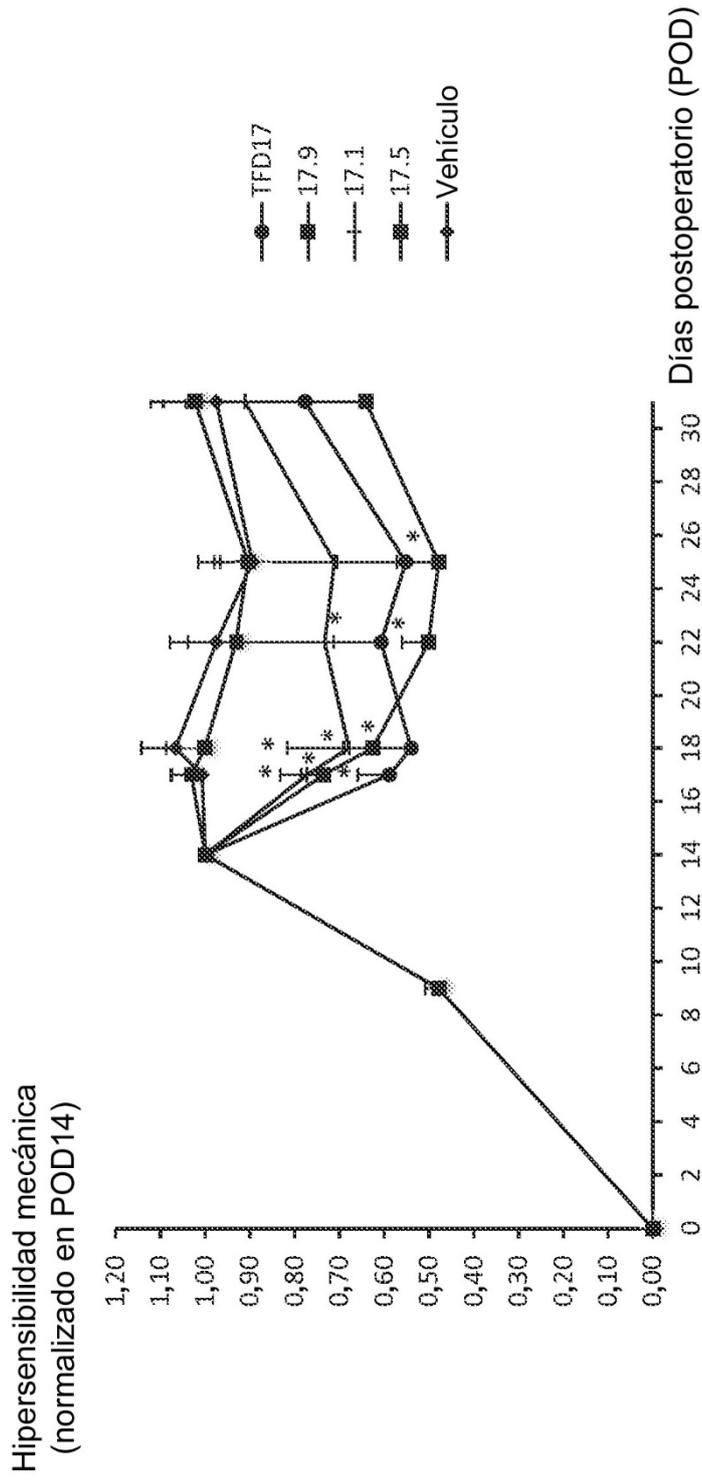


FIG. 2B

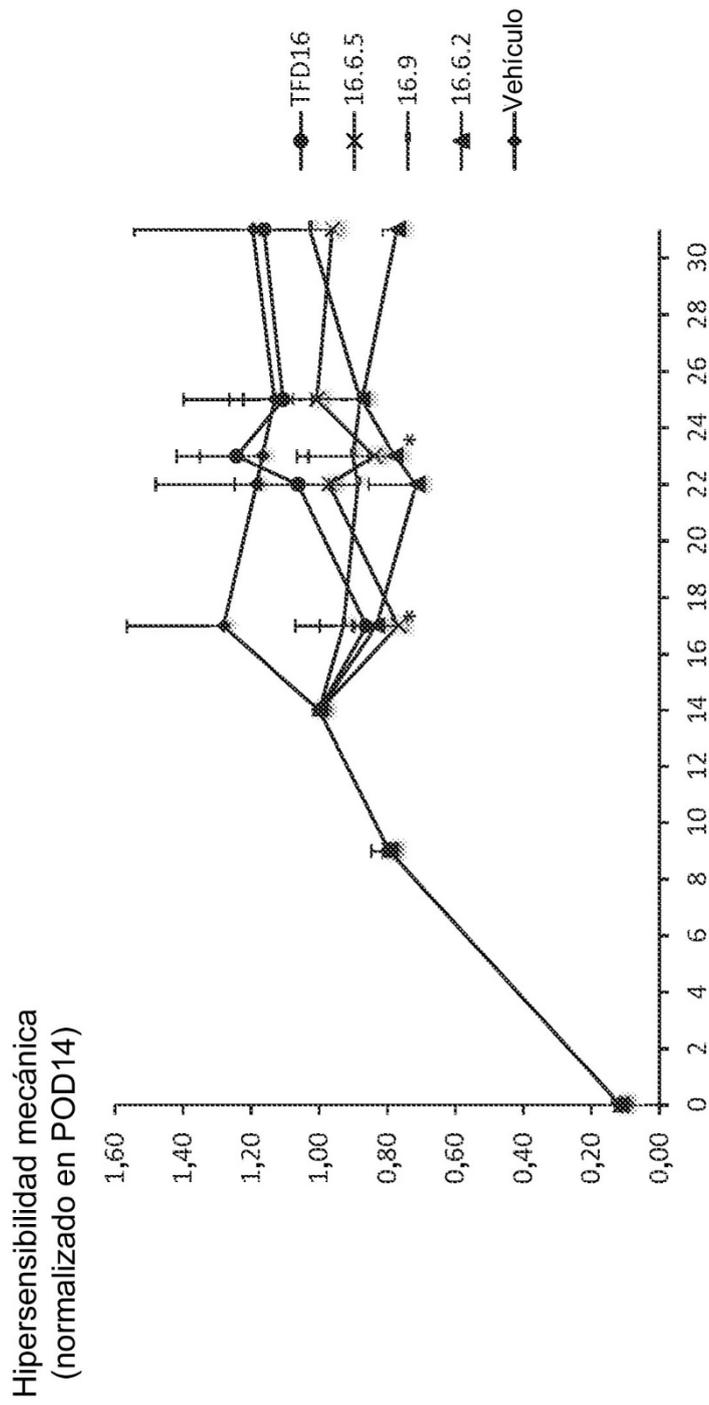


FIG. 3A

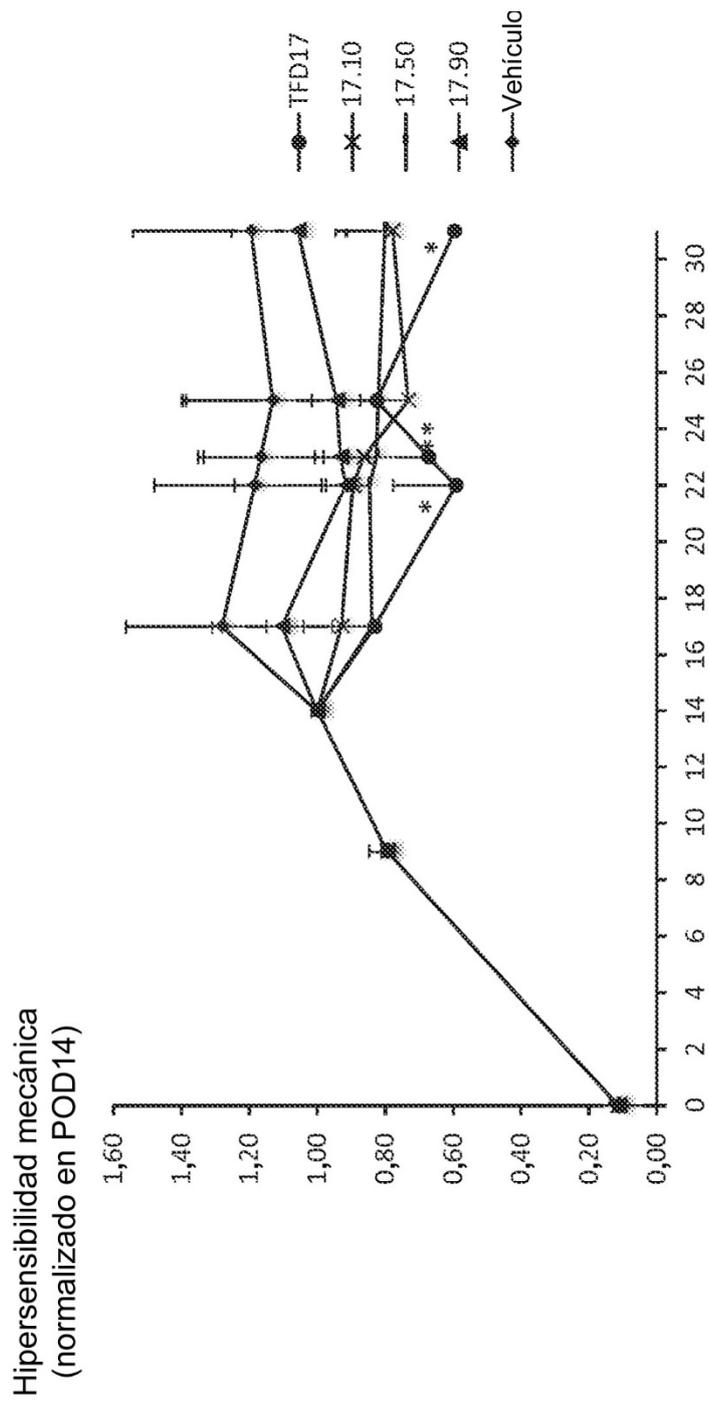


FIG. 3B

Señuelo	Nivel de unión (OD450)		Relación KLF15/KLF9	Reducción del dolor neuropático
	KLF6	KLF15		
TFDC1	0,07	0,15	1,39	55%
TFD16	0,38	0,26	1,46	49%
16.6.5	0,14	0,20	1,52	44%
16.6.2	0,32	0,32	1,39	43%
17.5	0,30	0,29	1,23	37%
TFD17	0,27	0,21	1,42	32%
TFD3	0,21	0,18	0,49	24%
17.1	0,16	0,37	0,46	20%
17.9	0,35	0,24	0,89	1%
16.9	0,26	0,31	0,89	0%
TFDC2	0,13	0,21	0,86	-10%

FIG. 4A

Parámetro	Coefficiente de correlación lineal	Coefficiente de correlación lineal (relación ~0,9 excluida)
KLF15/KLF9	0,5	0,7
1/(KLF15/KLF9)	0,2	0,7
1/(KLF15/KLF6/KLF9)	0,2	0,6
KLF15/KLF6/KLF9	0,2	0,5
KLF6/KLF15	0,1	0,4
1/(KLF15/KLF6)	0,1	0,4
1/KLF15	0,1	0,3
KLF15	0,2	0,3
1/(KLF6+KLF9)	0,1	0,2
KLF9	0,0	0,1
1/KLF6	0,1	0,1
1/KLF9	0,1	0,1
KLF6+KLF15	0,0	0,1
1/(KLF6+KLF15)	0,0	0,1
1/(KLF9+KLF15)	0,0	0,1
KLF9+KLF15	0,1	0,0
KLF6+KLF9	0,0	0,0
KLF6+KLF9+KLF15	0,0	0,0
1/(KLF6/KLF9)	0,0	0,0
KLF6	0,0	0,0
1/(KLF6+KLF9+KLF15)	0,0	0,0
KLF6/KLF9	0,0	0,0

FIG. 4B

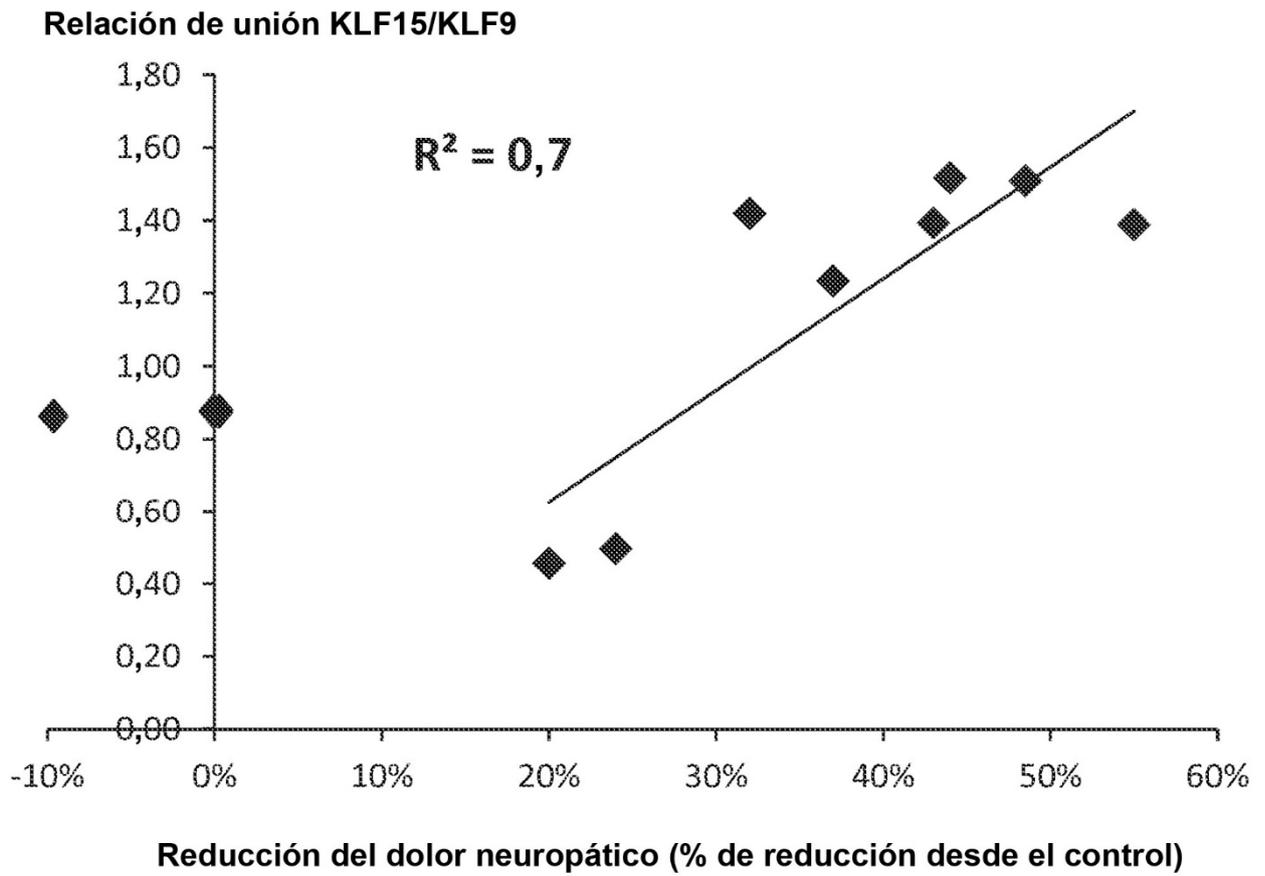


FIG. 4C

Señuelo	Nivel de unión (DO450)			1 /(KLF6+KLF9)	Reducción del dolor neuroinflamatorio
	KLF6	KLF9	KLF15		
TFD17	0,27	0,21	0,30	2,09	33%
16.6.2	0,32	0,32	0,45	1,56	30%
17.5	0,30	0,29	0,35	1,72	29%
17.1	0,16	0,37	0,17	1,90	28%
16.6.5	0,14	0,20	0,30	2,93	22%
16.9	0,26	0,31	0,28	1,76	21%
TFD16	0,38	0,26	0,38	1,55	18%
17.9	0,35	0,24	0,21	1,70	15%
TFD3	0,21	0,18	0,09	2,59	14%
TFDC2	0,13	0,21	0,18	2,96	6%
TFDC1	0,07	0,15	0,21	4,52	-3%

FIG. 5A

Parámetro	Coefficiente de correlación lineal (R ²)
$1/(KLF6+KLF9)$	0,6
$1/(KLF6+KLF9+KLF15)$	0,6
$1/KLF6$	0,5
$1/KLF9$	0,5
$KLF6+KLF9$	0,5
$KLF9+KLF15$	0,5
$KLF6+KLF9+KLF15$	0,5
$1/(KLF6+KLF15)$	0,4
$KLF9$	0,4
$1/(KLF9+KLF15)$	0,4
$KLF15/KLF6/KLF9$	0,4
$KLF6+KLF15$	0,3
$KLF6$	0,3
$KLF15$	0,3
$1/(KLF15/KLF6)$	0,2
$1/KLF15$	0,1
$1/(KLF6/KLF9)$	0,1
$KLF6/KLF9$	0,1
$1/(KLF15/KLF6/KLF9)$	0,1
$KLF6/KLF15$	0,0
$KLF15/KLF9$	0,0
$1/(KLF15/KLF9)$	0,0

FIG. 5B

Relación de unión 1/(KLF6 + KLF9)

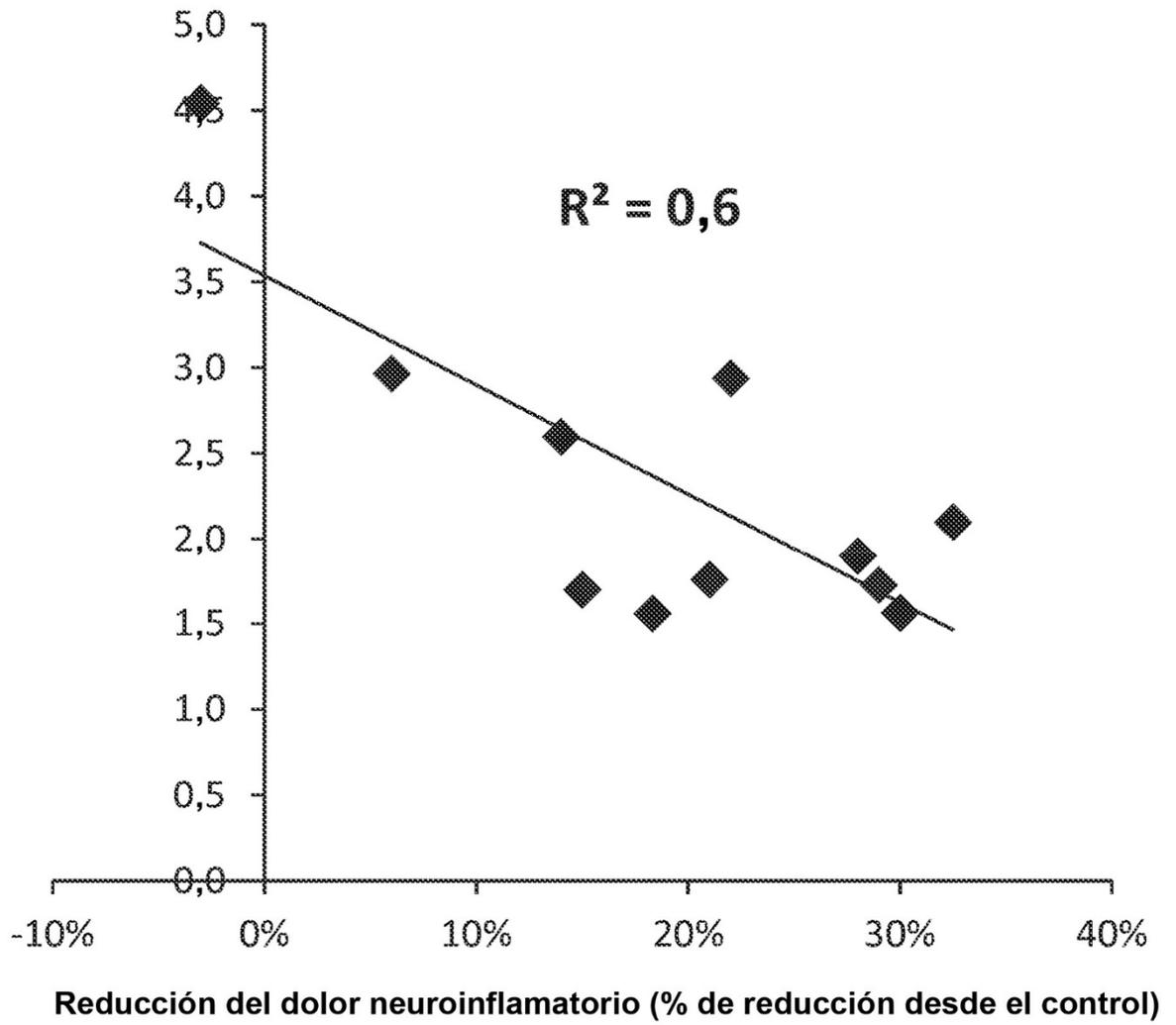


FIG. 5C

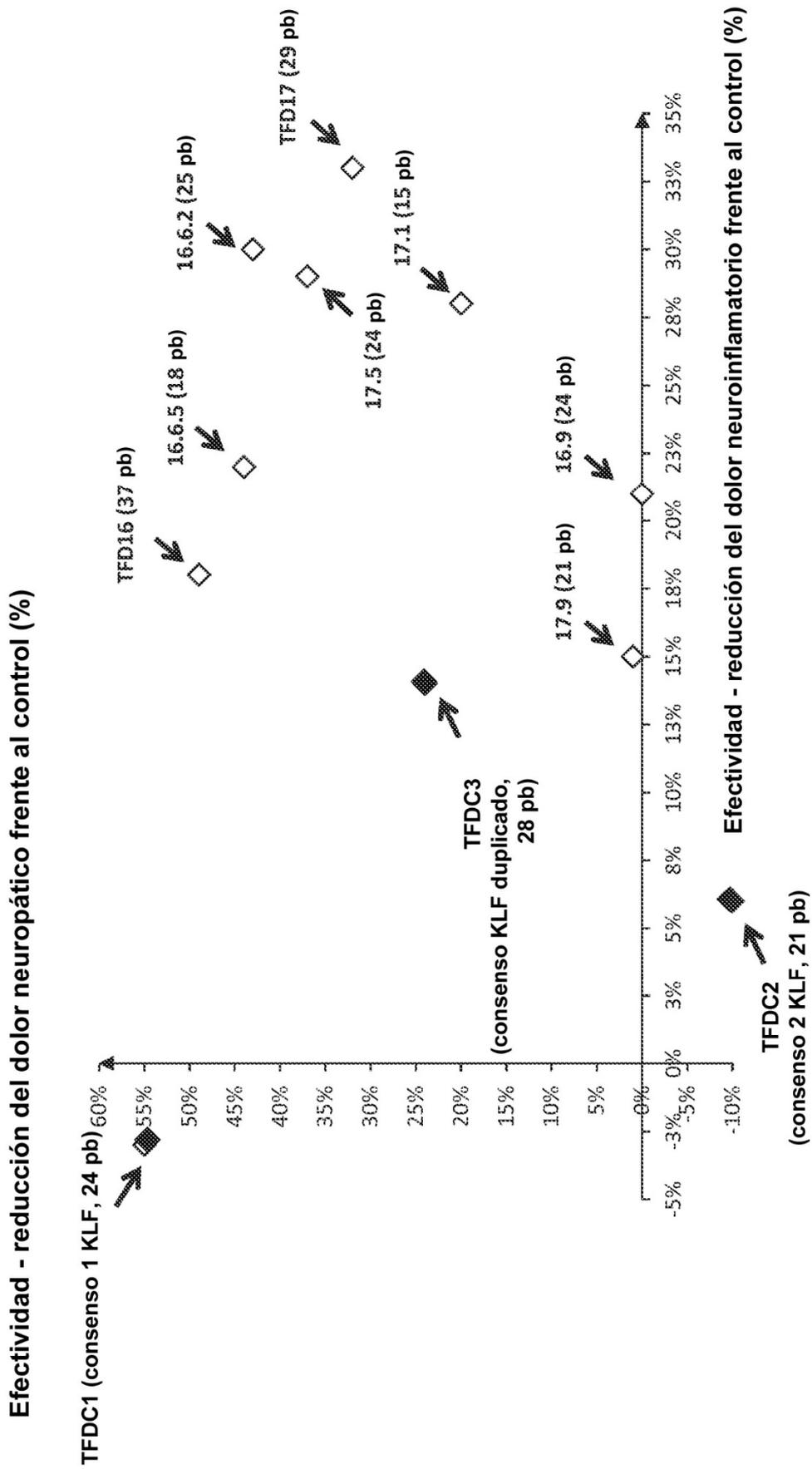
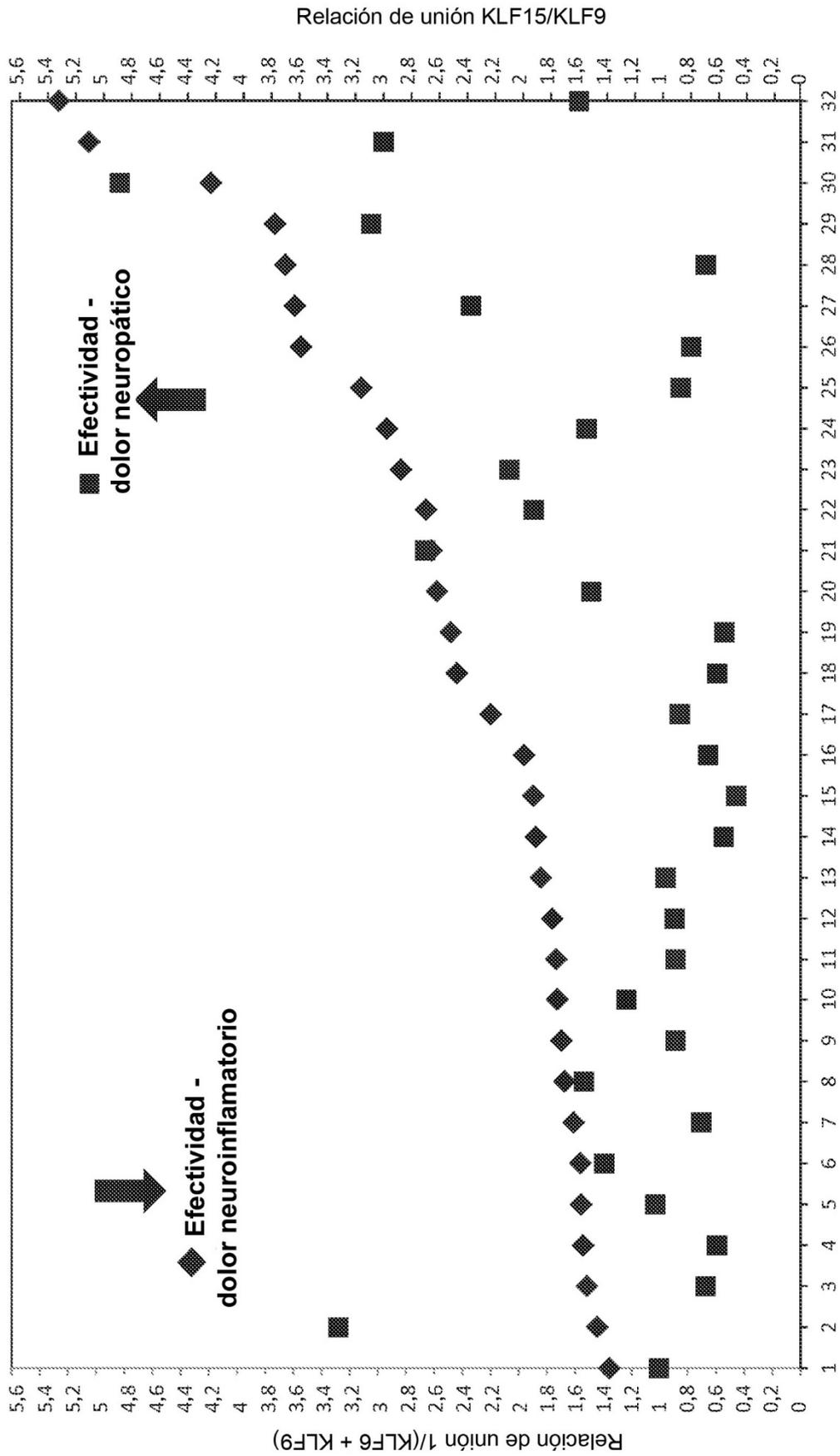


FIG. 6



Señuelos KLF
FIG. 7

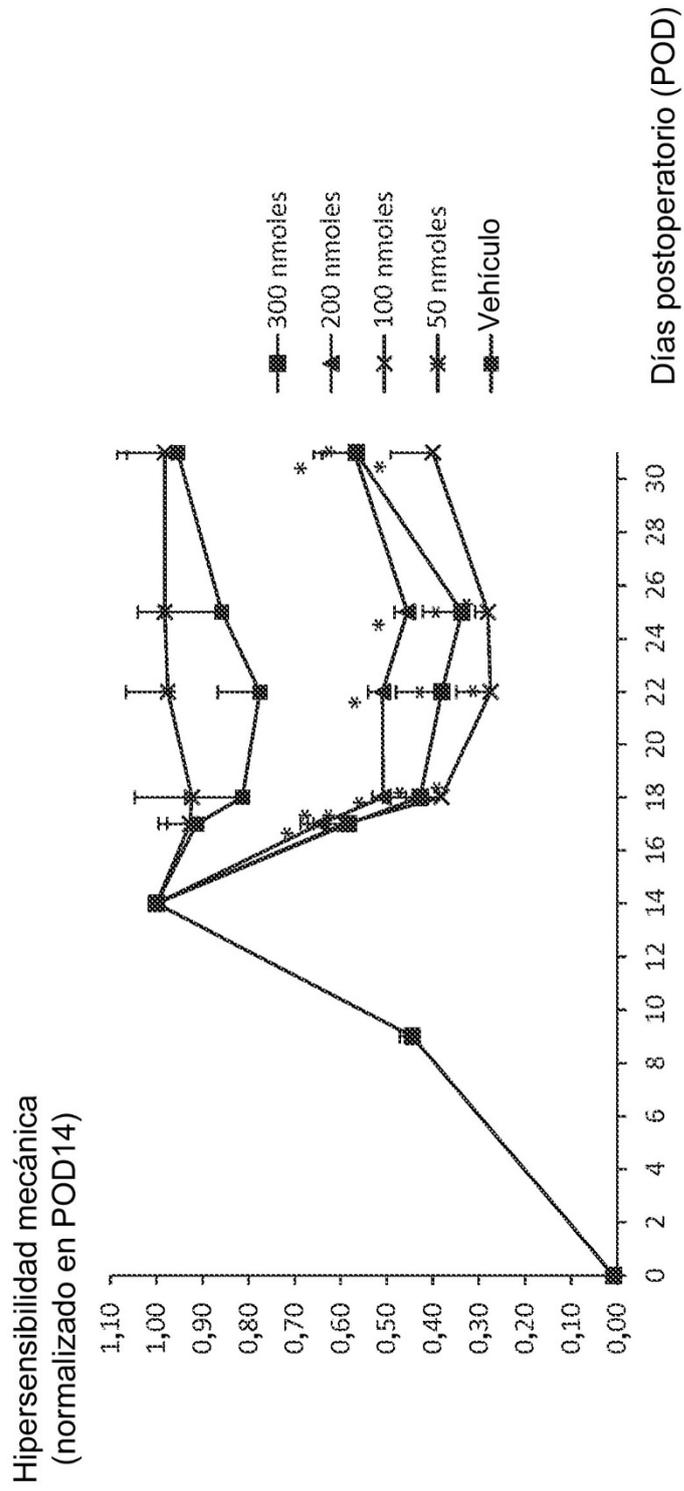


FIG. 8A

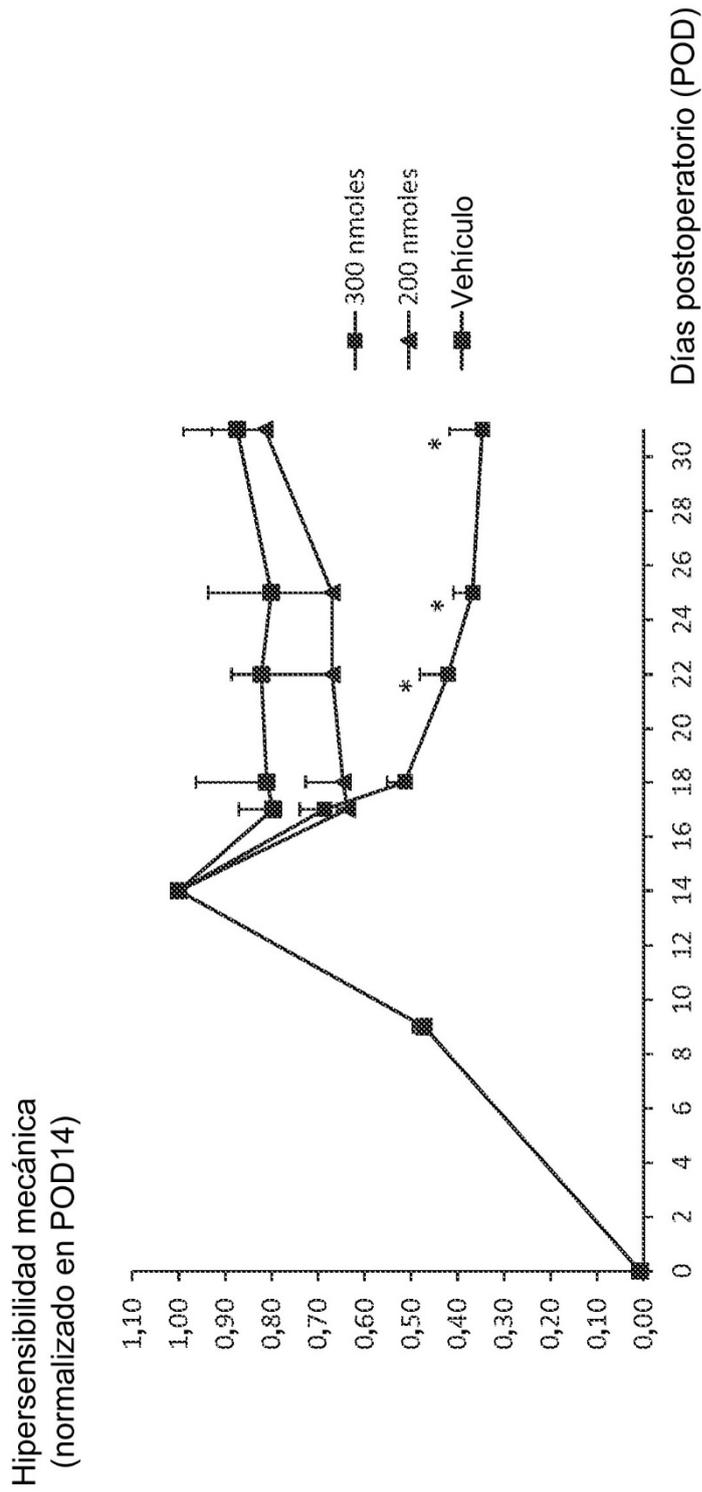


FIG. 8B