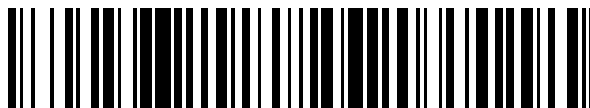


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 132**

21 Número de solicitud: 201131122

51 Int. Cl.:

**A61K 31/16** (2006.01)

**A61K 31/4164** (2006.01)

**A61K 31/435** (2006.01)

**A61K 31/517** (2006.01)

**A61K 31/55** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**08.09.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**18.06.2013**

Fecha de la concesión:

**28.03.2014**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**04.04.2014**

62 Número y fecha presentación solicitud principal:

**P 201031341 08.09.2010**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE  
(50.0%)**

**Avda. de la Universidad, s/n  
03202 Elche (Alicante) ES y  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BELMONTE MARTÍNEZ, Carlos;  
GALLAR MARTÍNEZ, Juana;  
FERRER MONTIEL, Antonio;  
FERNÁNDEZ CARVAJAL, Asia y  
VIANA DE LA IGLESIA, Félix**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA EPÍFORA.**

57 Resumen:

Composición farmacéutica para el tratamiento de la epífora.

La invención se relaciona con composiciones terapéuticas para el tratamiento de la epífora y, más concretamente con composiciones que comprenden un antagonista del receptor TRPM8.

ES 2 408 132 B1

## DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para el tratamiento de la epífora

### Campo Técnico de la Invención

5 La invención se relaciona con composiciones terapéuticas para el tratamiento de la epífora y, más concretamente, con composiciones que comprenden un antagonista de TRPM8.

### Antecedentes de la Invención

10 El grado de humedad de la superficie ocular y de las mucosas externas se mantiene estable gracias a la producción continua de fluido acuoso por glándulas exocrinas. La interrupción de este proceso determina el desarrollo síndromes de sequedad ocular, bucal y vaginal, que son altamente prevalentes, especialmente en  
15 ancianos (Moss, S. E., et al. 2008. Optom.Vis.Sci. 85:668-674; Barker, K. E. & Savage, N. W. 2005. Aust.Dent.J. 50:220-223; Leiblum, S. R., et al. 2009. J.Sex Med 6:2425-2433). En el ojo, el flujo lagrimal producido en ausencia de factores emocionales o de estímulos irritantes exógenos (secreción lagrimal "basal") está ajustado a las condiciones ambientales y a la frecuencia de parpadeo (Dartt, D. A. 2009. Prog.Retin.Eye Res. 28:155-177). La lagrimación también aumenta de manera significativa tras la irritación de la superficie ocular (Acosta, M. C. et al.  
2004. Invest Ophthalmol.Vis.Sci. 45:2333-2336). Los estímulos irritantes son detectados por las terminaciones nerviosas mecano-nociceptoras y polimodales del trigémino, que son sensibles a fuerzas de intensidad lesiva, al calor nocivo y a irritantes químicos, evocando dolor (Belmonte, C., et al. 2004. Exp.Eye Res. 78:513-525) y lagrimación refleja. Sin embargo, no se conocen las estructuras neurales responsables de la detección del grado de sequedad ocular implicadas en la regulación de la tasa de lagrimación basal.

20 Respecto al síndrome de sequedad ocular o xeroftalmia, ésta es una enfermedad de los ojos caracterizada por la sequedad persistente de la conjuntiva y opacidad de la córnea.

25 Existen múltiples causas que pueden producir la xeroftalmia, siendo más frecuente en personas con edad. Entre las enfermedades que producen xeroftalmia encontramos: deficiencia de vitamina A, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide y otras enfermedades reumatológicas, quemaduras químicas o térmicas y fármacos como atenolol, clorfeniramina, hidroclorotiazida, isotretinoína, ketorolaco, ketotifeno, levocabastina, levofloxacina, oxibutinina, tolterodina.

30 Los tratamientos utilizados para tratar la xeroftalmia incluyen corticoides que pueden ser eficaces en fases iniciales de la enfermedad, suplementos de vitamina A y la pilocarpina que es un fármaco que aumenta la producción lacrimal. Entre los preparados que mejoran la sequedad (lágrimas artificiales) se utilizan las soluciones de hipromelosa y los geles de carbómero que se aplican sobre la conjuntiva. Sin embargo, estos tratamientos tienen claras limitaciones respecto a su eficacia y toxicidad. Por lo tanto existe la necesidad de proporcionar nuevos tratamientos mejorados para el tratamiento de la xeroftalmia la sequedad vaginal y el síndrome de boca seca.

### Sumario de la Invención

35 En un aspecto, la invención se relaciona con el uso de un antagonista de TRPM8 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la epífora.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende al menos un antagonista de TRPM8 y al menos un fármaco útil para el tratamiento de la epífora y, si se desea, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

### Descripción de las Figuras de la Invención

40 **Figura 1. Características de la respuesta de las terminaciones nerviosas sensibles al frío de la córnea del ratón. a.** Actividad de impulsos nerviosos (NTI) en respuesta a pulsos de enfriamiento y calentamiento, y al mentol. Los trazados, de arriba abajo, representan: Frecuencia media de disparo (Mean freq., en Hz), frecuencia instantánea (Inst. Freq., en Hz), registro directo de la actividad eléctrica (Imp. ampl., en  $\mu$ V), temperatura de la solución de perfusión (Temp., en  $^{\circ}$ C). **b.** Frecuencia promedio de disparo (Mean freq., en impulsos/s) de 55 terminaciones corneales sensibles al frío en respuesta a una rampa de enfriamiento. Los datos son la media  $\pm$  el error estándar. **c.** Distribución de los umbrales de frío (representado como el cambio desde la temperatura basal,  $-$   
45  $\square$ T, en  $^{\circ}$ C) de 55 terminales termosensibles. **d.** Cambio de la frecuencia de disparo con la temperatura, determinado en las mismas 55 terminales sensibles al frío. Para cada terminal se ha representado el cambio de frecuencia (Mean freq., en impulsos/s) entre la temperatura umbral y aquella a la que se alcanza la frecuencia pico. La línea gruesa representa el valor medio de las 55 pendientes individuales. **e.** Actividad eléctrica de una terminación nerviosa  
50

sensible al frío en respuesta al enfriamiento escalonado. Los trazados muestran la frecuencia media de disparo (Mean freq., Hz), la frecuencia instantánea (Inst. Freq., Hz), el número de impulsos por ráfaga de potenciales de acción (Impulses/Bursa) y la temperatura de la solución de perfusión (Temp., °C). **f.** Frecuencia media de disparo (Mean frequency, en impulsos/s) de 10 terminales termosensibles durante el enfriamiento escalonado. Se observó un aumento significativo de la frecuencia media de disparo tanto durante la fase dinámica (30s iniciales de cada escalón de temperatura) como durante la fase estática (últimos 30s del escalón) del estímulo, siendo en ambos casos proporcional a la disminución de la temperatura (Respuesta dinámica: Coeficiente de correlación de Pearson = -0.98,  $p=0.002$ ; Respuesta estática: Coeficiente de correlación de Pearson = -0.96,  $p=0.014$ ).

**Figura 2. Inmunohistoquímica de las fibras nerviosas corneales del ratón TRPM8-EYFP.** **a, b, y c** son ejemplos de filetes nerviosos entrando en la córnea periférica para formar el plexo estromal. En **a**, todas las fibras nerviosas sensoriales del filete nervioso se han teñido con un anticuerpo contra la beta-tubulina clase III específica de neuronas (Tuj-1), mientras que en **b** sólo se han teñido aquellas fibras del filete nervioso que reaccionaron frente al anticuerpo contra la proteína verde fluorescente (GFP). **c** muestra una doble tinción de inmunofluorescencia de los nervios estromales, con anticuerpos contra Tuj-1 (panel superior) y contra GFP (panel intermedio), así como la imagen superpuesta (panel inferior), mostrando la reducida proporción de fibras sensibles al frío de entre la población general de fibras sensoriales corneales. **d, e y f** muestran la arquitectura característica de las fibras nerviosas que discurren bajo la capa basal del epitelio corneal (plexo subbasal), donde aparecen como fibras arrosariadas rectas y más o menos paralelas (fibras en pincel) que trascurren desde la cornea periférica hacia el centro durante largas distancias. En **d**, aparecen teñidas todas las fibras del plexo subbasal (positivas para Tuj-1), mientras que en **e**, sólo se han teñido las positivas para GFP. En **f** se muestra una doble tinción contra Tuj-1 (gris) y GFP (blanco) para ilustrar la escasez de axones presumiblemente positivos para TRPM8. **g y h** muestran a mayor aumento las áreas enmarcadas en **d** y **e**, respectivamente, mostrando en más detalle la morfología de las fibras arrosariadas subbasales, así como sus ramificaciones que ascienden perpendicularmente desde las capas basales del epitelio corneal hacia las más superficiales, presentando ocasionalmente terminaciones nerviosas en la capa subbasal. Para mostrar el aspecto de las terminaciones nerviosas intraepiteliales, en **i** (todas las terminaciones nerviosas epiteliales, Tuj-1 positivas) y **j** (supuestas terminales nerviosas sensibles al frío, positivas para GFP) se muestran las mismas zonas de **g** y **h**, pero enfocando en un plano más superficial. La diferente morfología y el bajo grado de ramificación de las terminales presumiblemente positivas para TRPM8 se muestran también en **k**, utilizando microscopía *upright* de fluorescencia. En **l** se muestra un barrido de focos compilados en una sola imagen para ilustrar la trayectoria de los axones en su recorrido desde el estroma hasta la superficie corneal, donde finalmente originan racimos de terminaciones relativamente agrupadas (cuadrado enmarcado, que corresponde a la zona mostrada en **k**). En la zona superior derecha de la figura se muestra un dibujo para mostrar esquemáticamente la localización de los nervios sensoriales en las distintas zonas de la córnea, y su correspondencia con los diferentes paneles que conforman la figura. **A-C** corresponde al tercio anterior del estroma, donde se ubican los troncos nerviosos estromales, **D-H** representan las fibras del plexo subbasal, **e I-K**, las terminaciones nerviosas entre las capas más superficiales del epitelio corneal. Las escalas representan 70  $\mu\text{m}$  (**a-c**), 150  $\mu\text{m}$  (**d, e**) o 40  $\mu\text{m}$  (**f-l**).

**Figura 3. Respuesta a rampas de frío de las terminaciones nerviosas termosensibles corneales registradas en ratones TRPM8(-/-), TRPM8(+/-) y TRPA1(-/-), y en ratones silvestres.** **a.** Frecuencia media de disparo (en impulsos/s, panel superior) durante una rampa de enfriamiento (panel inferior) registrada en 143 terminaciones nerviosas de ratones TRPM8(-/-) (línea delgada), 11 terminales de TRPM8(+/-) (línea discontinua) y 12 terminales de ratones silvestres de las mismas camadas (línea continua), prefríos con solución control (izquierda) y en presencia de mentol 50  $\mu\text{M}$  (derecha). **b.** Frecuencia media de disparo de 11 terminaciones termosensibles registradas en córneas de ratones TRPA1(-/-) (línea delgada) y en 13 terminaciones de córneas de ratones silvestres de las mismas camadas (línea gruesa), durante una rampa de enfriamiento (panel inferior). Los datos son media  $\pm$  error estándar.

**Figura 4. Variación de la tasa de secreción lagrimal con la temperatura corneal.** **a.** Tasa basal de lagrimación, expresada como la longitud media de hilo de rojo fenol humedecido durante 2 minutos, medido en los ojos de ratones anestesiados expuestos a una temperatura ambiente de  $24.8\pm 0.9^\circ\text{C}$  y  $42.5\pm 0.4^\circ\text{C}$ , con una humedad ambiental del  $63.7\pm 0.4\%$  y del  $38.2\pm 1.4\%$ , respectivamente, que modificaron la temperatura corneal hasta los valores indicados en la figura. Las columnas llenas y las sombreadas representan, respectivamente, la tasa de lagrimación en los animales expuestos a una temperatura ambiente neutra ( $24.8^\circ\text{C}$ ) o caliente ( $42.5^\circ\text{C}$ ). El número de medidas de las sucesivas columnas es 35, 11, 23, 9 y 6 observaciones.  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ , test de Mann-Whitney). **b.** Aumento de la tasa de lagrimación medido en animales silvestres (columnas negras) y TRPM8(-/-) (columnas grises), en respuesta a la aplicación durante 30 s de un papel de filtro empapado en capsaicina 1  $\mu\text{M}$  ( $n=12$  y  $15$ ) ó alil-isotiocianato 500  $\mu\text{M}$  (AITC;  $n=10$  y  $6$ ). La primera columna muestra la respuesta a la aplicación del vehículo (DMSO al 0.5% en salino) en animales silvestres ( $n=6$ ). Las medidas de la secreción lagrimal se realizaron 1 minutos después de retirar el papel con la droga. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores basales de lagrimación, empleando el test de Wilcoxon ( $*p<0.05$ ,  $***p<0.001$ ). **c.** Tasa media de lagrimación, expresada como la longitud de hilo de rojo fenol humedecido durante 15 s, medida en los ojos de voluntarios de ambos sexos a temperaturas ambientes de  $18^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  y  $43^\circ\text{C}$ , que produjeron una temperatura corneal de  $32.4\pm 0.4^\circ\text{C}$ ,  $34.2\pm 0.1^\circ\text{C}$  y  $36.0\pm 0.2^\circ\text{C}$ , respectivamente ( $**p<0.01$ , ANOVA para medidas repetidas).

**Descripción Detallada de la invención**

Los inventores de la presente invención han descubierto que, de forma sorprendente, el receptor TRPM8 está implicado en el control de la lagrimación y que su activación usando agonistas del mismo resulta en un aumento de la lagrimación. En concreto, los inventores de la presente invención han descrito que temorreceptores de frío que inervan la cornea en los mamíferos mantienen una actividad tónica de disparo a la temperatura corneal normal, y son exquisitamente sensibles a pequeñas variaciones térmicas de la superficie ocular, como las resultantes de la evaporación de la película lagrimal precorneal que se da en los intervalos entre parpadeos o durante la exposición a ambientes secos. Esta marcada sensibilidad al frío es consecuencia de la elevada expresión de canales TRPM8, que de manera crucial determinan una actividad espontánea basal y el aumento de la frecuencia de disparo en respuesta al enfriamiento. Asimismo, los inventores han observado que la eliminación con técnicas genéticas de los canales TRPM8 reduce a la mitad la secreción lagrimal en ratones. Su silenciamiento parcial por calentamiento de la cornea también reduce la secreción lagrimal en humanos.

Por tanto, TRPM8 es un candidato molecular para la detección de la humedad en las fibras nerviosas termorreceptoras de frío que inervan la superficie ocular expuesta en animales terrestres. Los datos mostrados en esta solicitud (véase ejemplo 1) indican que en las terminales corneales termosensibles, el TRPM8 es crítico para el desarrollo tanto de la actividad espontánea como de la evocada por el frío que resulta en la producción de lágrimas. De esta forma, la estimulación de TRPM8 aumenta la estimulación de la secreción lagrimal por parte de las fibras sensibles al frío por medio de la activación de TRPM8.

Los resultados obtenidos por los autores de la presente invención abren la puerta para el tratamiento de la lagrimación excesiva (epífora) mediante el empleo de distintos agentes que inhiben el receptor TRPM8.

**Segundo uso terapéutico de la invención**

En otro aspecto la invención se relaciona con el uso de un antagonista de TRPM8 o de combinaciones de los mismos para producir un medicamento para el tratamiento o la prevención de la epífora.

En otro aspecto la invención se relaciona con un antagonista de TRPM8 o de combinaciones de los mismos para su uso en el tratamiento o la prevención de la epífora.

En otro aspecto la invención se relaciona con un método para el tratamiento de la epífora en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un antagonista de TRPM8 o de combinaciones de los mismos.

El receptor TRPM8 o "*Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8*", también conocido como el receptor de frío y mentol 1 (*cold and menthol receptor 1* o CMR1), es una proteína que en humanos está codificada por el gen TRPM8. (Clapham DE, et al. 2005. *Pharmacological Reviews* 57 (4): 427-50).

TRPM8 es un canal iónico que tras ser activado permite la entrada de iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a la célula de manera que se genere una depolarización de la misma que lleva a la generación de un cambio en el potencial de membrana.

La proteína TRPM8 se expresa en neuronas sensoriales y es activada por temperaturas frías (por debajo de aproximadamente 26°C), por agentes químicos como el mentol y por voltaje. TRPM8 también se expresa en la próstata, los pulmones, la vejiga sin que su función en estos órganos sea conocida.

El gen humano de TRPM8 está localizado en el cromosoma 2 en la región 2p37.1; y codifica por una proteína de 1104 aminoácidos (NP\_076985.4, SEQ ID NO: 1) codificada por la secuencia de nucleótidos NM\_024080.4 (SEQ IS NO: 2). El gen TRPM8 presenta seis segmentos trans-membrana estando los términos C y N terminal en el lado citoplasmático. Cuatro subunidades tetramerizan para formar canales activos.

El término "TRPM8" tal y como se usa en esa descripción no se refiere únicamente al gen y a la proteína humanos sino también a los ortólogos de otras especies, como por ejemplo, perro (XP\_543296.2), ratón (NP\_599013.1), rata (NP\_599198.2), etc.

El término "tratar" o "tratamiento" designa tanto tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas, en el que el objeto es prevenir o frenar (reducir) un cambio fisiológico indeseado o trastorno, tal como la sequedad en los ojos, la vagina o en la boca. Para el fin de esta invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, sin limitación, alivio de síntomas, reducción de la extensión de la enfermedad, estado patológico estabilizado (concretamente no empeorado), retardo o freno de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico y remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como no detectable. Aquellos sujetos

que necesitan de tratamiento incluyen aquellos sujetos que sufren ya la afección o trastorno, así como aquellos con tendencia a sufrir la afección o trastorno o aquellos en los que ha de prevenirse la afección o trastorno.

Como "método de tratamiento" se entiende la administración a un individuo en necesidad de dicho tratamiento, de una composición farmacéutica que comprende un agonista de TRPM8 según la invención. Por "epífora" se entiende en la presente invención por la existencia de lagrimeo continuo y excesivo. Esta excesiva producción de lagrimas puede estar causada por un estímulo externo que actúa como irritante, por ejemplo exposición al frío, ambientes contaminados, sustancias químicas, cuerpos extraños o úlceras en la córnea. La epífora también puede estar causada por procesos que causen inflamación de la superficie ocular, por ejemplo una conjuntivitis aguda.

En otras ocasiones la causa es un defecto en el sistema de drenaje lagrimal, debido a disposición anormal del párpado (ectropión) u obstrucción a nivel del conducto nasolagrimal o el saco lagrimal. La obstrucción del sistema lagrimal puede ser congénita si está presente desde el nacimiento, en este caso lo más frecuente es que sea debida a la imperforación de la membrana nasolagrimal. Cuando aparece en el adulto, puede deberse a la infección del saco lagrimal o dacriocistitis. A veces el origen de la epífora es la parálisis del nervio facial que produce debilidad del músculo orbicular de los párpados. Otras causas de la epífora son: la enfermedad de Graves-Basedow, el síndrome de Ackerman, alergias a animales, polen etc, conjuntivitis bacteriana y la blefaritis.

Así en una realización particular, la epífora está asociada a una enfermedad seleccionada de: enfermedad de Graves-Basedow, úlceras en la cornea, el síndrome de Ackerman, alergias (animales, polen etc), conjuntivitis bacteriana, la blefaritis, parálisis del nervio facial, ectropión u obstrucción a nivel del conducto nasolagrimal o el saco lagrimal.

En una realización particular, dicho medicamento disminuye la estimulación de la secreción lagrimal por parte de las fibras sensibles al frío por medio de la inactivación de TRPM8.

En la presente invención se entiende por "antagonista del receptor TRPM8" a cualquier molécula que se une específicamente al receptor TRPM8 y que al unirse es capaz de causar una disminución de la actividad del canal TRPM8, es decir que disminuye el flujo de sodio y calcio a través del canal causando una re-polarización de la célula.

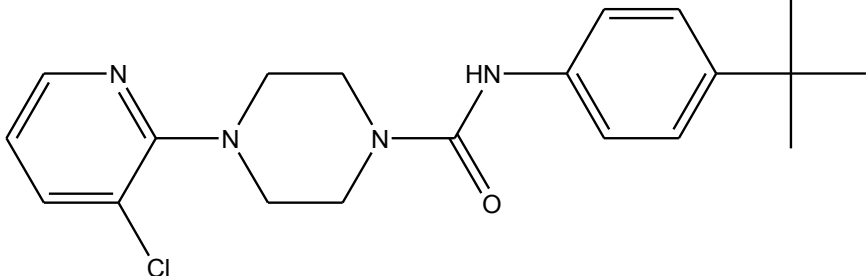
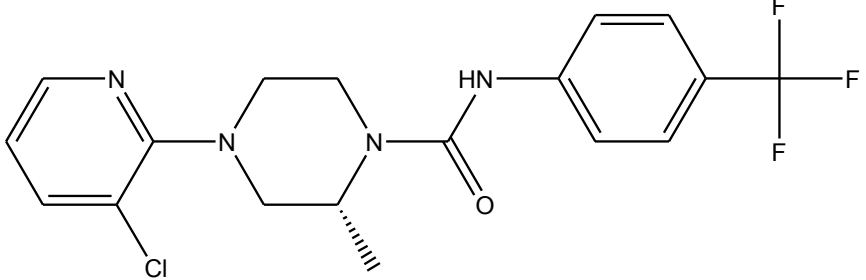
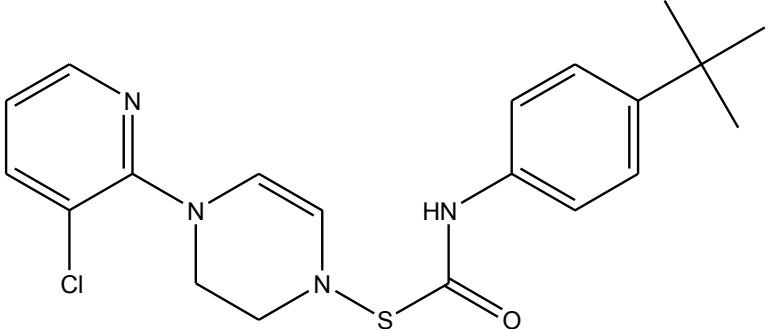
Métodos adecuados para detectar si un compuesto determinado es un antagonista de TRPM8 coinciden con los descritos para detectar la actividad de agonistas del receptor TRPM8. Existe una amplia variedad de ensayos disponibles para detectar la actividad de agonistas del receptor TRPM8, tales como los experimentos de electrofisiológicos de Patch-clamp de célula entera citados en los ejemplos de la presente invención (véase Ejemplo 1), los métodos de microscopia de calcio (Bodding et al., 2007, Cell Calcium, 42, 618-628) y los métodos basados en la detección de fluorescencia en placa "fluorometric imaging plate reader assay" (Behrendt et al., 2004. J.Pharmacol. 141, 737-745), entre otros.

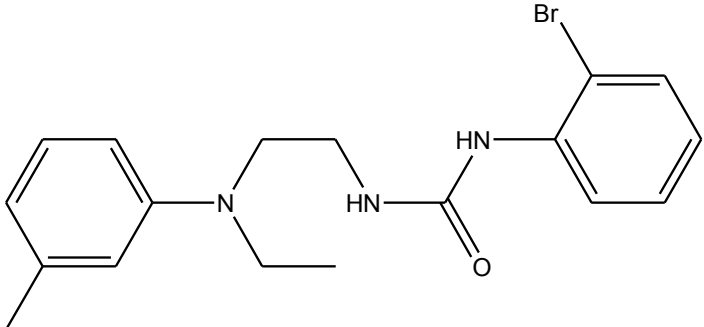
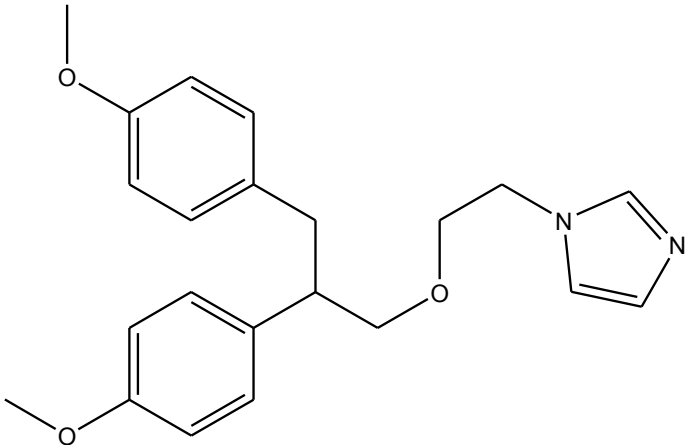
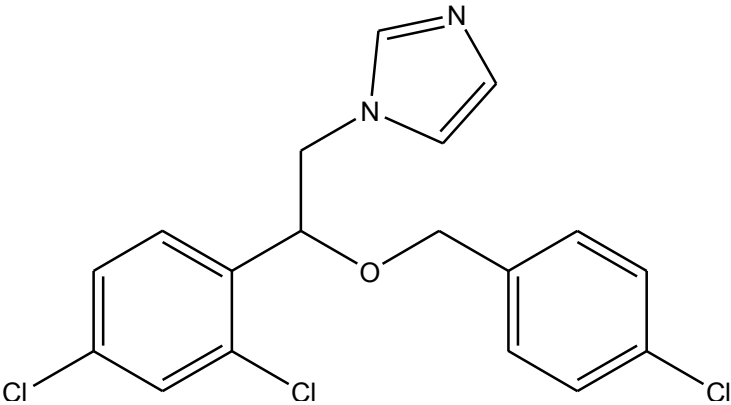
La Tabla 3 recoge ejemplos ilustrativos, no limitativos, de antagonistas de TRPM8 que pueden ser usados en la presente invención. Adicionalmente, los compuestos descritos en la solicitud de patente internacional WO2010/021882 pueden ser usados.

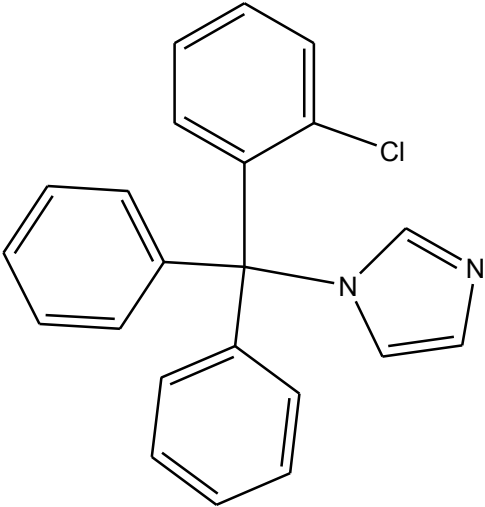
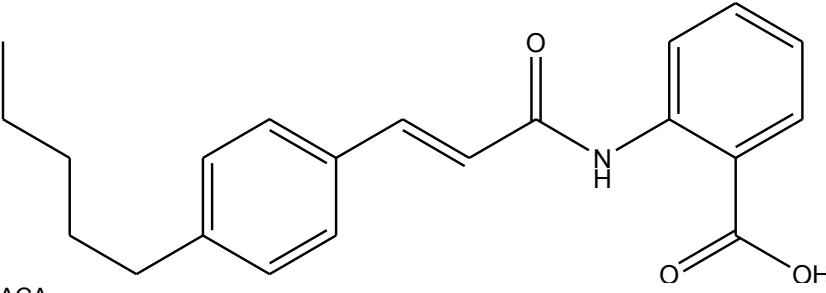
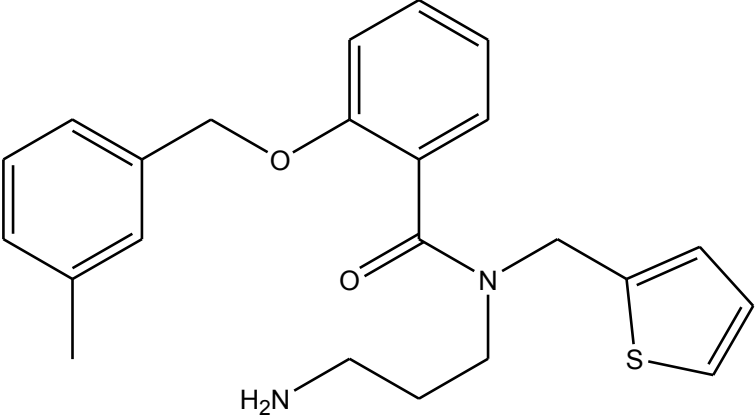
**Tabla 3**

**Antagonistas de TRPM8**

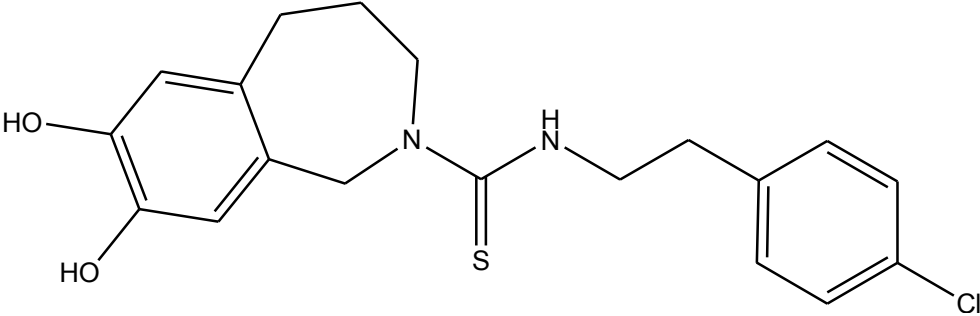
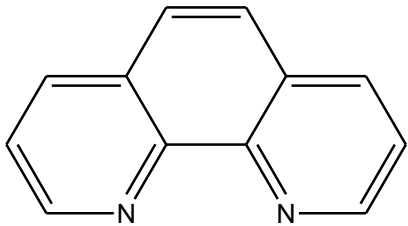
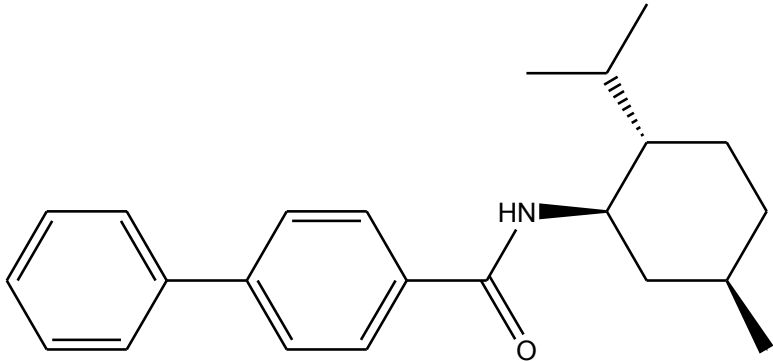
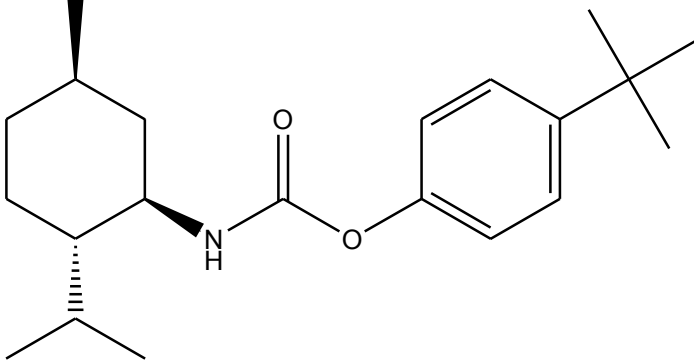
Antagonista	Número
Oligonucleótido antisentido específico para la secuencia del gen que codifica TRPM8.	1
Enzima de ADN específica para la secuencia de TRPM8	2
MicroRNA específico para el gen que codifica TRPM8	3
Ribozima específica para la secuencia del gen que codifica TRPM-8.	4

Antagonista	Número
<p>ARN de interferencia específico para la secuencia del gen que codifica TRPM8.            5'-AGAAAUUCUCGAAUGUUCUUU-3' (sentido) (SEQ ID NO: 3 )            3'- UUUCUUUAAGAGCUUACAAGA-5' (antisentido) (SEQ ID NO: 4)            siRNAs para el TRPM-8 humano. Descritos en Zhang L. et al. (2004. Cancer Research 64:8365-8373).</p> <p>5'-GAAAACACCCAACCTGGTCATTTTC-3' (sentido) (SEQ ID NO: 5)            5'-CACCGTGCGGGTAAAAAGCG-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 6)</p> <p>siRNAs para las secuencias de las posiciones 894 y 2736 (exones 8 y 21):            5'-UCUCUGAGCGCACUAUUCA(dTdT)-3' (sentido) (SEQ ID NO: 7)            5'-UAUCCGUCGGUCAUCUA(dTdT)-3' (sentido) (SEQ ID NO: 8)</p> <p>5'-TCTCTGAGCGCACTATTCA(dTdT)-3' (SEQ ID NO: 9)            Posición 894-912 de la secuencia de TRPM8 (NM_024080.3), descrito en Thebault et al. (2005. Chemistry, 280:39423-39435.)</p>	5
Péptido con capacidad para unirse específicamente a TRPM8 e inhibir su actividad	6
Anticuerpo con capacidad para unirse específicamente a TRPM8 e inhibir la actividad de dicho canal	7
 <p>BCTC            N-(4-tert-butyl-phenyl)-4-(3-cloropiridin-2-yl) tetrahidropirazine-1(2H)-carboxamida</p>	8
 <p>CTPC            (2R)-4-(3-cloro-2-piridinil)-2-metil-N-[4-(trifluorometil)fenil]-1-piperazine-carboxamida</p>	9
 <p>tio-BCTC            N-(4-tert-butyl-phenyl)-4-(3-cloropiridin-2-yl) tetrahidropirazine-1(2H)-(thio) carboxamida</p>	10

Antagonista	Número
 <p data-bbox="188 651 766 707">SB-452533 N-(2-bromofenil)-N'-(2-[etil(3-metilfenil)amino]etil)urea</p>	11
 <p data-bbox="197 1205 884 1285">SKF96365 1-[2-(4-metoxifenil)-2-[3-(4-metoxifenil)propoxi]etil]-1H-imidazol</p>	12
 <p data-bbox="188 1697 847 1765">Econazol 1-[2-[(4-clorofenil)methoxi]-2-(2,4-diclorofenil)etil]-1H-imidazol</p>	13

Antagonista	Número
 <p data-bbox="183 833 622 887">Clotrimazol 1-[(2-chlorofenil)difenilmetil]-1H-imidazol</p>	<p data-bbox="1197 571 1236 604">14</p>
 <p data-bbox="183 1198 574 1256">ACA acido N-(p-amilcinnamoil)anthranilic</p>	<p data-bbox="1197 1052 1236 1086">15</p>
 <p data-bbox="183 1702 965 1756">AMTB N-(3-aminopropil)-2-[[3-metilfenil] metil]oxy)-N-(2-tienilmetil)-benzamida</p>	<p data-bbox="1197 1489 1236 1523">16</p>



Antagonista	Número
 <p>Capsazepina N-[2-(4-clorofenil)etil]-1,3,4,5-tetrahidro-7,8-dihidroxi-2H-2-benzazepina-2-carbotioamida</p>	17
 <p>Fenantrolina</p>	18
 <p>MAD1d N-[(1R,2S,5R)-2-Isopropil-5-metilciclohexil]bifenil-4-carboxamida</p>	19
 <p>MAD2e 4-tert-Butilfenil (1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclohexilcarbamato</p>	20

Compuesto	IC <sub>50</sub> frío (μM)	IC <sub>50</sub> mentol (μM)
BCTC	0.68 ± 0.06 <sup>a(CI)</sup> 0.54 ± 0.04 <sup>a(EP)</sup>	0.47 ± 0.01 <sup>b(CI)</sup> 0.34 ± 0.04 <sup>b(EP)</sup> 0.143 ± 0.019 <sup>f(EP)</sup>
CTPC	N/A	0.131 ± 0.014 <sup>f(EP)</sup>
tio-BCTC	N/A	3.5 ± 1.1 <sup>c(FL)</sup>
SB-452533	N/A	0.571 ± 0.077 <sup>f(EP)</sup>
SKF96365	1.0 ± 0.2 <sup>a(CI)</sup> 0.8 ± 0.1 <sup>a(EP)</sup>	3 ± 1 <sup>b(CI)</sup>
Econazol	0.42 ± 0.07 <sup>d(CI)</sup>	N/A
Clotrimazol	8 ± 1 <sup>d(CI)</sup>	1.2 <sup>e(EP)</sup>
ACA	N/A	3.9 <sup>g(FL)</sup>
AMTB	N/A	6.23 ± 0.02 <sup>h(FL)</sup>
Capsazepina	12 ± 2 <sup>d(CI)</sup>	18 ± 1 <sup>c(FL)</sup>
Phenanthrolina	100 ± 20 <sup>a(CI)</sup> 180 ± 20 <sup>a(EP)</sup>	N/A
MAD1d	N/A	0.02 ± 0.002 <sup>i(SF)</sup>
MAD2e	N/A	0.1 ± 0.02 <sup>j(SF)</sup>

**Tabla 4. Resumen de antagonista de TRPM8.** Potencial inhibitor de diferentes inhibidores del canal TRPM8 nativo en frío o a 100 μM de mentol medidos usando microscopia de calcio (CI), "fluorometric imaging plate reader assay" (FL), espectrofluorimetro (SF) o electrofisiología patch-clamp (EP). Los datos son de : <sup>a</sup>{Malkia, et al. 2007 J Physiol. 581(Pt 1):155-74.}; <sup>b</sup>modificado por {Madrid, 2006 J Neurosci. 26(48):12512-25.}; <sup>c</sup>{Behrendt, et al. 2004 Br J Pharmacol. 141(4):737-45}; <sup>d</sup>{Malkia, et al. 2009 Mol Pain. 5:62.}; <sup>e</sup>{Meseguer, et al. 2008. J Neurosci. 28(3):576-86.}; <sup>f</sup>{Weil, 2005 Mol Pharmacol. 68(2):518-27.}; <sup>g</sup>{Kraft, et al. 2006 Br J Pharmacol. 148(3):264-73}, <sup>h</sup>{Lashinger, et al. 2008 Am J Physiol Renal Physiol. 295(3):F803-10.}, <sup>i</sup>{Ortar, et al. 2010 Bioorg Med Chem Lett. 20(9):2729-32}. Datos de patch-clamp de célula entera están dados como +80 mV<sup>a,b</sup>, +50 mV<sup>e</sup>, or -70 mV<sup>f</sup>. Nota: los resultados de AMTB fueron obtenidos con icilina en vez de con mentol. Los resultados para MAD1d y MAD2e se obtuvieron con 20 μM menthol a 22°C.

#### Oligonucleótidos antisentido

En una realización particular, se utiliza un oligonucleótido antisentido específico para inhibir la expresión del gen que codifica TRPM8, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción del ácido nucleico que codifica TRPM8 (cuya actividad se desea inhibir). Los oligonucleótidos antisentido se pueden unir a su diana potencial mediante complementariedad de bases convencional, o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN bicatenario, a

través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Para su empleo en la presente invención, una construcción que comprende un oligonucleótido antisentido se puede distribuir, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica TRPM8. Alternativamente, la construcción antisentido es una sonda de oligonucleótidos que se genera *ex vivo* y que, cuando se introduce en la célula, produce inhibición de la expresión génica hibridando con el ARNm y/o secuencias genómicas del ácido nucleico diana. Tales sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados, que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y que son por lo tanto estables *in vivo*. Moléculas de ácidos nucleicos ilustrativas para su uso como oligonucleótidos antisentido incluyen análogos de ADN de fosforamidato, fosfotionato y metilfosfonato (véanse, por ejemplo, US5176996, US5264564 y US5256775). Adicionalmente, para una revisión de las aproximaciones generales para construir oligómeros útiles en terapia antisentido véanse, por ejemplo, Van der Krol et al., *BioTechniques* 6: 958-976, 1988; y Stein et al., *Cancer Res* 48: 2659-2668, 1988.

Respecto al oligonucleótido antisentido, son preferidas las regiones de oligodesoxirribonucleótidos derivadas del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre -10 y +10 del gen diana. Las aproximaciones antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (bien ADN o bien ARN) complementarios al ARNm que codifica el polipéptido diana. Los oligonucleótidos antisentido se unirán a los transcritos de ARNm y evitarán la traducción.

También se podrían usar oligonucleótidos complementarios bien a las regiones 5' ó 3' no traducidas, no codificantes, de un gen en una aproximación antisentido para inhibir la traducción de ese ARNm. Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm deberían incluir el complemento del codón de iniciación AUG. Los oligonucleótidos complementarios a las regiones codificantes del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficaces pero también se podrían usar según la invención. Si están diseñados para hibridar con la región 5', 3' o codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos 6 nucleótidos de longitud y tener preferiblemente menos de alrededor de 100 y más preferiblemente menos de alrededor de 50, 25, 17 ó 10 nucleótidos de longitud.

Preferentemente, se deben realizar estudios *in vitro* para cuantificar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de inhibir la expresión génica. Ventajosamente, dichos estudios utilizarán controles que distingan entre inhibición génica antisentido y efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También se prefiere que esos estudios comparen los niveles del ARN o proteína diana con los de un control interno de ARN o proteína. Los resultados obtenidos usando los oligonucleótidos antisentido se pueden comparar con los obtenidos usando un oligonucleótido control. Se prefiere que el oligonucleótido control sea aproximadamente de la misma longitud que el oligonucleótido a ensayar y que la secuencia del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo que sea necesario para prevenir la hibridación específica a la secuencia diana.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser de ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena sencilla o de cadena doble. El oligonucleótido se puede modificar en la base, en el azúcar o en el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a receptores de células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 648-652, 1987; WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (WO89/10134), agentes intercalantes (Zon, *Pharm. Res.* 1988. 5: 539-549). Para este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente transportador, un agente de corte desencadenado por hibridación, etc.

En algunos casos, puede ser difícil alcanzar las concentraciones intracelulares del oligonucleótido antisentido suficientes para suprimir la traducción de los ARNm endógenos. Por tanto, una aproximación preferida usa una construcción de ADN recombinante en la que se coloca el oligonucleótido antisentido bajo el control de un promotor fuerte de pol III o pol II.

Alternativamente, se puede reducir la expresión del gen diana dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que previenen la transcripción del gen en las células diana en el cuerpo (Helene et al., *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84, 1991).

En ciertas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido son morfolinos antisentido.

#### *Enzimas de ADN*

En otra realización particular, se utiliza una enzima de ADN específica para inhibir la expresión del gen que codifica TRPM8. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecánicas tanto de las tecnologías de los oligonucleótidos antisentido como de las tecnologías de los ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de modo que reconozcan una secuencia diana del ácido nucleico particular (en este caso, la secuencia que

codifica a TRPM8), parecido al oligonucleótido antisentido; sin embargo, de forma similar a la ribozima, son catalíticas y cortan específicamente el ácido nucleico diana.

#### *Ribozimas*

5 En otra realización particular, se utiliza una ribozima específica diseñada para cortar de forma catalítica transcritos de un ARNm diana para prevenir la traducción de los ARNm que codifican TRPM8 cuya actividad se desea inhibir. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar el corte específico de ARN [para una revisión véase Rossi, 1994. *Current Biology* 4: 469-471]. La secuencia de las moléculas de ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias al ARNm diana, y la bien conocida secuencia responsable del corte del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente [véase, por ejemplo, US5093246].

10 Las ribozimas usadas en la presente invención incluyen las ribozimas de cabeza de martillo, las ARN endorribonucleasas, etc. [Zaug et al., 1984. *Science* 224:574-578].

15 Las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para mejorar la estabilidad, direccionamiento, etc.) y se deberían distribuir a células que expresan el gen diana *in vivo*. Un método preferido de distribución implica usar una construcción de ADN que "codifica" la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte de pol III ó pol II, de modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajeros diana endógenos e inhibir la traducción. Puesto que las ribozimas, contrariamente a otras moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una menor concentración intracelular para que sean eficaces.

#### *MicroARNs*

20 En otra realización particular, se utiliza un microARN específico para la secuencia que codifica TRPM8. Como es conocido, un microARN (miARN o miRNA por sus siglas en inglés) es un ARN monocatenario, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, y que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos, utilizando para ello la ruta de ribointerferencia.

#### *ARNi*

25 En otra realización particular, se utiliza un ARN de interferencia (ARNi), tal como un ARN de interferencia pequeño (ARNip) específico para la secuencia que codifica TRPM8 cuya actividad se desea inhibir.

30 Los ARN de interferencia pequeños o ARNip (siRNA en su denominación en inglés) son agentes capaces de inhibir la expresión de un gen diana mediante interferencia del ARN. Un ARNip se puede sintetizar químicamente, o, alternativamente, se puede obtener mediante transcripción *in vitro* o bien se puede sintetizar *in vivo* en la célula diana. Típicamente, los ARNip consisten en una cadena doble de ARN de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud, que puede contener una región protuberante 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos. La longitud de la región protuberante es independiente de la longitud total de la molécula de ARNip. Los ARNip actúan mediante la degradación o el silenciamiento post-transcripcional del mensajero diana.

35 Los ARNip pueden ser los llamados shRNA (short hairpin RNA), caracterizados porque las cadenas antiparalelas que forman el ARNip están conectadas por una región bucle u horquilla. Los shRNAs pueden estar codificados por plásmidos o virus, particularmente retrovirus, y estar bajo el control de promotores tales como el promotor U6 de la ARN polimerasa III.

40 En una realización particular, los ARNip que pueden ser utilizados en la presente invención son sustancialmente homólogos al ARNm del gen que codifica TRPM8 o a la secuencia genómica que codifica dicha proteína. Por "sustancialmente homólogos" se entiende que tienen una secuencia que es suficientemente complementaria o similar al ARNm diana, de forma que el ARNip sea capaz de provocar la degradación de éste por interferencia de ARN. Los ARNip adecuados para provocar dicha interferencia incluyen ARNip formados por ARN, así como ARNip que contienen distintas modificaciones químicas tales como:

- 45
- ARNip en los que los enlaces entre los nucleótidos son distintos a los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosforotioato;
  - conjugados de la cadena de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo;
  - modificaciones de los extremos de las cadenas de ARN, en particular el extremo 3' mediante la modificación con distintos grupos funcionales del hidroxilo en posición 2';

- nucleótidos con azúcares modificados tales como restos O-alquilados en posición 2' tales como 2'-O-metilribosa o 2'-O-fluorosibosa;
- nucleótidos con bases modificadas tales como bases halogenadas (por ejemplo 5-bromouracilo y 5-iodouracilo), bases alquiladas (por ejemplo 7-metilguanósina).

5 Los ARNip y ARNsh que pueden ser utilizados en la presente invención se pueden obtener usando una serie de técnicas conocidas para el experto en la materia. La región de la secuencia de nucleótidos que codifica TRPM8 que se toma como base para diseñar los ARNip no es limitante y puede contener una región de la secuencia codificante (entre el codón de iniciación y el codón de terminación) o, alternativamente, puede contener secuencias de la región no traducida 5' o 3', preferentemente de entre 25 y 50 nucleótidos de longitud y en cualquier posición en posición sentido 3' con respecto al codón de iniciación. Una forma de diseñar un ARNip implica la identificación de los motivos AA(N19)TT, en donde N puede ser cualquier nucleótido en la secuencia que codifica TRPM8, y la selección de aquellos que presenten un alto contenido en G/C. Si no se encuentra dicho motivo, es posible identificar el motivo NA(N21), en donde N puede ser cualquier nucleótido.

10 En una realización particular, el inhibidor de TRPM8 es un ARNi específico para TRPM8, tal como un ARNi específico seleccionado del grupo formado por los ARNi específicos mostrados en la Tabla 3 (5) [SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9].

#### *Péptidos inhibidores*

En otra realización particular, se utiliza un péptido inhibidor de TRPM8 para impedir que dicha proteína ejerza alguna de sus funciones, en particular, el paso de iones de sodio y calcio a través del canal.

20 El término "péptido inhibidor", tal como aquí se utiliza, hace referencia a aquellos péptidos capaces de unirse a TRPM8 e inhibir su actividad según se ha explicado anteriormente, es decir, impedir que los iones de sodio y de calcio pasen a través del canal de TRPM8.

#### *Anticuerpos inhibidores*

25 En otra realización particular, se utiliza un anticuerpo inhibidor de TRPM8 para impedir que dicha proteína ejerza alguna de sus funciones, en particular, que los iones de sodio y calcio pasen a través del canal. Por tanto, un anticuerpo "inhibidor" de TRPM8 tal como aquí se utiliza se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a TRPM8 de manera específica e inhibir el paso de los iones de sodio y calcio a través del canal. Los anticuerpos pueden ser preparados usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la materia. Una vez identificados anticuerpos con capacidad de unión a TRPM8, se seleccionarán aquellos capaces de inhibir la actividad de esta proteína usando un ensayo de identificación de agentes inhibidores [véase, por ejemplo, Metz; S. et al. 2008. J.Biol.Chem. 283:5985-5995].

35 En la presente invención, el término "anticuerpo" ha de ser interpretado de forma amplia e incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos y fragmentos de los mismos (F(ab')<sub>2</sub>, Fab), siempre que sean capaces de reconocer al antígeno de interés, es capaz de unirse específicamente al receptor TRPM8 o al dominio extracelular de dicho receptor. Ejemplos de anticuerpos que pueden emplearse en el contexto de a presente invención son, por ejemplo y sin limitación, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos totalmente humanos, etc.

40 Los anticuerpos policlonales son originalmente mezclas heterogéneas de moléculas de anticuerpos producidas en el suero de animales que han sido inmunizados con un antígeno. Incluyen también anticuerpos policlonales monoespecíficos obtenidos a partir de las mezclas heterogéneas, por ejemplo, mediante cromatografía en una columna con péptidos de un único epítipo del antígeno de interés.

45 Un anticuerpo monoclonal es una población homogénea de anticuerpos específicos para un único epítipo del antígeno. Estos anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante técnicas convencionales ya descritas, por ejemplo en Köhler and Milstein [Nature, 1975; 256:495-397] o Harlow and Lane ["Using Antibodies. A Laboratory Manual" de E. Harlow y D. Lane, Editor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 1998 (ISBN 978-0879695439)].

50 Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación o recombinación de anticuerpos procedentes de distintas especies animales. En una configuración típica pero no limitativa de la invención, el anticuerpo quimérico incluye una parte de un anticuerpo monoclonal, generalmente la región variable (Fv) que incluye los sitios para reconocimiento y unión al antígeno, y la otra parte correspondiente a un anticuerpo humano, generalmente la parte que incluye la región constante y la constante adyacente.

Un anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo o anticuerpos que han sido producidos en animales transgénicos con sistema inmune humano o por inmunización *in vitro* de células inmunes humanas (incluyendo tanto inmunización genética como tradicional con o sin adyuvantes y antígeno puro o no; o mediante cualquier método de exposición del antígeno al sistema inmune) o mediante bibliotecas nativas/sintéticas producidas desde células inmunes humanas. Estos anticuerpos pueden obtenerse y seleccionarse desde animales transgénicos (por ejemplo ratones) en los que se han clonado genes de las inmunoglobulinas humanas y que son inmunizados con el antígeno objetivo (en la presente invención con el receptor TRPM8). Estos anticuerpos pueden obtenerse por selección de regiones variables de cadena simple (scFv) o de unión al antígeno (Fab) humanas presentadas en bibliotecas de fagos (phage display) y posterior clonación e injerto en un anticuerpo humano o mediante cualquier otro método de producción y presentación (display) conocido por el experto en la materia, de las librerías generadas por clonación de las regiones variables de ambas cadenas y posterior combinación/mutación de éstas para generar librerías de anticuerpos.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación e injerto de las regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal murino en un anticuerpo humano en sustitución de sus propias regiones hipervariables CDR.

#### *Compuestos químicos*

En otra realización particular, se utiliza un compuesto químico que disminuye la actividad de TRPM8 cuando se pone en contacto con dicha proteína. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichos compuestos químicos incluyen los compuestos mencionados en la Tabla 3 (8 a 20) e incluyen BCTC, CTPC, tio-BCTC, SB-452533, SKF96365, Econazol, Clotrimazol, ACA, AMTB, Capsazepina, Fenantrolina, MAD1d y MAD2e.

En una realización particular, el antagonista de TRPM8 usado en el segundo uso de la invención es un antagonista seleccionado de: oligonucleótido antisentido específico para la secuencia del gen que codifica TRPM8, enzima de ADN específica para la secuencia de TRPM8, microRNA específico para el gen que codifica TRPM8, ribozima específica para la secuencia del gen que codifica TRPM-8, ARN de interferencia específico para la secuencia del gen que codifica TRPM8, péptido con capacidad para unirse específicamente a TRPM8 e inhibir su actividad, anticuerpo con capacidad para unirse específicamente a TRPM8 e inhibir la actividad de dicho canal, BCTC (N-(4-tert-butil-fenil)-4-(3-cloropiridin-2-yl) tetrahidropirazine-1(2H)-carboxamida), CTPC ((2R)-4-(3-cloro-2-piridinil)-2-metil-N-[4-(trifluorometil)fenil]-1-piperazine-carboxamida), tio-BCTC (N-(4-tert-butil-fenil)-4-(3-cloropiridin-2-yl) tetrahidropirazine-1(2H)-(thio) carboxamida), SB-452533 (N-(2-bromofenil)-N'-(2-[etil(3-metilfenil)amino]etil)urea), SKF96365 (1-[2-(4-metoxifenil)-2-[3-(4-metoxifenil)propoxi]etil-1H-imidazol), Econazol (1-[2-[(4-clorofenil)methoxi]-2-(2,4-diclorofenil)etil]-1H-imidazol), Clotrimazol (1-[(2-clorofenil)difenilmetil]-1H-imidazol), ACA (ácido N-(p-amilcinnamóil)anthranilic), AMTB (N-(3-aminopropil)-2-[[3-metilfenil] metil]oxy)-N-(2-tienilmetil)-benzamida), Capsazepina (N-[2-(4-clorofenil)etil]-1,3,4,5-tetrahidro-7,8-dihidroxi-2H-2-benzazepina-2-carbotioamida), Fenantrolina, MAD1d (N-[(1R,2S,5R)-2-Isopropil-5-metilciclohexil]bifenil-4-carboxamida), MAD2e (4-tert-Butilfenil (1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclohexilcarbamato).

En otra realización particular, el antagonista de TRPM8 es un antagonista específico para TRPM8.

#### Segunda composición de la invención

En otro aspecto la invención se relaciona con una composición (en adelante segunda composición de la invención) que comprende al menos un antagonista de TRPM8 y al menos un fármaco útil para el tratamiento de la epifora y, si se desea, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término "antagonista de TRPM8" ha sido descrito con anterioridad y se usa de la misma manera en relación a la segunda composición de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye aditivos, tales como conservantes, excipientes, cargas, agentes humectantes, aglutinantes, disgregantes, tampones que pueden estar presentes en las composiciones de la invención. Tales aditivos pueden ser, por ejemplo carbonatos de magnesio y calcio, carboximetilcelulosa, almidones, azúcares, gomas, estearato de magnesio o calcio, agentes colorantes o aromatizantes. Existe una amplia variedad de aditivos farmacéuticamente aceptables para las formas de dosificación farmacéuticas y la selección de aditivos apropiados es una materia de rutina para los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica.

La administración de la composición de la invención se puede efectuar por diferentes vías, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal o intrabronquial, y se puede administrar local o sistémicamente o directamente al sitio objetivo. Una revisión de las distintas vías de administración de principio activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede

encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000).

El régimen de dosificación lo determinará el médico y los factores clínicos. Como se sabe bien en medicina, las dosificaciones dependen de muchos factores que incluyen las características físicas del paciente (edad, tamaño, sexo), la vía de administración utilizada, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular empleado y de las propiedades farmacocinéticas del individuo.

Excipientes o vehículos preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (por ejemplo comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas etc.), líquida (por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000).

El término "epífora" se ha descrito en detalle con anterioridad y se usa de la misma manera en el contexto de la presente composición indicando por tanto la epífora que aparece como síntoma en distintos tipos de trastornos tales como la enfermedad de Graves-Basedow, úlceras en la cornea, el síndrome de Ackerman, alergias (animales, polen etc), conjuntivitis bacteriana, la blefaritis, parálisis del nervio facial, ectropión u obstrucción a nivel del conducto nasolagrimal o el saco lagrimal.

En una realización particular, el antagonista de TRPM8 usado en la segunda composición de la invención es un antagonista seleccionado de: oligonucleótido antisentido específico para la secuencia del gen que codifica TRPM8, enzima de ADN específica para la secuencia de TRPM8, microRNA específico para el gen que codifica TRPM8, ribozima específica para la secuencia del gen que codifica TRPM-8, ARN de interferencia específico para la secuencia del gen que codifica TRPM8, péptido con capacidad para unirse específicamente a TRPM8 e inhibir su actividad, anticuerpo con capacidad para unirse específicamente a TRPM8 e inhibir la actividad de dicho canal, BCTC (N-(4-tert-butil-fenil)-4-(3-cloropiridin-2-yl) tetrahidropirazine-1(2H)-carboxamida), CTPC ((2R)-4-(3-cloro-2-piridinil)-2-metil-N-[4-(trifluorometil)fenil]-1-piperazine-carboxamida), tio-BCTC (N-(4-tert-butil-fenil)-4-(3-cloropiridin-2-yl) tetrahidropirazine-1(2H)-(thio) carboxamida), SB-452533 (N-(2-bromofenil)-N'-(2-[etil(3-metilfenil)amino]etil)urea), SKF96365 (1-[2-(4-metoxifenil)-2-[3-(4-metoxifenil)propoxi]etil-1H-imidazol), Econazol (1-[2-[(4-clorofenil)methoxi]-2-(2,4-diclorofenil)etil]-1H-imidazol), Clotrimazol (1-[(2-clorofenil)difenilmetil]-1H-imidazol), ACA (ácido N-(p-amilcinnamoi)anthranilic), AMTB (N-(3-aminopropil)-2-[[3-metilfenil] metil]oxy)-N-(2-tienilmetil)-benzamida), Capsazepina (N-[2-(4-clorofenil)etil]-1,3,4,5-tetrahidro-7,8-dihidroxi-2H-2-benzazepina-2-carbotioamida), Fenantrolina, MAD1d (N-[(1R,2S,5R)-2-Isopropil-5-metilciclohexil]bifenil-4-carboxamida), MAD2e (4-tert-Butilfenil (1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclohexilcarbamato).

Los fármacos útiles para el tratamiento de la epífora son conocidos por el experto en la materia tales como antibióticos, así como las composiciones descritas en los documentos CN101612199A, WO08066644, RU2305517C, CN1775261A, CN1775263A, CN1565501A, CN1199617A y JP57179121A.

En otro aspecto, la invención se relaciona con uso de una segunda composición según la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la epífora. En otro aspecto, la invención se relaciona con una segunda composición según la invención para su uso en el tratamiento de la epífora. En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento de la epífora en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de una segunda composición de la invención.

El siguiente Ejemplo ilustra la invención y no debe ser considerado limitativo del alcance de la misma.

## **EJEMPLO**

Para definir funcionalmente la sensibilidad térmica y la capacidad de codificación de las terminales nerviosas termosensibles, se registró *in vitro* la actividad de impulsos nerviosos (NTI) en la cornea de ratones silvestres (Brock, J. A., et al., 1998. J.Physiol 512:211-217). Las terminaciones nerviosas termorreceptoras se identificaron por su disparo espontáneo de impulsos nerviosos a 34°C cuya frecuencia aumentaba con el enfriamiento y se silenciaba al volver a calentar, así como por su respuesta a la aplicación de mentol (Figura 1A) (Schafer, K., et al., 1986. J.Gen. Physiol 88:757-776). El 72% de las terminaciones sensibles al frío también

respondieron a los pulsos de calor (respuesta paradójica) (Long, R. R. 1977. *J. Neurophysiol.* 40:489-502). (Figura 1A) y a la capsaicina 100nM (el 65%).

La frecuencia espontánea de disparo de las terminaciones nerviosas sensibles al frío a la temperatura basal (34°C) fue de  $4.0 \pm 0.4$  impulsos/s ( $n=55$ ). Las terminales de frío dispararon espontáneamente, tanto potenciales único como, ocasionalmente, en ráfagas de dos o más potenciales de acción a intervalos regulares. Los pulsos de frío desde 34°C hasta 20°C evocaron una descarga de impulsos que aumentaba progresivamente con la reducción de la temperatura, alcanzando una frecuencia pico y disminuyendo la frecuencia de disparo o silenciándose más tarde, al alcanzar los valores de temperatura más bajos (Figuras 1 A y 1 B). El curso temporal de la frecuencia media de disparo y del decremento de temperatura durante las rampas de enfriamiento, registrados en un total de 55 terminales sensibles al frío, se muestra en la Figura 1 B. Los umbrales de temperatura necesarios para evocar un aumento de la frecuencia de disparo durante las rampas de enfriamiento fueron menores de 2°C (valor medio:  $-1.5 \pm 0.2$ °C, Figura 1 C). Alrededor del 30% de las unidades termosensibles aumentaron significativamente su frecuencia de disparo con disminuciones de temperatura de 1°C o incluso menores. El valor medio de la frecuencia pico durante la rampa de enfriamiento fue de  $37.6 \pm 1.8$  imp/s ( $n=55$ ).

La sensibilidad térmica de los termorreceptores de frío corneales, expresada como el cambio en la frecuencia de disparo por cada grado centígrado de decremento de temperatura durante una rampa de enfriamiento continuo, varió entre las unidades registradas. La pendiente media fue  $6.3 \pm 1.0$  impulsos/s/°C ( $n=55$ ) (línea roja en la Figura 1D). También se evaluó la capacidad de las terminales termosensibles para codificar valores sostenidos de temperatura, realizando para ello escalones de temperatura de -2.5°C, entre 34°C y 24°C (Figura 1 E). La disminución inicial de temperatura produjo un incremento transitorio de la frecuencia de disparo, que se adaptaba a continuación a un nuevo valor estable. Las terminales corneales sensibles al frío codificaron la temperatura estática en un amplio rango de temperatura. Las respuesta a las bajas temperaturas se caracterizaron por un aumento de la frecuencia de disparo; un marcado cambio en el patrón de disparo, que pasaba a ser en ráfagas en la mayoría de los casos (Figura 1 E; Tabla 1), y una modificación transitoria de la forma de los potenciales registrados (Brock, J. A., et al., 1998. *J. Physiol* 512:211-217). La figura 1 F resume los cambios medios de frecuencia de disparo estáticos y dinámicos de 10 termorreceptores y muestra la notable sensibilidad de estos receptores sensoriales corneales a pequeños cambios de temperatura.

El mentol (50µM), un activador de las terminaciones sensoriales aferentes sensibles al frío bien conocido, (Schafer, K., et al., 1986. *J. Gen. Physiol.* 88:757-776). aumentó la actividad espontánea en el 98% de las terminaciones estudiadas (Figura 1 A) (desde  $3.4 \pm 0.3$  imp/s a  $18.4 \pm 1.4$  imp/s,  $n=44$ ;  $p < 0.001$ , test de pares). El porcentaje de terminales que presentaban un patrón de disparo en ráfagas a 34°C fue casi diez veces más alto durante la perfusión con mentol (44%) que antes del tratamiento (5%). El mentol sensibilizó la respuesta de las terminales al enfriamiento: en presencia de mentol, las rampas de enfriamiento evocaron un mayor aumento de la frecuencia de disparo, alcanzándose la frecuencia pico a temperaturas más altas (control:  $26.7 \pm 0.5$  °C; mentol:  $28.6 \pm 0.5$  °C,  $n=44$ ;  $p < 0.001$ , test de pares), y silenciándose asimismo a temperaturas más altas (control:  $23.8 \pm 0.4$  °C; mentol:  $25.2 \pm 0.4$  °C,  $n=44$ ;  $p < 0.05$ , test de pares). El BCTC es un potente bloqueante reversible de los canales iónicos TRPM8 in vitro (Madrid, R. et al. 2006. *J Neurosci.* 26:12512-12525, Jordt, S. E. et al. 2004. *Nature* 427:260-265). Se estudió el efecto de una concentración saturante de BCTC (10µM) en las terminaciones sensoriales. La actividad espontánea y los incrementos de frecuencia de disparo evocados por el frío y por el mentol disminuyeron gradualmente y casi se silenciaron completamente tras la perfusión con BCTC durante 90 minutos. Estos efectos del BCTC se observaron también en ratones TRPA1(-/-). El descenso de la actividad fue parcialmente reversible tras retirar el BCTC y no se observó en ausencia de la droga, lo que sugiere que la actividad de las terminales termosensibles depende fundamentalmente de canales TRPM8. A diferencia del efecto estimulante del mentol, el agonista específico TRPA1, alil-isotiocianato (AITC, 100µM) (Bandell, M. et al. 2004. *Neuron* 41:849-857) probado en 28 terminales de frío, no modificó la actividad espontánea ni la evocada por el enfriamiento en 24 de ellas. Sólo 4 unidades sensoriales mostraron un aumento significativo de la frecuencia de disparo durante la perfusión con AITC a temperatura basal (datos no mostrados), lo que sugiere la ausencia o la expresión reducida de canales TRPA1 en la mayoría de las terminales corneales sensibles al frío. En conjunto, estos resultados apoyan la existencia, previamente sugerida, de un solapamiento de la expresión de canales TRPM8 y TRPA1 (Story, G. M. et al. 2003. *Cell* 112:819-829).

La IKD es una corriente de potasio activada por voltaje, tipo shaker, que actúa como freno de la excitabilidad en contra de la activación de las neuronas sensoriales inducida por decrementos de temperatura, contribuyendo a determinar el umbral térmico de los termorreceptores sensoriales (Madrid, R., et al. 2009. *J. Neurosci.* 29:3120-3131). Se empleó el bloqueante de la corriente IKD 4-amino-piridina (4-AP, 100µM) para explorar si esta corriente afectaba la sensibilidad térmica de las terminaciones nerviosas de frío corneales. En tres de las nueve unidades estudiadas, la actividad espontánea aumentó significativamente tras la perfusión con 4-AP, pero no se encontraron cambios paralelos en el umbral de frío de estas terminales. Por el contrario, la frecuencia pico durante la respuesta al enfriamiento disminuyó un  $39 \pm 6\%$  en todas las terminales tratadas con 4-AP, respecto a los valores control ( $p < 0.001$ ,  $n=9$ ). Globalmente, estos datos sugieren que el umbral térmico de las terminaciones nerviosas de frío de la córnea del ratón no está determinado, al menos de manera significativa, por los canales de



potasio tipo shaker Kv1, y que estas terminales pertenecen a neuronas termorreceptoras de frío de bajo umbral (Belmonte, C., et al. 2009. *Exp Brain Res.* 196:13-30).

A continuación, se analizó la presencia, morfología y densidad de fibras nerviosas que, presumiblemente, expresan el canal sensible al frío TRPM8 en la córnea de ratón, utilizando ratones modificados genéticamente para expresar la proteína verde fluorescente (EYFP) bajo el control de las secuencias reguladoras del TRMP8 (ratones TRPM8-EYFP) (Figura 2). Las fibras nerviosas presumiblemente positivas para TRPM8 se distribuían homogéneamente por toda la córnea. Los troncos nerviosos estromales se extendían por el tercio externo de la córnea (Figura 2 A-C). Aproximadamente uno de cada nueve axones estromales resultó positivo para TRPM8 (Figura 2C). Una vez que las ramas del plexo nervioso estromal penetraban la lámina de Bowman, localizada entre el estroma y el epitelio corneal, se ramificaban en varias fibras nerviosas subbasales (fibras en cinta) que transcurrían paralelas unas a otras hacia el centro de la córnea, inmediatamente debajo de las células basales del epitelio (Figura 2 D-H). Algunas fibras subbasales positivas para TRPM8 daban ya terminaciones nerviosas en el propio plexo subbasal (Figura 2 H, punta de flecha). No obstante, la mayoría de ellas daban colaterales que ascendían hacia las capas más superficiales del epitelio corneal, acabando como racimos asimétricos (Figura 2 I-K). A diferencia de las fibras nerviosas no fluorescentes, que presumiblemente eran fibras polimodales y mecanonociceptoras, los axones positivos para TRPM8 se ramificaban escasamente en el epitelio, para acabar en las capas epiteliales más superficiales como un reducido número de terminales en pincel (Figura 2 J-L). Tanto las fibras en cinta subbasales como las terminaciones nerviosas intraepiteliales mostraron, en todos los casos, una morfología arrosariada (Figura 2 H-K). Utilizando tinción por inmunofluorescencia doble contra la proteína verde fluorescente (GFP) y contra los neurofilamentos, se determinó que las supuestas fibras termorreceptoras de frío representaban alrededor del 12% del número total de fibras subbasales y aproximadamente el 10% de las terminaciones nerviosas intraepiteliales superficiales (ver sección de Métodos; Figura 2 C,F,K,L).

Se determinó a continuación la contribución de los canales TRPM8 a la sensibilidad al frío, explorando la descarga de impulsos nerviosos evocada por el enfriamiento en ratones mutantes TRPM8(-/-)-EGFP ki (Dhaka, A. et al. 2007. *Neuron* 54:371-378). Se intentó registrar la actividad eléctrica de las terminaciones termosensibles al frío en 12 córneas TRPM8(-/-). Sin embargo, en los centenares de intentos de registro, en los que la totalidad de la superficie corneal fué explorada repetidamente con la pipeta de registro, sólo se consiguió registrar actividad espontánea en 14 terminaciones nerviosas (Figura 3 A, trazo puntuado). En estos casos, la actividad espontánea registrada fue de baja frecuencia ( $0.6 \pm 0.2$  imp/s,  $n=14$ ) y sólo en una de las terminales TRPM8(-/-) se obtuvo un aumento de la frecuencia de disparo durante la rampa de enfriamiento, con un umbral de temperatura de  $28.4^\circ\text{C}$  y una frecuencia pico durante la rampa de 3 imp/s obtenida a  $24.7^\circ\text{C}$ . El mentol es un potente activador de los canales TRPM8 (McKemy, D. D., et al. 2002. *Nature* 416:52-58). La perfusión con mentol  $50\mu\text{M}$  no indujo ningún aumento de la frecuencia de disparo, ni a la temperatura basal de  $34^\circ\text{C}$  ni durante las rampas de enfriamiento ( $n=6$ ) (Figura 3 A, trazo puntuado). Este resultado es coherente con la existencia de una dependencia entre la actividad espontánea y a evocada por el frío, y la expresión del TRPM8 en en las terminales sensibles al frío. La capsaicina ( $100\text{nM}$ ), probada en 6 de las unidades activas registradas en córneas TRPM8(-/-), evocó el disparo de unos pocos impulsos en dos terminales (5 y 8 impulsos, respectivamente), y una vigorosa descarga con una duración de más de 30 s en otra de ellas.

En contraste con la gran inhibición de la actividad espontánea y evocada por frío, observada en los ratones TRPM8(-/-), las terminaciones nerviosas corneales de los ratones TRPA1(-/-) (Kwan, K. Y. et al. 2006. *Neuron*. 50:277-289) mostraron una frecuencia de disparo y una respuesta al frío similar a las de los ratones silvestres (Figura 3 B). Estos resultados confirman que los canales TRPA1 no son determinantes moleculares críticos para la sensibilidad al enfriamiento de las terminaciones nerviosas corneales sensibles al frío. Los resultados son coherentes asimismo con resultados previos de nuestro grupo, obtenidos en neuronas sensoriales del trigémino en cultivo Madrid, R., et al. (*J.Neurosci.*, 2009, 29:3120-3131). Para excluir la posibilidad de que las terminaciones nerviosas termosensibles estuvieran ausentes en las córneas de los ratones TRPM8(-/-), o presentaran una morfología alterada, éstas se tiñeron con anticuerpos anti-GFP, a fin de visualizar la morfología de las fibras nerviosas que expresaban los canales TRPM8 truncados (Dhaka, A., et al. 2008. *J.Neurosci.* 28:566-575. La distribución de las fibras teñidas en diferentes regiones de la circunferencia corneal fue variable de un animal TRPM8(-/-) a otro. No obstante, la morfología general de las fibras en cinta sub-basales y los racimos de terminaciones nerviosas intraepiteliales fue en todos los casos similar a las de las fibras de los ratones TRPM8-EYFP. Además, no se encontraron diferencias significativas en la densidad total de terminaciones nerviosas, lo que excluye la posibilidad de que la ausencia de actividad y de respuesta a frío observada en los experimentos de electrofisiología se debiera a que la pipeta de registro no alcanzaba las terminaciones.

Adicionalmente se exploró la actividad evocada por el frío en córneas de ratones TRMP8(+/-), en los que presumiblemente la respuesta al enfriamiento debería estar reducida debido a una menor expresión de canales TRPM8.30 En estos animales, el 30% de las terminales presentaban actividad espontánea pero carecían de respuesta al frío y al mentol, a diferencia de los animales silvestres, en los que era excepcional (7%) encontrar unidades sin sensibilidad al frío que presentaran actividad espontánea. Entre las terminaciones nerviosas activas, la actividad espontánea media a  $34^\circ\text{C}$  fue significativamente más baja que en los animales TRPM8(+/+) ( $2.2 \pm 0.4$  imp/s vs.  $4.4 \pm 0.9$  imp/s;  $n=11$ ;  $p=0.025$ , test de Mann-Whitney), mientras que el umbral de temperatura medido durante

las rampas de frío esto es, la temperatura necesaria para evocar un aumento de la frecuencia de disparo, se estableció en temperaturas de valores más bajos ( $30.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$  vs.  $32.7 \pm 0.4^\circ\text{C}$ ;  $p=0.004$ , test de Mann-Whitney), y la frecuencia pico durante en enfriamiento fue asimismo significativamente más baja en las corneas de ratones TRMP8(+/-) que en las de ratones silvestres ( $19.4 \pm 3.4$  imp/s vs.  $33.8 \pm 3.5$  imp/s;  $p=0.008$ , t de Student) (Figura 3 A, trazo continuo). En los ratones TRMP8(+/-), el mentol ( $50\mu\text{M}$ ) aumentó la frecuencia de disparo a temperatura basal, el umbral de frío y la frecuencia pico, aunque significativamente menos que en los animales TRMP8(+/-) (Figura 3 A, trazo continuo).

A continuación, se planteó que si la producción lagrimal está asociada a la actividad neural de las fibras temrorreceptoras de frío, el flujo basal de lágrimas debe estar disminuido en los animales TRPM8(-/-), en los que la actividad espontánea está prácticamente ausente. La figura 4 A muestra que ese es el caso. El volumen del fluido lagrimal, expresado como la longitud de hilo impregnado con rojo fenol que cambia de color al humedecerse con las lágrimas durante un periodo de 2 minutos, medido en los ratones TRPM8(-/-) en condiciones basales ( $1.5 \pm 0.2$  mm,  $n=23$ ) fue significativamente más bajo que el medido en ratones silvestres ( $3.7 \pm 0.4$  mm,  $n=35$ ;  $p<0.001$ ). Por el contrario, la lagrimación basal de los ratones TRPA1(-/-) no fue significativamente diferente de la media en animales silvestres (Figura 4 A, columnas negras). Por otra parte, la aplicación tópica de capsaicina ( $1\mu\text{M}$ ) y AITC ( $500\mu\text{M}$ ), dos agentes que activan los canales TRPV1 y TRPA1 en los nociceptores polimodales, aumentaron significativamente el flujo lagrimal tanto en ojos de ratones TRPM8(-/-) como silvestres, mientras que el vehículos de ambas drogas no tuvo ningún efecto significativo (Figura 4B).

A continuación se trató de confirmar si la relación entre la temperatura corneal y la tasa basal de lagrimación estaba también presente en el ser humano, para lo que se midió la tasa de lagrimación en 11 voluntarios jóvenes ( $28.9 \pm 1.8$  años) expuestos durante 10 minutos, en sesiones distintas, a temperaturas ambientes de  $18^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  y  $43^\circ\text{C}$  con una humedad constante del 32%. La exposición a esas temperaturas llevó la temperatura de la superficie corneal a unos valores de  $32.4 \pm 0.4^\circ\text{C}$ ,  $34.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$  y  $36.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ , respectivamente. Los valores de temperatura medidos en la superficie corneal fueron significativamente diferentes entre sí ( $p<0.001$ , ANOVA para medidas repetidas). Por el contrario, sólo con la temperatura ambiente de  $43^\circ\text{C}$  se redujo significativamente la tasa de lagrimación ( $17.1 \pm 1.4$  mm, frente a  $22.8 \pm 1.2$  mm a  $25^\circ\text{C}$  ó  $23.2 \pm 2.3$  mm a  $18^\circ\text{C}$ ;  $p=0.006$ ) (Figura 4C). Cuando los sujetos se expusieron a  $43^\circ\text{C}$  (temperatura corneal  $36.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ) con una humedad ambiental del 62.5%, la reducción de la tasa de lagrimación fue la misma ( $17.6 \pm 2.4$  mm) que en con la humedad del 32%. Estos experimentos se remedaron en ratones silvestres y TRPM8(-/-) anestesiados, ubicándolos en las mismas condiciones ambientales empleadas en los experimentos con humanos, esto es, exponiéndolos a temperaturas ambientales altas y neutras en condiciones de humedad ambiental constante. En los ratones silvestres, cuando la temperatura corneal subía hasta  $36.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$  ( $n=11$ ), la lagrimación disminuía hasta  $1.8 \pm 0.4$  mm (Figura 4 A), mientras que en un ambiente con temperatura neutra, la temperatura corneal era de  $27.2 \pm 0.1$  ( $n=6$ ) y la tasa de lagrimación era de  $4.6 \pm 0.8$  mm ( $p=0.017$ , test de Mann-Whitney). Por el contrario, en los ratones TRPM8(-/-) expuestos a condiciones similares, la tasa de flujo lagrimal no se modificaron significativamente al variar la temperatura de la superficie corneal (Figura 4A).

#### **Traducción de los términos en inglés presentes en la Lista de Secuencias**

El término “Artificial Sequence” presente en la Lista de Secuencias significa “Secuencia Artificial”.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un antagonista de TRPM8 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la epífora.
2. Uso según la reivindicación 1, en donde la epífora está asociada a una enfermedad seleccionada de: enfermedad de Graves-Basedow, úlceras en la córnea, el síndrome de Ackerman, alergias (animales, polen etc), conjuntivitis bacteriana, la blefaritis, parálisis del nervio facial, ectropión u obstrucción a nivel del conducto nasolagrimal o el saco lagrimal.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho antagonista disminuye la estimulación de la secreción lagrimal por parte de las fibras sensibles al frío por medio de la inactivación de TRPM8.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el antagonista de TRPM8 se selecciona de los antagonistas de TRPM8 mostrados en la Tabla 3.
5. Uso según la reivindicación 4, en donde el antagonista de TRPM8 se selecciona del grupo formado por: un oligonucleótido antisentido específico para la secuencia del gen que codifica TRPM8, enzima de ADN específica para la secuencia de TRPM8, microRNA específico para el gen que codifica TRPM8, ribozima específica para la secuencia del gen que codifica TRPM-8, ARN de interferencia específico para la secuencia del gen que codifica TRPM8, péptido con capacidad para unirse específicamente a TRPM8 e inhibir su actividad, anticuerpo con capacidad para unirse específicamente a TRPM8 e inhibir la actividad de dicho canal, BCTC (N-(4-tert-butil-fenil)-4-(3-cloropiridin-2-yl) tetrahidropirazine-1(2H)-carboxamida), CTPC ((2R)-4-(3-cloro-2-piridinil)-2-metil-N-[4-(trifluorometil)fenil]-1-piperazine-carboxamida), tio-BCTC (N-(4-tert-butil-fenil)-4-(3-cloropiridin-2-yl) tetrahidropirazine-1(2H)-(thio) carboxamida), SB-452533 (N-(2-bromofenil)-N'-(2-[etil(3-metilfenil)amino]etil)urea), SKF96365 (1-[2-(4-metoxifenil)-2-[3-(4-metoxifenil)propoxi]etil-1H-imidazol), Econazol (1-[2-[(4-clorofenil)methoxi]-2-(2,4-diclorofenil)etil]-1H-imidazol), Clotrimazol (1-[(2-chlorofenil)difenilmetil]-1H-imidazol), ACA (ácido N-(p-amilcinnamoil)anthranilic), AMTB (N-(3-aminopropil)-2-[[3-(metilfenil) metil]oxy]-N-(2-tienilmetil)-benzamida), Capsazepina (N-[2-(4-clorofenil)etil]-1,3,4,5-tetrahidro-7,8-dihidroxi-2H-2-benzazepina-2-carbotioamida), Fenantrolina, MAD1d (N-[(1R,2S,5R)-2-Isopropil-5-metilciclohexil]bifenil-4-carboxamida), MAD2e (4-tert-Butilfenil (1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclohexilcarbamato).
6. Composición que comprende al menos un antagonista de TRPM8 y al menos un fármaco útil para el tratamiento de la epífora y, si se desea, un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Composición según la reivindicación 6, en donde el antagonista de TRPM8 se selecciona de los antagonistas de TRPM8 mostrados en la Tabla 3.
8. Composición según las reivindicaciones 6 ó 7, en donde el antagonista de TRPM8 se selecciona del grupo formado por: un oligonucleótido antisentido específico para la secuencia del gen que codifica TRPM8, enzima de ADN específica para la secuencia de TRPM8, microRNA específico para el gen que codifica TRPM8, ribozima específica para la secuencia del gen que codifica TRPM-8, ARN de interferencia específico para la secuencia del gen que codifica TRPM8, péptido con capacidad para unirse específicamente a TRPM8 e inhibir su actividad, anticuerpo con capacidad para unirse específicamente a TRPM8 e inhibir la actividad de dicho canal, BCTC (N-(4-tert-butil-fenil)-4-(3-cloropiridin-2-yl) tetrahidropirazine-1(2H)-carboxamida), CTPC ((2R)-4-(3-cloro-2-piridinil)-2-metil-N-[4-(trifluorometil)fenil]-1-piperazine-carboxamida), tio-BCTC (N-(4-tert-butil-fenil)-4-(3-cloropiridin-2-yl) tetrahidropirazine-1(2H)-(thio) carboxamida), SB-452533 (N-(2-bromofenil)-N'-(2-[etil(3-metilfenil)amino]etil)urea), SKF96365 (1-[2-(4-metoxifenil)-2-[3-(4-metoxifenil)propoxi]etil-1H-imidazol), Econazol (1-[2-[(4-clorofenil)methoxi]-2-(2,4-diclorofenil)etil]-1H-imidazol), Clotrimazol (1-[(2-chlorofenil)difenilmetil]-1H-imidazol), ACA (ácido N-(p-amilcinnamoil)anthranilic), AMTB (N-(3-aminopropil)-2-[[3-(metilfenil) metil]oxy]-N-(2-tienilmetil)-benzamida), Capsazepina (N-[2-(4-clorofenil)etil]-1,3,4,5-tetrahidro-7,8-dihidroxi-2H-2-benzazepina-2-carbotioamida), Fenantrolina, MAD1d (N-[(1R,2S,5R)-2-Isopropil-5-metilciclohexil]bifenil-4-carboxamida), MAD2e (4-tert-Butilfenil (1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclohexilcarbamato).
9. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la epífora.
10. Uso según la reivindicación 9, en donde la epífora está asociada a una o más de las enfermedades seleccionadas de enfermedad de Graves-Basedow, úlceras en la córnea, el síndrome de Ackerman, alergias (animales, polen etc), conjuntivitis bacteriana, la blefaritis, parálisis del nervio facial, ectropión u obstrucción a nivel del conducto nasolagrimal o el saco lagrimal.

Figura 1

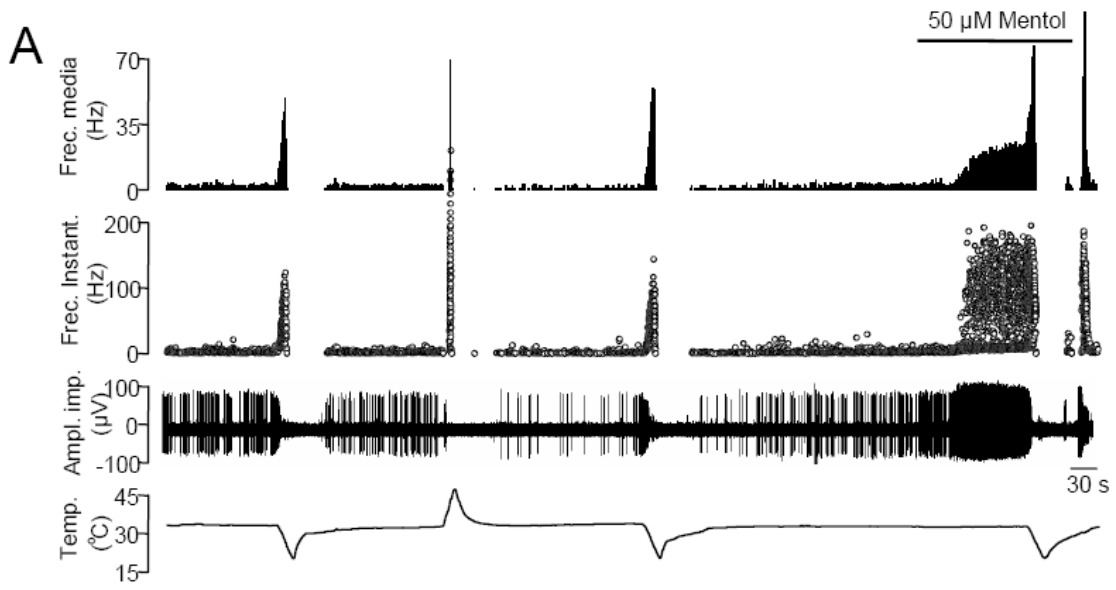


Figura 1 (cont.)

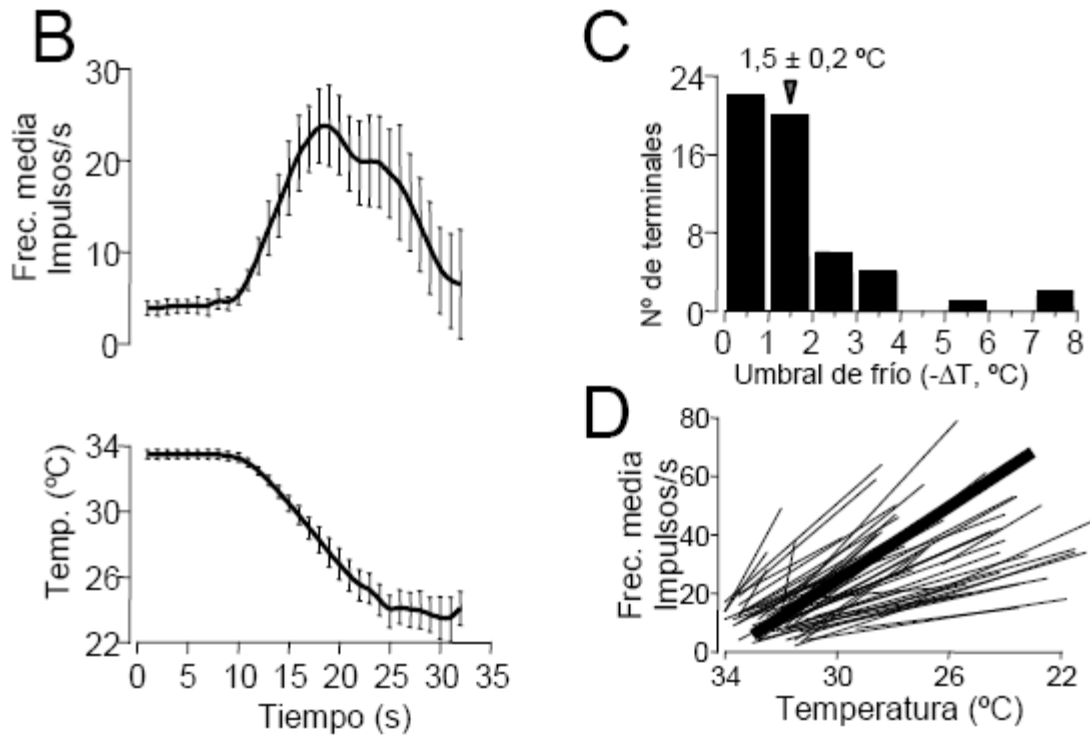


Figura 1 (cont.)

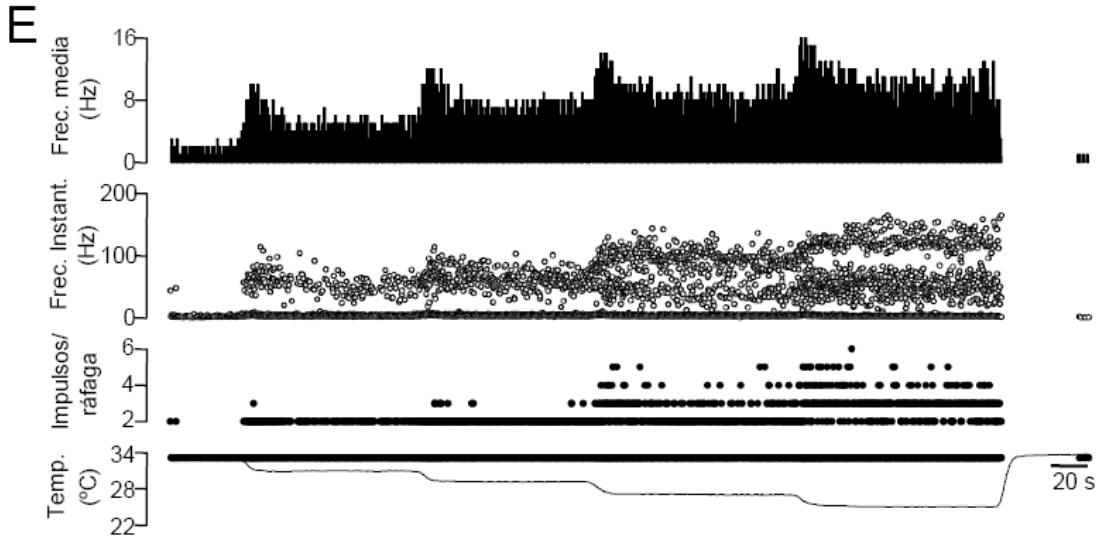


Figura 1 (cont.)

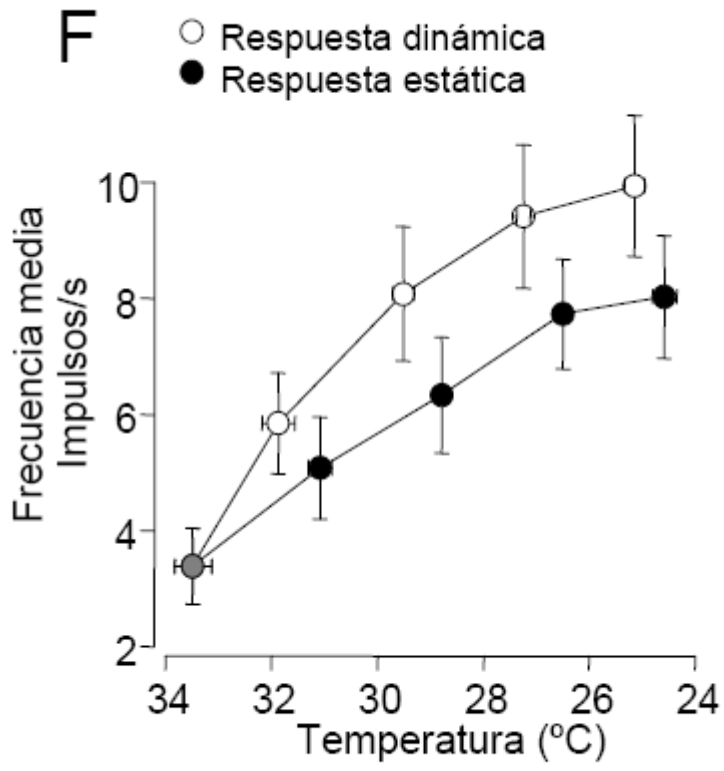


Figura 2

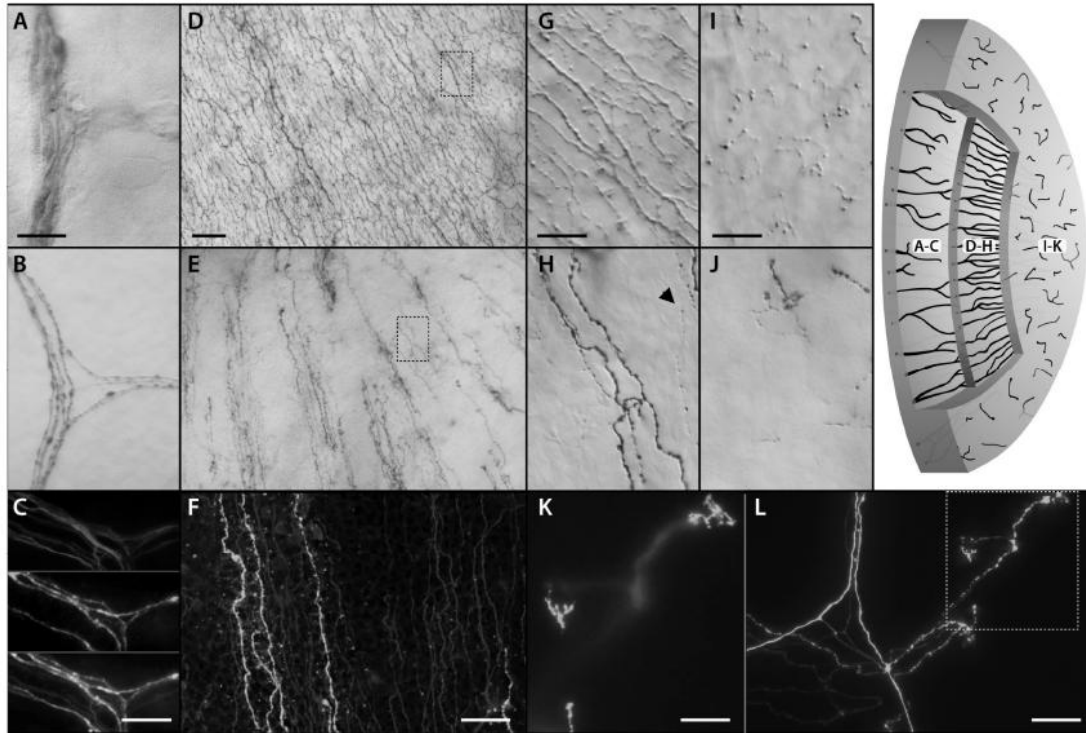




Figura 3

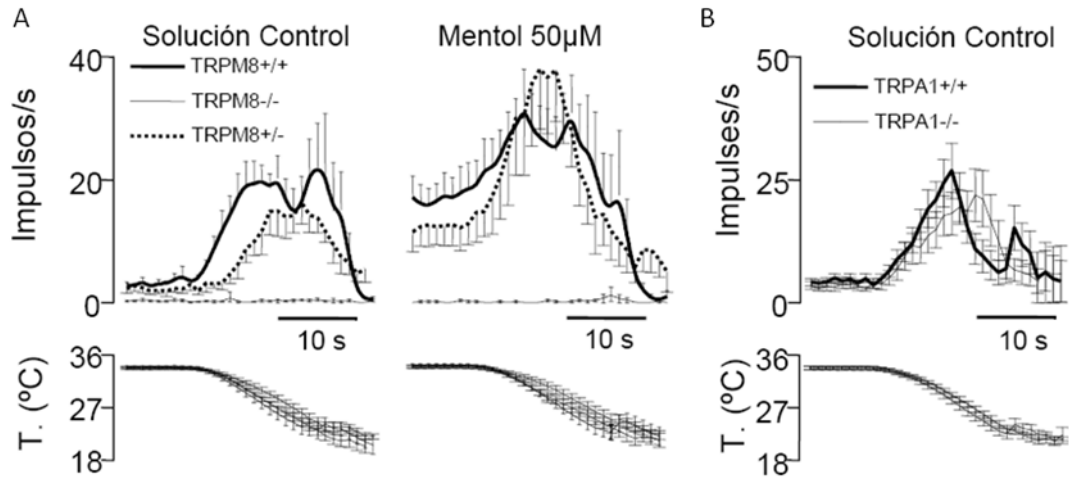


Figura 4A

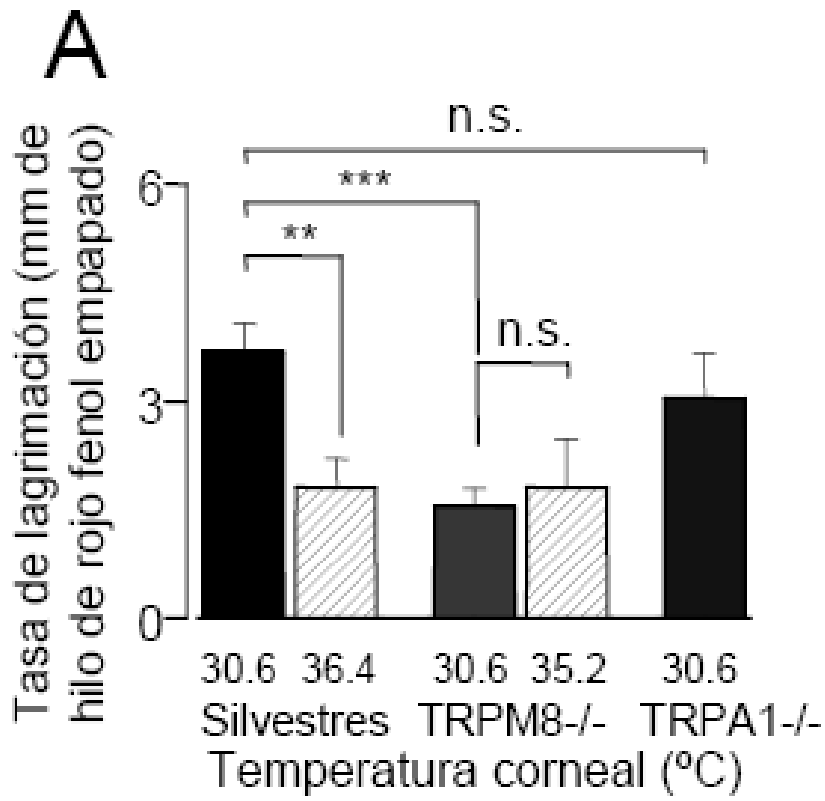


Figura 4B

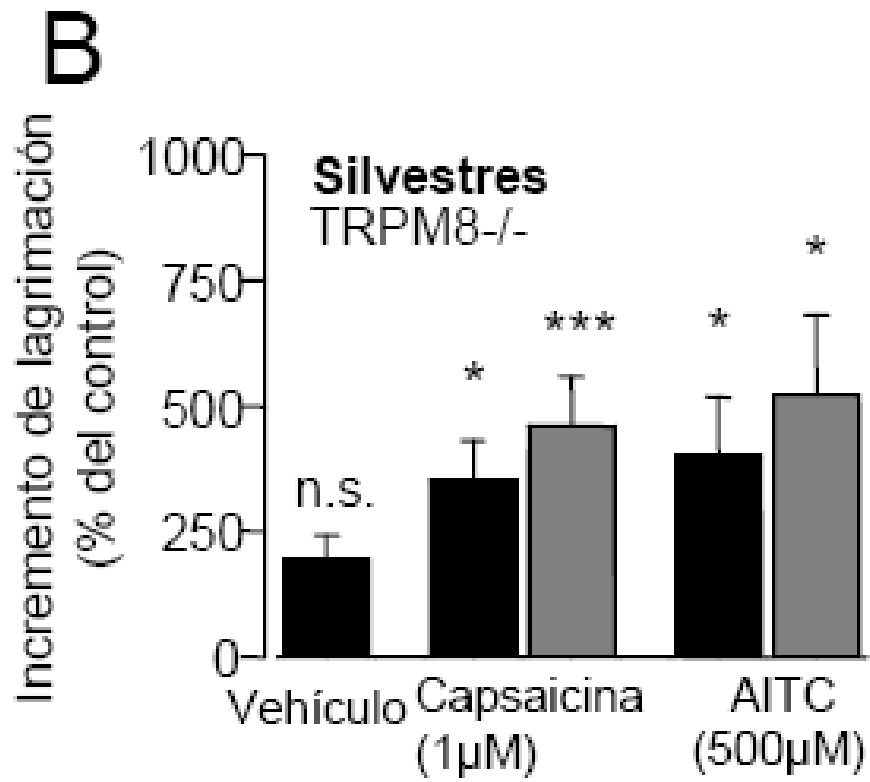
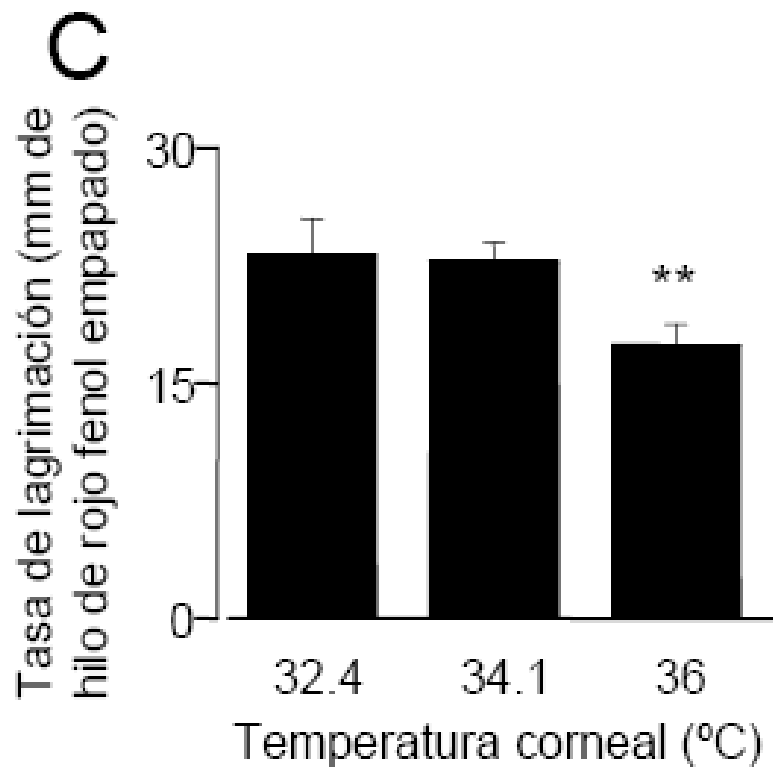


Figura 4C



# ES 2 408 132 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

<120> COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA EPÍFORA

<130> P6082ES01

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 1104  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Phe Arg Ala Ala Arg Leu Ser Met Arg Asn Arg Arg Asn Asp  
1 5 10 15

Thr Leu Asp Ser Thr Arg Thr Leu Tyr Ser Ser Ala Ser Arg Ser Thr  
20 25 30

Asp Leu Ser Tyr Ser Glu Ser Asp Leu Val Asn Phe Ile Gln Ala Asn  
35 40 45

Phe Lys Lys Arg Glu Cys Val Phe Phe Thr Lys Asp Ser Lys Ala Thr  
50 55 60

Glu Asn Val Cys Lys Cys Gly Tyr Ala Gln Ser Gln His Met Glu Gly  
65 70 75 80

Thr Gln Ile Asn Gln Ser Glu Lys Trp Asn Tyr Lys Lys His Thr Lys  
85 90 95

Glu Phe Pro Thr Asp Ala Phe Gly Asp Ile Gln Phe Glu Thr Leu Gly  
100 105 110

Lys Lys Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Ser Cys Asp Thr Asp Ala Glu Ile  
115 120 125

Leu Tyr Glu Leu Leu Thr Gln His Trp His Leu Lys Thr Pro Asn Leu  
130 135 140

Val Ile Ser Val Thr Gly Gly Ala Lys Asn Phe Ala Leu Lys Pro Arg  
145 150 155 160

# ES 2 408 132 B1

Met Arg Lys Ile Phe Ser Arg Leu Ile Tyr Ile Ala Gln Ser Lys Gly  
 165 170 175

Ala Trp Ile Leu Thr Gly Gly Thr His Tyr Gly Leu Met Lys Tyr Ile  
 180 185 190

Gly Glu Val Val Arg Asp Asn Thr Ile Ser Arg Ser Ser Glu Glu Asn  
 195 200 205

Ile Val Ala Ile Gly Ile Ala Ala Trp Gly Met Val Ser Asn Arg Asp  
 210 215 220

Thr Leu Ile Arg Asn Cys Asp Ala Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Gln Tyr  
 225 230 235 240

Leu Met Asp Asp Phe Thr Arg Asp Pro Leu Tyr Ile Leu Asp Asn Asn  
 245 250 255

His Thr His Leu Leu Leu Val Asp Asn Gly Cys His Gly His Pro Thr  
 260 265 270

Val Glu Ala Lys Leu Arg Asn Gln Leu Glu Lys Tyr Ile Ser Glu Arg  
 275 280 285

Thr Ile Gln Asp Ser Asn Tyr Gly Gly Lys Ile Pro Ile Val Cys Phe  
 290 295 300

Ala Gln Gly Gly Gly Lys Glu Thr Leu Lys Ala Ile Asn Thr Ser Ile  
 305 310 315 320

Lys Asn Lys Ile Pro Cys Val Val Val Glu Gly Ser Gly Gln Ile Ala  
 325 330 335

Asp Val Ile Ala Ser Leu Val Glu Val Glu Asp Ala Leu Thr Ser Ser  
 340 345 350

Ala Val Lys Glu Lys Leu Val Arg Phe Leu Pro Arg Thr Val Ser Arg  
 355 360 365

Leu Pro Glu Glu Glu Thr Glu Ser Trp Ile Lys Trp Leu Lys Glu Ile  
 370 375 380

Leu Glu Cys Ser His Leu Leu Thr Val Ile Lys Met Glu Glu Ala Gly  
 385 390 395 400

## ES 2 408 132 B1

```

Asp Glu Ile Val Ser Asn Ala Ile Ser Tyr Ala Leu Tyr Lys Ala Phe
      405                                     410                               415

Ser Thr Ser Glu Gln Asp Lys Asp Asn Trp Asn Gly Gln Leu Lys Leu
      420                                     425                               430

Leu Leu Glu Trp Asn Gln Leu Asp Leu Ala Asn Asp Glu Ile Phe Thr
      435                                     440                               445

Asn Asp Arg Arg Trp Glu Ser Ala Asp Leu Gln Glu Val Met Phe Thr
      450                                     455                               460

Ala Leu Ile Lys Asp Arg Pro Lys Phe Val Arg Leu Phe Leu Glu Asn
      465                                     470                               475                               480

Gly Leu Asn Leu Arg Lys Phe Leu Thr His Asp Val Leu Thr Glu Leu
      485                                     490                               495

Phe Ser Asn His Phe Ser Thr Leu Val Tyr Arg Asn Leu Gln Ile Ala
      500                                     505                               510

Lys Asn Ser Tyr Asn Asp Ala Leu Leu Thr Phe Val Trp Lys Leu Val
      515                                     520                               525

Ala Asn Phe Arg Arg Gly Phe Arg Lys Glu Asp Arg Asn Gly Arg Asp
      530                                     535                               540

Glu Met Asp Ile Glu Leu His Asp Val Ser Pro Ile Thr Arg His Pro
      545                                     550                               555                               560

Leu Gln Ala Leu Phe Ile Trp Ala Ile Leu Gln Asn Lys Lys Glu Leu
      565                                     570                               575

Ser Lys Val Ile Trp Glu Gln Thr Arg Gly Cys Thr Leu Ala Ala Leu
      580                                     585                               590

Gly Ala Ser Lys Leu Leu Lys Thr Leu Ala Lys Val Lys Asn Asp Ile
      595                                     600                               605

Asn Ala Ala Gly Glu Ser Glu Glu Leu Ala Asn Glu Tyr Glu Thr Arg
      610                                     615                               620

Ala Val Glu Leu Phe Thr Glu Cys Tyr Ser Ser Asp Glu Asp Leu Ala
      625                                     630                               635                               640
  
```

ES 2 408 132 B1

Glu Gln Leu Leu Val Tyr Ser Cys Glu Ala Trp Gly Gly Ser Asn Cys  
 645 650 655  
 Leu Glu Leu Ala Val Glu Ala Thr Asp Gln His Phe Ile Ala Gln Pro  
 660 665 670  
 Gly Val Gln Asn Phe Leu Ser Lys Gln Trp Tyr Gly Glu Ile Ser Arg  
 675 680 685  
 Asp Thr Lys Asn Trp Lys Ile Ile Leu Cys Leu Phe Ile Ile Pro Leu  
 690 695 700  
 Val Gly Cys Gly Phe Val Ser Phe Arg Lys Lys Pro Val Asp Lys His  
 705 710 715 720  
 Lys Lys Leu Leu Trp Tyr Tyr Val Ala Phe Phe Thr Ser Pro Phe Val  
 725 730 735  
 Val Phe Ser Trp Asn Val Val Phe Tyr Ile Ala Phe Leu Leu Leu Phe  
 740 745 750  
 Ala Tyr Val Leu Leu Met Asp Phe His Ser Val Pro His Pro Pro Glu  
 755 760 765  
 Leu Val Leu Tyr Ser Leu Val Phe Val Leu Phe Cys Asp Glu Val Arg  
 770 775 780  
 Gln Trp Tyr Val Asn Gly Val Asn Tyr Phe Thr Asp Leu Trp Asn Val  
 785 790 795 800  
 Met Asp Thr Leu Gly Leu Phe Tyr Phe Ile Ala Gly Ile Val Phe Arg  
 805 810 815  
 Leu His Ser Ser Asn Lys Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Arg Val Ile Phe  
 820 825 830  
 Cys Leu Asp Tyr Ile Ile Phe Thr Leu Arg Leu Ile His Ile Phe Thr  
 835 840 845  
 Val Ser Arg Asn Leu Gly Pro Lys Ile Ile Met Leu Gln Arg Met Leu  
 850 855 860  
 Ile Asp Val Phe Phe Phe Leu Phe Leu Phe Ala Val Trp Met Val Ala  
 865 870 875 880



# ES 2 408 132 B1

Phe Gly Val Ala Arg Gln Gly Ile Leu Arg Gln Asn Glu Gln Arg Trp  
                                   885                                  890                                  895

Arg Trp Ile Phe Arg Ser Val Ile Tyr Glu Pro Tyr Leu Ala Met Phe  
                                   900                                  905                                  910

Gly Gln Val Pro Ser Asp Val Asp Gly Thr Thr Tyr Asp Phe Ala His  
                                   915                                  920                                  925

Cys Thr Phe Thr Gly Asn Glu Ser Lys Pro Leu Cys Val Glu Leu Asp  
                   930                                  935                                  940

Glu His Asn Leu Pro Arg Phe Pro Glu Trp Ile Thr Ile Pro Leu Val  
                   945                                  950                                  955                                  960

Cys Ile Tyr Met Leu Ser Thr Asn Ile Leu Leu Val Asn Leu Leu Val  
                                   965                                  970                                  975

Ala Met Phe Gly Tyr Thr Val Gly Thr Val Gln Glu Asn Asn Asp Gln  
                                   980                                  985                                  990

Val Trp Lys Phe Gln Arg Tyr Phe Leu Val Gln Glu Tyr Cys Ser Arg  
                   995                                  1000                                  1005

Leu Asn Ile Pro Phe Pro Phe Ile Val Phe Ala Tyr Phe Tyr Met  
                   1010                                  1015                                  1020

Val Val Lys Lys Cys Phe Lys Cys Cys Cys Lys Glu Lys Asn Met  
                   1025                                  1030                                  1035

Glu Ser Ser Val Cys Cys Phe Lys Asn Glu Asp Asn Glu Thr Leu  
                   1040                                  1045                                  1050

Ala Trp Glu Gly Val Met Lys Glu Asn Tyr Leu Val Lys Ile Asn  
                   1055                                  1060                                  1065

Thr Lys Ala Asn Asp Thr Ser Glu Glu Met Arg His Arg Phe Arg  
                   1070                                  1075                                  1080

Gln Leu Asp Thr Lys Leu Asn Asp Leu Lys Gly Leu Leu Lys Glu  
                   1085                                  1090                                  1095

Ile Ala Asn Lys Ile Lys  
                   1100

# ES 2 408 132 B1

```

<210> 2
<211> 5621
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
aagaaaatcc tgcttgacaa aaaccgtcac ttaggaaaag atgtcctttc gggcagccag      60
gctcagcatg aggaacagaa ggaatgacac tctggacagc acccggacc tgtactccag      120
cgcgtctcgg agcacagact tgtcttacag tgaaagcgac ttggtgaatt ttattcaagc      180
aaatthtaag aaacgagaat gtgtcttctt taccaaagat tccaaggcca cggagaatgt      240
gtgcaagtgt ggctatgccc agagccagca catggaaggc acccagatca accaaaagtga      300
gaaatggaac tacaagaaac acaccaagga atttcctacc gacgcctttg gggatattca      360
gtttgagaca ctggggaaga aaggaagta tatacgtctg tcttgcgaca cggacgcgga      420
aatcctttac gagctgctga cccagcactg gcacctgaaa acaccaacc tggtcatttc      480
tgtgaccggg ggcgccaaga acttcgcctt gaagccgcgc atgcgcaaga tcttcagccg      540
gctcatctac atcgcgcagt ccaaagggtc ttggattctc acgggaggca cccattatgg      600
cctgatgaag tacatcgggg aggtggtgag agataacacc atcagcagga gttcagagga      660
gaatattgtg gccattggca tagcagcttg gggcatggtc tccaaccggg acaccctcat      720
caggaattgc gatgctgagg gctatthttt agcccagtac cttatggatg acttcacaag      780
agatccactg tatatcctgg acaacaacca cacacatttg ctgctcgtgg acaatggctg      840
tcatggacat cccactgtcg aagcaaagct ccggaatcag ctagagaagt atatctctga      900
gcgcactatt caagattcca actatggtgg caagatcccc attgtgtggt ttgcccaagg      960
aggtggaaaa gagactttga aagccatcaa tacctccatc aaaaataaaa ttccttgtgt      1020
ggtggtggaa ggctcggggc agatcgtgta tgtgatcgtc agcctggtgg aggtggagga      1080
tgccctgaca tcttctgccc tcaaggagaa gctggtgcgc tttttacccc gcacggtgtc      1140
ccggctgcct gaggaggaga ctgagagttg gatcaaattg ctcaaagaaa ttctcgaatg      1200
ttctcaccta ttaacagtta ttaaaatgga agaagctggg gatgaaattg tgagcaatgc      1260
catctcctac gctctataca aagccttcag caccagtgag caagacaagg ataactggaa      1320
tgggcagctg aagcttctgc tggagtggaa ccagctggac ttagccaatg atgagattht      1380
caccaatgac cgccgatggg agtctgctga ccttcaagaa gtcatgttta cggctctcat      1440
aaaggacaga cccaagthtg tccgcctctt tctggagaat ggcttgaacc tacggaagtt      1500
tctcacccat gatgtcctca ctgaactctt ctccaaccac ttcagcacgc ttgtgtaccg      1560
gaatctgcag atcgccaaga attcctataa tgatgccctc ctcacgthtg tctggaaact      1620

```

# ES 2 408 132 B1

ggttgcaaac	ttccgaagag	gcttccggaa	ggaagacaga	aatggccggg	acgagatgga	1680
catagaactc	cacgacgtgt	ctcctattac	tccgcacccc	ctgcaagctc	tcttcatctg	1740
ggccattctt	cagaataaga	aggaactctc	caaagtcatt	tgggagcaga	ccaggggctg	1800
cactctggca	gccctgggag	ccagcaagct	tctgaagact	ctggccaaaag	tgaagaacga	1860
catcaatgct	gctggggagt	ccgaggagct	ggctaagag	tacgagacc	gggctgttga	1920
gctgttcaact	gagtgttaca	gcagcgatga	agacttggca	gaacagctgc	tggtctattc	1980
ctgtgaagct	tgggggtggaa	gcaactgtct	ggagctggcg	gtggaggcca	cagaccagca	2040
tttcatcgcc	cagcctgggg	tccagaattt	tctttctaag	caatggtatg	gagagatttc	2100
ccgagacacc	aagaactgga	agattatcct	gtgtctgttt	attataccct	tgggtgggctg	2160
tggctttgta	tcatttagga	agaaacctgt	cgacaagcac	aagaagctgc	tttggtaacta	2220
tgtggcgttc	ttcacctccc	ccttcgtggg	cttctcctgg	aatgtggtct	tctacatcgc	2280
cttctcctg	ctgtttgcct	acgtgctgct	catggatttc	cattcgggtgc	cacaccccc	2340
cgagctggtc	ctgtactcgc	tggtctttgt	cctcttctgt	gatgaagtga	gacagtggta	2400
cgtaaattggg	gtgaattatt	ttactgacct	gtggaatgtg	atggacacgc	tggggctttt	2460
ttacttcata	gcaggaattg	tatttcggct	ccactcttct	aataaaagct	ctttgtattc	2520
tggacgagtc	atcttctgtc	tggactacat	tattttcact	ctaagattga	tccacatttt	2580
tactgtaagc	agaaacttag	gacccaagat	tataatgctg	cagaggatgc	tgatcgatgt	2640
gttcttcttc	ctgttctctc	ttgcgggtgtg	gatgggtggc	tttggcggtg	ccaggcaagg	2700
gatccttagg	cagaatgagc	agcgcctggag	gtggatattc	cgttcgggtca	tctacgagcc	2760
ctacctggcc	atgttcggcc	aggtgcccag	tgacgtggat	ggtaccacgt	atgactttgc	2820
ccactgcacc	ttcactggga	atgagtccaa	gccactgtgt	gtggagctgg	atgagcacia	2880
cctgccccgg	ttccccgagt	ggatcaccat	ccccctgggtg	tgcacttaca	tgttatccac	2940
caacatcctg	ctgggtcaacc	tgctgggtcgc	catgtttggc	tacacggtgg	gcaccgtcca	3000
ggagaacaat	gaccaggctc	ggaagttcca	gaggtacttc	ctggtgcagg	agtactgcag	3060
ccgcctcaat	atccccctcc	ccttcatcgt	cttcgcttac	ttctacatgg	tgggtgaagaa	3120
gtgcttcaag	tgttgctgca	aggagaaaaa	catggagtct	tctgtctgct	gtttcaaaaa	3180
tgaagacaat	gagactctgg	catgggaggg	tgtcatgaag	gaaaactacc	ttgtcaagat	3240
caacacaaaa	gccaacgaca	cctcagagga	aatgaggcat	cgatttagac	aactggatac	3300
aaagcttaat	gatctcaagg	gtcttctgaa	agagattgct	aataaaatca	aataaaactg	3360
tatgaactct	aatggagaaa	aatctaatta	tagcaagatc	atattaagga	atgctgatga	3420

## ES 2 408 132 B1

acaatthttgc tatcgactac taaatgagag atthttcagac ccttggttac atggtggatg	3480
atthttaaate accctagtgt gctgagacct tgagaataaa gtgtgtgatt ggtttcatac	3540
ttgaagacgg atataaagga agaataatthc cthttatgtgt thttccagaa tgggtgcctgt	3600
thttctctgt gtctcaatgc ctgggactgg aggttgatag thtaagtgtg thttaccgc	3660
ctcctthttc cthtaatctt atthttgatg aacacataa taggagaaca thtatcctat	3720
gaataagaac ctggtcatgc thtactcctg tattgttatt thgttcattt ccaattgatt	3780
ctctacttht cctthttttg tattatgtga ctaattagt thcatattgt taaaagtctc	3840
tcaaattagg ccagattcta aaacatgctg cagcaagagg accccgctct cttcaggaaa	3900
agtgtthttca thttctcagga tgcttcttac ctgtcagagg aggtgacaag gcagtctctt	3960
gctctcttgg actcaccagg ctctattga aggaaccacc cccattccta aatatgtgaa	4020
aagtcgcca aatgcaacc thgaaaggca ctactgactt tgttcttatt ggatactcct	4080
cttattatth thccattaaa aataatagct ggctattata gaaaatttag accatacaga	4140
gatgtagaaa gaacataaat tgtccccatt accttaaggt aatcactgct aacaatthct	4200
ggatggthtt tcaagtctat ththtttcta tgtatgtctc aattctctth caaaatthta	4260
cagaatgtta tcatactaca tatatactth thtatgtaagc ththtctactt agtatthtat	4320
caaatatgth thtattatat tcatagcctt cthaaacatt atatcaataa thgcataata	4380
ggcaacctct agcgattacc ataatthttgc tcattgaagg ctatctccag thgatcattg	4440
ggatgagcat cthtgtgcat gaatcctatt gctgtatthg ggaaaattht ccaaggthtag	4500
atthcaataa atatctatth attatthaaat atthaaaat ctatthatta thaaaacct	4560
thataaggct thttcataaa tgtatagcaa ataggaatta thaaacttgag cataagatat	4620
gagatacatg aacctgaact atthaaaataa aatattatat thaaacctta gthtaagaag	4680
aagtcaatat gcttatthta atattatgga tgggtggcgag atcacttgag gtcaggagth	4740
cgagaccagc ctggccaaca tggcaaaacc acatctctac taaaataaa aaaattagct	4800
gggtgtgggtg gtgcactcct gtaatcccag ctactcagaa ggctgaggta caagaattgc	4860
tggaaacctg gaggcggagg thgcagtgaa ccaagattgc acctgac tccagccggg	4920
gtgacagagt gagactccga ctgaaaataa ataaataaat aaataaataa ataaataaat	4980
attatggatg gtgaagggaa tggatataga thggagagat thtcttactg aacacctgta	5040
gtcccagctt thctctggaag tggctgtatt tgagcaggat gtgcacaagg caattgaaat	5100
gcccataatt agthttctcag cthtgaatac actataaact cactggctga aggaggaaat	5160
thtagaagga agctactaaa agatctaat thgaaaaacta caaaagcatt aactaaaaaa	5220

# ES 2 408 132 B1

gtttattttc cttttgtctg ggcagtagtg aaaataacta ctcaacaacat tcactatggt	5280
tgcaaggaat taacacaaat aaaagatgcc tttttactta aacaccaaga cagaaaactt	5340
gcccaatact gagaagcaac ttgcattaga gaggggaactg ttaaatgttt tcaaccagg	5400
tcatctggtg gatgtttttg caggttactc tgagaatttt gcttatgaaa aatcattatt	5460
tttagtgtag ttcacaataa tgtattgaac atacttctaa tcaaagggtgc tatgtccttg	5520
tgtatggtac taaatgtgtc ctgtgtactt ttgcacaact gagaatcctg cagcttggtt	5580
taatgagtgt gttcatgaaa taaataatgg aggaattgtc a	5621

<210> 3  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ARN de interferencia

<400> 3  
 agaaaauucuc gaauguucuu u 21

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ARN de interferencia

<400> 4  
 uuucuuuaag agcuuacaag a 21

<210> 5  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ARN de interferencia

<400> 5  
 gaaaacaccc aacctggtca tttc 24

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> ARN de interferencia

<400> 6

# ES 2 408 132 B1

caccgtgCGG gGtaaaaagc g 21

<210> 7  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ARN de interferencia

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (21)..(22)  
<223> deoxitimidina

<400> 7  
ucucugagcg cacuaucac t 21

<210> 8  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ARN de interferencia

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (18)..(19)  
<223> deoxitimidina

<400> 8  
uaucCGG ucaucac t 19

<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> ARN de interferencia

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (20)..(21)  
<223> deoxitimidina

<400> 9  
tctctgagcg cactattcat t 21



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201131122  
 ②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 08.09.2010  
 ③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2007017092 A1 (BAYER HEALTHCARE AG et al.) 15.02.2007, reivindicaciones.	1-10
A	US 2008214654 A1 (LAMPE THOMAS et al.) 04.09.2008, reivindicaciones.	1-10
A	WO 2010021882 A2 (JANSSEN PHARMACEUTICA NV et al.) 25.02.2010, página 4, líneas 21-30.	1-10
A	WO 03099278 A1 (ALTANA PHARMA AG et al.) 04.12.2003, reivindicaciones.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

<p><b>Fecha de realización del informe</b> 17.04.2013</p>	<p><b>Examinador</b> H. Aylagas Cancio</p>	<p><b>Página</b> 1/4</p>
---	--	------------------------------

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K31/16** (2006.01)  
**A61K31/4164** (2006.01)  
**A61K31/435** (2006.01)  
**A61K31/517** (2006.01)  
**A61K31/55** (2006.01)  
**A61P27/02** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61P, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, XPESP, XPESP2



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.04.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-10	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-10	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007017092 A1 (BAYER HEALTHCARE AG et al.)	15.02.2007
D02	US 2008214654 A1 (LAMPE THOMAS et al.)	04.09.2008
D03	WO 2010021882 A2 (JANSSEN PHARMACEUTICA NV et al.)	25.02.2010
D04	WO 03099278 A1 (ALTANA PHARMA AG et al.)	04.12.2003

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud se refiere al uso de un antagonista de TRPM8 (transient receptor potential cation channel subfamily melastatin member 8) para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la epífora (exceso de secreción de lagrime) asociada a determinadas enfermedades tales como blefaritis, conjuntivitis bacteriana, síndrome de Ackerman, alergias, etc, y a una composición que comprende un antagonista de TRPM8 y al menos un fármaco útil para el tratamiento de la epífora.

Los documentos D1 y D2 se refieren a derivados de benciloxi fenilmetilamida antagonistas del CMR-1 (cold menthol receptor 1) también llamado TRPM8. Se utilizan en el tratamiento de enfermedades urológicas, incontinencia urinaria, hiperplasia benigna prostática, etc.

El documento D3 se refiere a la utilización de antagonistas de TRPM8 para en el tratamiento de enfermedades afectadas por la modulación de los receptores de TRPM8 tales como el dolor, las enfermedades que conducen a tal dolor y disfunciones vasculares o pulmonares (ver página 4, líneas 21-30) .

El documento D4 se refiere al uso de roflumilast en el tratamiento de enfermedades del ojo, entre ellas la epífora (ver reivindicación 3)

De ninguno de los documentos citados ni de ninguna combinación de ellos se deduce la utilización de este grupo de compuestos antagonistas de TRPM8 en el tratamiento de la epífora.

Por lo tanto, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-10 de la presente solicitud tiene novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.