

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 629**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2014** **PCT/EP2014/059247**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014** **WO14180853**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2014** **E 14723045 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020** **EP 2994157**

54 Título: **Compuestos de TAF4 y usos de los mismos para tratar el dolor**

30 Prioridad:

06.05.2013 EP 13305592

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

24.03.2021

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)**

3, rue Michel-Ange

75016 Paris, FR y

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (50.0%)

72 Inventor/es:

MOQRICH, AZIZ;

DELFINI, MARIE-CLAIRE y

MANTILLERI, ANNABELLE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 813 629 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos de TFA4 y usos de los mismos para tratar el dolor

La presente invención se refiere a nuevos compuestos para uso para prevenir, aliviar o tratar el dolor en un sujeto. También se describen en esta memoria composiciones farmacéuticas, su preparación y sus usos, así como métodos para prevenir, aliviar o tratar el dolor usando esos compuestos y composiciones.

Antecedentes de la invención

El dolor es una experiencia sensorial desagradable asociada con un daño tisular real o potencial. Por lo tanto, el dolor es el síntoma más común de diversas lesiones y enfermedades. Existen diferentes clasificaciones del dolor, por ejemplo, dolor nociceptivo, dolor inflamatorio asociado con un daño tisular y la infiltración de células inmunes, dolor patológico que es un estado de enfermedad causado por una lesión en el sistema nervioso (es decir, dolor neuropático) o por su función anormal (dolor disfuncional, como en la fibromialgia, síndrome del intestino irritable, cefalea tensional, etc.). El dolor suele ser transitorio y dura solo hasta que se elimina el estímulo nocivo o el daño subyacente o la patología se ha curado, pero algunas afecciones dolorosas, tales como la artritis reumatoide, la neuropatía periférica, el cáncer y el dolor idiopático (dolor que persiste después de que el trauma o la patología se hayan curado, o que surge sin ninguna causa aparente), pueden persistir durante años. El dolor que dura mucho tiempo se llama crónico, y el dolor que se solventa rápidamente se llama agudo. Tradicionalmente, la distinción entre dolor agudo y crónico se ha basado en un intervalo de tiempo arbitrario desde el inicio; en donde los dos marcadores más utilizados son 3 meses y 6 meses desde el inicio del dolor (Turk, Okifuji, Pain terms and taxonomies of pain; In: Bonica, Loeser, Chapman, Turk, Butler, Bonica's management of pain. Hagerstown: Lippincott Williams & Wilkins, 2001), aunque algunos especialistas e investigadores han situado la transición del dolor agudo al dolor crónico en 12 meses (Spanswick, Main, Pain management: an interdisciplinary approach. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000). Otros emplean agudo para el dolor que dura menos de 30 días, crónico para el dolor durante más de seis meses de duración y subagudo para el dolor que dura de uno a seis meses (Thienhaus, Cole, Classification of pain. In: Weiner, Pain management: a practical guide for clinicians. Boca Raton: CRC Press, 2002). Una definición alternativa popular del dolor crónico, que no implica duraciones fijadas de forma arbitraria, es el "dolor que se extiende más allá del período esperado de curación" (Turk, Okifuji, 2001, Pain terms and taxonomies. In Loeser, Butler, Chapman, et al. Bonica's management of pain, Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-683-30462-3). El dolor crónico se puede clasificar como dolor por cáncer o benigno (Thienhaus, Cole, 2002, Classification of pain. In Weiner, Pain management: A practical guide for clinicians, American Academy of Pain Management, ISBN 0-8493-0926-3).

La sensación de dolor es transmitida al cerebro por neuronas sensoriales que también se denominan nociceptores. Los nociceptores se consideran polimodales ya que pueden responder a múltiples formas de estímulos nocivos o intensos, como el calor, los estímulos mecánicos y químicos. Las fibras sensoriales aferentes de los nociceptores son heterogéneas en muchos aspectos. Por ejemplo, los nervios sensoriales se clasifican como fibras A α , β , δ y C según su diámetro y el grado de mielinización. A continuación, las entradas sensoriales desde la periferia son procesadas y transportadas a regiones cerebrales superiores a través de circuitos complejos que implican interneuronas excitadoras e inhibitoras dentro de la médula espinal (Basbaum et al., 2009; Todd, 2010). El equilibrio entre la excitación y la inhibición es crucial para el mantenimiento de una función sensorial normal, y una disfunción de esos circuitos conduce al desarrollo de dolor, tal como el dolor inflamatorio y neuropático.

El tratamiento del dolor incluye el uso de anestésicos locales, que bloquean la transmisión neuronal y afectan a la percepción, así como al dolor, y analgésicos que alivian el dolor y además pueden interferir con la actividad de mediadores químicos de la inflamación. El dolor agudo generalmente se controla con medicamentos tales como analgésicos y anestésicos. Sin embargo, el control del dolor crónico es mucho más difícil.

La efectividad de los analgésicos depende de cómo son capaces de bloquear los mensajes nerviosos que envían los receptores del dolor al cerebro. Además, tienen un efecto sobre la temperatura corporal para aumentarla (conocida como fiebre) o para disminuirla. Los fármacos analgésicos actúan de varias maneras sobre los sistemas nerviosos periférico y central; incluyen el paracetamol (para-acetilaminofenol, también conocido como acetaminofeno o simplemente APAP), los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) tales como los salicilatos y los fármacos opioides como la morfina y el opio.

El mecanismo de acción exacto del paracetamol/acetaminofeno es incierto, pero parece que actúa de forma centralizada en lugar de periférica (en el cerebro en lugar de en las terminaciones nerviosas). La aspirina y los otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) inhiben las ciclooxigenasas, lo que conduce a una reducción de la producción de prostaglandinas. Esto reduce el dolor y también la inflamación (en contraste con el paracetamol y los opioides). El paracetamol tiene pocos efectos secundarios y se considera seguro, aunque una ingesta superior a la dosis recomendada puede provocar un daño hepático, que puede ser grave y potencialmente mortal, y ocasionalmente daño renal. Los AINEs predisponen a úlceras pépticas, insuficiencia renal, reacciones alérgicas y, en ocasiones, pérdida de audición, y pueden aumentar el riesgo de hemorragia al afectar la función plaquetaria. El uso de aspirina en niños menores de 16 años que padecen una enfermedad vírica, se ha relacionado con el síndrome de Reye, un trastorno hepático raro pero grave. La morfina, el opioide arquetípico y varias otras sustancias (por ejemplo, codeína, oxicodona, hidrocodona, dihidromorfina, petidina), todas ejercen una influencia similar sobre

el sistema de receptores de opioides cerebrales. La dosificación de todos los opioides se puede limitar por la toxicidad de los opioides (confusión, depresión respiratoria, sacudidas mioclónicas y pupilas puntiformes), convulsiones (tramadol), pero no existe un límite de dosis en pacientes que acumulan tolerancia.

La elección de un analgésico también viene determinada por el tipo de dolor: para el dolor neuropático, los analgésicos tradicionales son menos efectivos, y a menudo se benefician las clases de fármacos que normalmente no se consideran analgésicos, tales como los antidepresivos tricíclicos y los anticonvulsivos. Se ha mostrado que los antidepresivos tricíclicos, especialmente la amitriptilina, mejoran el tratamiento del dolor en lo que parece ser una forma central. Nefopam se usa en Europa para aliviar el dolor con opioides simultáneos. El mecanismo exacto de la carbamazepina, gabapentina y pregabalina es igualmente incierto, pero estos anticonvulsivos se usan para tratar el dolor neuropático con diferentes grados de éxito. Los anticonvulsivos se usan más comúnmente para el dolor neuropático, ya que su mecanismo de acción tiende a inhibir la sensación de dolor.

Sin embargo, ciertos productos analgésicos combinados pueden provocar eventos adversos importantes, incluyendo sobredosis accidentales, con mayor frecuencia debido a una confusión que surge de los componentes múltiples (y a menudo no actuantes) de esas combinaciones (Murnion, Combination analgesics in adults. Australian Prescriber (33): 113-5. <http://www.australianprescriber.com/magazine/33/4/113/5>).

Un tratamiento inadecuado del dolor está muy extendido en los quirófanos, las unidades de cuidado intensivo, las salas de accidentes y emergencias, en la práctica general, en el tratamiento de todas las formas de dolor crónico, incluyendo el dolor por cáncer, y en los cuidados terminales. Esa negligencia se extiende a todas las edades, desde recién nacidos hasta ancianos delicados. Los tratamientos mejorados del dolor hasta la fecha están muy solicitados por los pacientes, en particular cuando se consideran dolores neuropáticos, inflamatorios y/o crónicos para los cuales un tratamiento sigue siendo incompleto cualquiera que sea la molécula analgésica conocida seleccionada.

Compendio de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones.

El fin de la presente invención es proporcionar composiciones y métodos novedosos y eficaces para tratar el dolor. En particular, la presente invención propone nuevas composiciones y el uso de dichas composiciones en métodos para prevenir o tratar el dolor, modulando la excitabilidad neuronal.

Un objeto de la invención se refiere más específicamente a una proteína TFAFA4, o a un agonista de la misma, para usar como ingrediente activo para tratar o prevenir el dolor en un sujeto, tal y como se define en las reivindicaciones.

También se describe un método para prevenir o tratar el dolor en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una proteína TFAFA4 o un agonista de la misma, sola o en combinación con uno o varios compuestos activos adicionales, eficaces contra el dolor.

También se describe un kit que comprende i) una proteína TFAFA4 o un agonista de la misma o una composición que comprende una proteína o un agonista de ese tipo, y ii) al menos un compuesto activo distinto adicional, eficaz contra el dolor.

El agonista comprende preferiblemente un fragmento peptídico de una proteína TFAFA4 que modula la excitabilidad de los nociceptores o las interneuronas, preferiblemente de los nociceptores de fibra C (preferiblemente, C-LTMRs) o las interneuronas de la médula espinal (preferiblemente, interneuronas de la lámina IIi de la médula espinal).

A este respecto, un objeto adicional de la invención se refiere a un agonista peptídico de una proteína TFAFA4 tal y como se define en las reivindicaciones.

La invención es adecuada para prevenir o tratar cualquier dolor. En particular, se puede usar para tratar o prevenir el dolor neuropático, el dolor inflamatorio, el dolor mediado por nociceptores, el dolor agudo, el dolor subagudo, el dolor crónico, el dolor somático, el dolor visceral, la alodinia, la hiperalgesia o un dolor asociado con una lesión nerviosa. La invención es particularmente adecuada para tratar el dolor inflamatorio y/o neuropático.

La proteína TFAFA4 o un agonista se puede administrar o aplicar a través de cualquier vía, tal como una vía tópica, oral, anal, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, cutánea, subcutánea, dérmica, transdérmica o intratecal.

Un objeto adicional de la invención se refiere a una composición que comprende una proteína TFAFA4 o un agonista de la misma, tal y como se define en las reivindicaciones, al menos un compuesto activo adicional y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se describe un roedor transgénico que tiene un gen TFAFA4 inactivado de forma dirigida. Esos roedores muestran preferiblemente una hipersensibilidad mecánica y química mejorada y una hiperexcitabilidad neuronal mejorada.

La invención se puede emplear para tratar el dolor en cualquier sujeto mamífero, particularmente en sujetos humanos.

Leyendas de las Figuras

Figura 1: TFAFA4 marca específicamente los C-LTMRs.

(A) Porcentaje de neuronas positivas para TFAFA4 en DRGs de L4 (n = 3; 7,5% ± 1,3%) y T12 (n = 3; 19,2% ± 0,5%) de ratones adultos de tipo silvestre.

5 (B) Representación esquemática de datos de expresión de *Tafa4* en DRGs. Los tamaños de los círculos en el diagrama son aproximadamente proporcionales a los tamaños de las poblaciones celulares representadas por los diferentes marcadores moleculares.

10 (C-H) Hibridación *in situ* de la sonda *Tafa4* en secciones de DRG lumbar (C-F) y torácica (G, H) de ratón adulto, seguida de una inmunotinción o hibridación *in situ* de TrkA (C), cRet (D), *MrgprD* (E), IB4 (lectina IB-4 de *G. simplicifolia* conjugada con fluoresceína) (F), *TH* (G) y EGFP (H). (Barras de escala = 100 µm).

Figura 2: Las neuronas GFP⁺ muestran muchas propiedades de los nociceptores C no mielinizados.

(A) Gráficos de puntos de la capacitancia de la membrana celular (C_m) y la resistencia de entrada (R_{entrada}) de neuronas TFAFA4^{GFP/+} (GFP⁺) neuronas.

15 (B, C) Registros de corrientes Nav1.8, tipo T Ca²⁺, I_KA y h (B) y los histogramas de frecuencia correspondientes (C) en neuronas TFAFA4^{GFP/+}. Se indica el número de neuronas analizadas.

20 (D) Potenciales de acción representativos y respuestas de descarga en neuronas TFAFA4^{GFP/+} evocadas por etapas cortas de despolarización de 2 ms (panel izquierdo) o etapas de despolarización e hiperpolarización de larga duración (panel derecho). Obsérvese la caída mediada por I_h de la hiperpolarización de la membrana y el potencial de recuperación retardado desencadenado por la corriente de Ca²⁺ de tipo T. La línea punteada indica un nivel de 0 mV.

(E) Porcentaje de neuronas GFP⁺ (TFAFA4^{GFP/+}) y GFP⁻ que responden a una variedad de estímulos sensoriales (como se indica). Panel derecho: ejemplos representativos de señales de calcio evocadas en neuronas TFAFA4^{GFP/+} como respuesta a una solución hipotónica aplicada en un baño (200 mOsm/l) y AITC (100 µM)

25 (F) Trazas representativas de corrientes MA provocadas por un estímulo mecánico convencional de 8 µm en 4 neuronas TFAFA4^{GFP/+} diferentes. La velocidad de la sonda mecánica era de 800 µm/s durante el movimiento hacia delante del estímulo mecánico. Potencial de mantenimiento: -100 mV. Panel derecho: distribución de la frecuencia de adaptación rápida (RA), adaptación lenta (SA), adaptación ultralenta (uSA) y corrientes MA mixtas. Datos recopilados sobre 33 neuronas TFAFA4^{GFP/+} y estimuladas con un estímulo mecánico convencional de 8 µm.

30 (G) Propiedad de descarga relacionada con la velocidad de una neurona TFAFA4^{GFP/+}. Obsérvese que la descarga se mejoró ya que los estímulos mecánicos se aplicaron con tasas de inicio lentas (n = 7).

Figura 3: La hipersensibilidad inducida por una lesión del tejido aumenta en ratones TFAFA4-nulos.

(A) Umbral mecánico de ratones TFAFA4-nulos (n = 12) y miembros de una camada WT (n = 11) usando un aparato dinámico de Von Frey, antes y después de la inyección de CFA.

35 (B-E) Curso temporal de la sensibilidad mecánica de ratones TFAFA4-nulos (n = 12) y miembros de una camada WT (n = 7) antes (Día 0) y después de una inyección de carragenano usando 4 filamentos diferentes de calibres crecientes (0,07, 0,4, 0,6 y 1,4 g). El día D+7, la puntuación es antes y 15 minutos después de una inyección intratecal de 2 µg de TFAFA4 recombinante humana.

40 (F-H) Curso temporal de la sensibilidad mecánica después de una constricción del nervio ciático (CCI) de ratones TFAFA4-nulos (n = 12) y miembros de una camada WT (n = 13), usando 3 filamentos diferentes de calibres crecientes (0,07, 0,6 y 1,4 g, n = 15). Las mediciones se determinaron antes (Día 0) y cada 5 días después de la CCI. El día D+30, la puntuación es antes y 15 minutos después de una inyección intratecal de 2 µg de TFAFA4 recombinante humana (ratones TFAFA4-nulos (n = 5), WT (n = 7)).

45 (I, J) Curso temporal y tiempo total (en 2 fases: primera 0-10 min y segunda 10-60 min) empleados en un comportamiento de retroceso, mordisco y lamido después de una inyección de formalina al 2% (WT n = 11 y ratones TFAFA4-nulos n = 12).

(K) La inyección intratecal de 2 µg de TFAFA4 recombinante humana restaura la hipersensibilidad evocada por formalina a los niveles de WT en ratones TFAFA4-nulos (Vehículo n = 8, hTFAFA4 n = 8).

Los datos mostrados son la media ± SEM. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001 para ANOVA unidireccional seguida de una prueba t no emparejada.

50 Figura 4: Excitabilidad de las neuronas laminares Ili en ratones TFAFA4-nulos.

- (A1) Registros representativos que muestran las respuestas de neuronas procedentes de cortes espinales de WT (arriba) o de TFAFA4-nulos (abajo) frente a un impulso de corriente despolarizante (+25) o hiperpolarizante (-25 pA) de 2 s.
- 5 (A2) Cuantificación del número promedio de AP provocado por impulsos de corriente de intensidades crecientes (5 a 50 pA). (ANCOVA, $p < 0,01$).
- (A3) Tasa de descarga promedio en diferentes momentos de la descarga provocada por un impulso de corriente despolarizante de 2 s (+25 pA) en neuronas de la lámina III de ratones WT y TFAFA4-nulos.
- (A4) Número promedio de potenciales de acción de recuperación después de un impulso de corriente hiperpolarizante de 2 s (-50 y -25 pA). (Prueba t, $p < 0,05$).
- 10 (B1) Respuestas de corriente representativas desde neuronas WT y TFAFA4-nulas frente a una rampa de voltaje de ida y vuelta de -40 a -100 mV. Cada traza representa el promedio de 5 respuestas consecutivas. (B2) Cuantificación del pico de la corriente de salida medida al final de la rampa de voltaje ascendente en neuronas laminares III de animales WT y TFAFA4-nulos (prueba t, $p < 0,05$).
- 15 (C1) Respuesta de una neurona laminar III TFAFA4-nula frente a una rampa de voltaje de ida y vuelta en condiciones WT y en presencia de TFAFA4 recombinante 20 nM, TEA (2,5 mM) y 4AP (1 mM).
- (C2) Cuantificación de la corriente de salida medida al final del borde ascendente de la rampa de voltaje en neuronas laminares III TFAFA4. Obsérvese el aumento de la corriente de salida después de la aplicación de TFAFA4 ($p < 0,05$), y el bloqueo de esa corriente por 4AP.
- 20 (D1, D2) Trazas representativas y cuantificación de la corriente de salida en las neuronas laminares III de animales TFAFA4-nulos después de la superfusión en baño de TFAFA5 y TFAFA2 (20 nM cada una).
- (E1) Aparición de una corriente de salida de umbral bajo en WT y después de la superfusión de TFAFA4 recombinante.
- (E2) Ejemplos de neuronas laminares GAD65/67 negativas (izquierda) y positivas (derecha). Las imágenes son planos confocales individuales. Las flechas blancas indican el etiquetado del soma positivo para GAD.
- 25 Figura 5: Generación y presentación de ratones TFAFA4 GFP.
- (A) Representación esquemática de la estrategia basada en BACs de TFAFA4GFP utilizada para desencadenar una recombinación homóloga en el locus *Tafa4* para la generación de ratones con el gen TFAFA4 activado.
- (B-C) Hibridación *in situ* con una sonda de *Tafa4* en secciones de DRG torácicas de adultos procedentes de ratones WT (B) y TFAFA4-nulos (C) ($n = 5$).
- 30 (D) Número total de recuentos neuronales en DRG de WT ($n = 3$, 6209 $\pm$ 385 en T12 y 7616 $\pm$ 173 en L4) y ratones TFAFA4-nulos ($n = 3$, 5933 $\pm$ 324 en T12 y 7805 $\pm$ 439 en L4).
- (E, F) Porcentaje de neuronas positivas para Ret, *TH* TrkA, *TrkB*, TrkC y TFAFA4 en DRG T12 (B) y L4 (C) de ratones adultos WT y TFAFA4-nulos ($n = 3$).
- 35 (G, H) Inmunotinción de GFP en una sección transversal de DRG de recién nacido TFAFA4^{GFP/+} (G) y en una preparación completa de adulto (H).
- (I, I') Inmunotinción de GFP y PKC γ con tinción de IB4 en secciones de la médula espinal lumbar de ratones adultos TFAFA4^{GFP/+} (I) y ratones TFAFA4-nulos (I') ($n > 3$).
- (J, J') Inmunotinción de GFP y S100 en secciones de la piel de la espalda de ratones adultos TFAFA4^{GFP/+} (J) o TFAFA4-nulos (J') ($n > 3$).
- 40 Barras de escala = 100 μ m. $P > 0,1$ para ANOVA unidireccional seguida de una prueba t no emparejada. Las barras de error representan la SEM.
- Figura 6: Los ratones TFAFA4-nulos se comportan normalmente en términos de actividad motora, ansiedad, prurito, hipersensibilidad térmica aguda e inducida por lesiones.
- 45 Los ratones TFAFA4-nulos muestran un fenotipo inalterado en comparación con los ratones miembros de una camada WT con respecto a la ansiedad, con una prueba de campo abierto ($n = 14$ WT, $n = 17$ TFAFA4-nulos) (A), con respecto a la coordinación motora con una prueba en rodillo Rotarod ($n = 22$ WT, $n = 21$ TFAFA4-nulos) (B), con respecto a una prueba de placa caliente ($n = 18$ WT, $n = 17$ TFAFA4-nulos) (C), con respecto a la sensibilidad térmica aguda con prueba de gradiente ($n = 15$ WT, $n = 17$ TFAFA4-nulos) (D), con respecto a una hiperalgesia térmica inducida por CFA ($n = 12$ WT, $n = 14$ TFAFA4-nulos) (E) y con respecto a una prueba de prurito después de la

inyección de 100 µg del agente pruritogénico 48/80 (F). $P > 0,1$ con ANOVA unidireccional seguida de una prueba t no emparejada. Las barras de error representan la SEM.

Figura 7: Propiedades pasivas y corrientes catiónicas de bajo umbral en neuronas laminares Ili TFAFA4-nulas.

5 (A) Valores promedio de potencial de membrana (A1), resistencia de la entrada celular (A2), capacitancia celular (A3) y reobase (A4) en neuronas laminares Ili de animales WT y TFAFA4-nulos.

(B1) Registros representativos que muestran la caída de Ih evocada por un impulso de corriente hiperpolarizante de -25 pA en animales WT y TFAFA4-nulos.

10 (B2) Cuantificación de la caída de Ih promedio evocada por impulsos de corriente hiperpolarizante de -50 y -25 pA. (B3) Relación entre los potenciales máximos y estables durante un impulso hiperpolarizante (intervalo -5 pA -50 pA) en neuronas laminares Ili de animales WT y TFAFA4-nulos.

(C1) Respuestas representativas de corrientes similares al tipo T aisladas de neuronas laminares Ili WT y TFAFA4-nulas evocadas por etapas de voltaje despolarizante de amplitud creciente (25 a 60 mV) desde un potencial de retención de -100 mV.

15 (C2) La cuantificación de las densidades de corriente similares al tipo T revelaba diferencias significativas entre los ratones WT y TFAFA4-nulos (prueba t; $p < 0,05$).

(C3, C4) Corrientes de tipo T medidas en neuronas TFAFA4-nulas antes y después de la aplicación en un baño de TFAFA4 recombinante humana.

Figura 8: Efecto analgésico de la proteína TFAFA4 intratecal *in vivo* en un modelo de dolor con carragenano.

Figura 9: Efecto analgésico de la proteína TFAFA4 intratecal *in vivo* en un modelo de SNI de dolor neuropático.

20 Figura 10: Respuesta de las patas contralaterales después de una inyección intratecal de TFAFA4.

Figura 11: Efecto analgésico de la proteína TFAFA4 subcutánea *in vivo* en un modelo de dolor con carragenano.

Figura 12: Efecto analgésico de la proteína TFAFA4 subcutánea *in vivo* en un modelo de SNI de dolor neuropático.

Figura 13: Efecto analgésico de la proteína TFAFA4 subcutánea *in vivo* en un modelo de SNI de dolor neuropático, 7, 14 y 21 días después de la cirugía.

25 Figura 14: Control del peso.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención proporciona nuevos enfoques terapéuticos para tratar el dolor. Más particularmente, la invención proporciona una nueva solución para controlar eficazmente el dolor, en particular el dolor neuropático y el dolor inflamatorio. Esta solución implica una modulación de la sensibilidad sensorial y/o la excitabilidad neuronal mediante el uso de un compuesto de TFAFA4.

35 TFAFA4 es una pequeña proteína secretada que pertenece a la familia de las proteínas similares a las quimiocinas TFAFA, descubiertas muy recientemente (Tang et al., 2004). TFAFA4 se sintetiza como un precursor de 140 aminoácidos que contiene una secuencia señal de 35 aminoácidos y una cadena madura de 105 aminoácidos. TFAFA4 humana tiene una identidad de aminoácidos del 90% con TFAFA4 de ratón. Un análisis con PCR en tiempo real indica que la expresión del ARNm de TFAFA4 está restringida al sistema nervioso central (SNC), estando el nivel más alto en el tálamo.

40 El documento WO2006/013462 se refiere a varias secuencias de genes y a usos de las mismas. Sin embargo, los usos propuestos de esos genes, particularmente de NsG28, son esencialmente especulativos y se basan simplemente en perfiles de expresión. A este respecto, aunque la referencia menciona el dolor, no existe una justificación para dicho uso y no hay datos experimentales que respalden esa actividad que, al menos para algunos de esos genes, resulta ser errónea. Además, la referencia no describe el efecto o el uso de proteínas aisladas, por lo que un experto en la materia no consideraría ese documento como una enseñanza técnica.

Antes de la presente invención, estaban todavía por determinar las funciones biológicas de los miembros de la familia de TFAFA.

45 Los inventores han demostrado ahora sorprendentemente, por primera vez, que la proteína TFAFA4 está implicada en el control del dolor. Más particularmente, la invención muestra que TFAFA4 se expresa específicamente en un subconjunto particular de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRGs) denominadas C-LTMRs (mecanorreceptores de bajo umbral de fibras C). La invención muestra además que los ratones TFAFA4-nulos presentan una hipersensibilidad química y mecánica sostenida después de una lesión tisular, en donde ambas se pueden revertir mediante la administración de una proteína TFAFA4 recombinante humana.

Los inventores también han demostrado que los ratones TFA4-nulos presentan una hiperexcitabilidad significativa de las neuronas de la lámina II interna de la médula espinal. Sin estar ligados a ninguna teoría, los inventores creen que, como respuesta a estímulos dolorosos, en afecciones patológicas, una actividad neuronal elevada en los C-LTMRs aumenta la secreción de proteína TFA4 que modulará la excitabilidad de interneuronas específicas de la médula espinal a través de la activación de una corriente de umbral bajo.

Curiosamente, los inventores también han demostrado, en la parte experimental, que la proteína TFA4 se puede dirigir específicamente a dianas de señales nociceptivas inducidas mecánica y químicamente, sin dirigirse a señales inducidas por la temperatura. Esta es una ventaja considerable en comparación con los productos conocidos para el tratamiento del dolor que son menos específicos ya que se dirigen también a la nocicepción termoinducida.

Los compuestos y las composiciones de TFA4 de la invención son capaces de activar una nueva vía analgésica modulando la excitabilidad mediada por nociceptores C-LTMRs de las interneuronas de la médula espinal (preferiblemente las interneuronas de la lámina Ili), por ejemplo, mediante una modulación de la actividad de los receptores presentes en dichas interneuronas (tales como canales de iones de potasio, canales de iones de calcio o receptores de lipoproteínas de baja densidad, por ejemplo, LRP1).

La invención se entenderá mejor haciendo referencia a las siguientes definiciones:

Definiciones

Dentro del contexto de la presente invención, la expresión "compuesto de TFA4" indica una proteína TFA4 o un agonista de TFA4 como se define a continuación.

Tal y como se usa en esta memoria, la expresión "proteína TFA4" indica una proteína que pertenece a la familia de proteínas TFA similares a las quimiocinas, que comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (que corresponde a la secuencia de aminoácidos de TFA4 humana), o SEQ ID NO: 2 (que corresponde a la secuencia de aminoácidos TFA4 de ratón), y cualquier variante natural de las mismas (por ejemplo, variantes presentes en otras especies animales, o variantes como resultado de un polimorfismo o corte y empalme). Dentro del contexto de la presente invención, la expresión "proteína TFA4" incluye cualquier proteína que comprende una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 o 2, preferiblemente al menos un 95% de identidad de secuencia o más. Normalmente, una proteína TFA4 es capaz de modular la sensibilidad de los nociceptores y/o la excitabilidad neuronal, tal y como se define a continuación.

Dentro del contexto de la presente invención, la expresión "gen TFA4" indica un gen o un ácido nucleico que codifica una proteína TFA4. En particular, un "gen TFA4" incluye cualquier ácido nucleico que codifica una proteína que comprende SEQ ID NO: 1 o 2, o una variante natural de esa proteína.

La expresión "agonista de TFA4" incluye cualquier sustancia que tenga o medie o regule la actividad de TFA4 (por ejemplo, un péptido, un polipéptido, una proteína recombinante, un conjugado, una quimiocina, un antígeno, un ligando natural o artificial, un homólogo, un ácido nucleico, un ADN, un ARN, un aptámero, etc., o una combinación de los mismos). En particular, los agonistas de TFA4 modulan la actividad de un receptor implicado en la actividad de TFA4, por ejemplo mediante la unión a ese receptor y, por lo tanto, modulando la excitabilidad neuronal. El término "agonista" incluye tanto agonistas parciales como completos. Normalmente, un agonista de TFA4 indica cualquier compuesto que puede modular la sensibilidad de las neuronas sensoriales (preferiblemente C-LTMRs) y/o la excitabilidad de interneuronas (preferiblemente, interneuronas Ili de la médula espinal), en particular mediante la modulación de la actividad de los receptores presentes en dichas neuronas, tal y como se describe en la presente solicitud.

Un agonista de TFA4 incluye cualquier fragmento peptídico de una proteína TFA4 que modula la excitabilidad de los nociceptores o las interneuronas, preferiblemente de nociceptores de fibra C (preferiblemente, C-LTMRs) o interneuronas de la médula espinal (preferiblemente, interneuronas de la lámina Ili de la médula espinal). Dentro del contexto de la presente invención, el agonista de TFA4 es un péptido que comprende un fragmento de menos de 60 residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o y comprende al menos 10 residuos de aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1 o 2, preferiblemente al menos 20, 15, 25, 27, 28 o 30 residuos de aminoácidos consecutivos. En la realización más preferible, ese fragmento es un fragmento que comprende al menos 10, 15, 20, 25, 27, 28 o 30 residuos de aminoácidos consecutivos de la parte N-terminal de la "proteína TFA4" como se ha definido anteriormente. En otra realización, el agonista de TFA4 comprende al menos 10, 15, 20, 25, 27, 28 o 30 residuos de aminoácidos consecutivos de la parte C-terminal de la "proteína TFA4" como se ha definido anteriormente. Ejemplos específicos de un agonista de TFA4 son: (i) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (que corresponde a 25 residuos de aminoácidos de la parte N-terminal de la proteína TFA humana de SEQ ID NO: 1); y (ii) un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (que corresponde a 27 residuos de aminoácidos de la parte C-terminal de la proteína TFA humana de SEQ ID NO: 1). Un agonista de TFA4 de la invención es capaz de modular la sensibilidad de los nociceptores y la excitabilidad neuronal, como en la presente solicitud. La expresión "identidad de secuencia" tal y como se aplica a las secuencias de ácidos nucleicos o proteínas, se refiere a la cuantificación (generalmente el porcentaje) de coincidencias de los residuos de nucleótidos o aminoácidos entre al menos dos secuencias alineadas, utilizando un algoritmo estandarizado, tal como

la alineación de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) J Mol Biol 147:195-197), CLUSTALW (Thompson et al. (1994) Nucleic Acids Res 22:4673-4680) o BLAST2 (Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res 25:3389-3402). BLAST2 se puede utilizar de forma estandarizada y reproducible para insertar huecos en una de las secuencias con el fin de optimizar la alineación y lograr una comparación más válida entre ellas.

El término "dolor", dentro del contexto de la presente invención, se refiere a cualquier dolor o sensibilidad asociados con un daño tisular. Preferiblemente, el término dolor, tal y como se usa en esta memoria, se entiende como una sensibilidad anormal, es decir, normalmente como una hipersensibilidad que está mediada por nociceptores (en particular, por C-LTMRs). El término dolor incluye cualquier dolor seleccionado a partir de un dolor mediado por nociceptores (también denominado dolor nociceptivo), un dolor neuropático, un dolor inflamatorio, un dolor patológico, un dolor agudo, un dolor subagudo, un dolor crónico, un dolor mecánico, un dolor químico, un dolor somático, un dolor visceral, un dolor somático profundo, un dolor somático superficial, un dolor somatomorfo, una alodinia, una hiperalgesia o un dolor asociado con una lesión nerviosa. El dolor "nociceptivo" o el dolor "mediado por nociceptor" se produce como respuesta a la activación de un subconjunto específico de neuronas sensoriales periféricas (nociceptores) a través de estímulos intensos o nocivos. El dolor nociceptivo de acuerdo con la invención, incluye el dolor mecánico (aplastamiento, desgarró, etc.) y el químico (yodo en un corte, polvo de chile en los ojos). Los ejemplos de dolor nociceptivo incluyen, pero no se limitan a, dolor traumático o quirúrgico, dolor de parto, esguinces, fracturas óseas, quemaduras, golpes, hematomas, inyecciones, procedimientos dentales, biopsias de piel y obstrucciones. El dolor nociceptivo incluye dolor visceral, dolor somático profundo y dolor somático superficial. El dolor visceral es difuso, difícil de localizar y a menudo se refiere a una estructura distante, generalmente superficial. Puede estar acompañado de náuseas y vómitos y se puede describir como nauseabundo, profundo, compresivo y sordo. El dolor somático profundo se inicia por una estimulación de los nociceptores en ligamentos, tendones, huesos, vasos sanguíneos, fascias y músculos, y es un dolor sordo, intenso y poco localizado. Ejemplos de dolor somático profundo incluyen esguinces y fracturas de huesos. El dolor superficial se inicia por una activación de los nociceptores en la piel u otro tejido superficial, y es agudo, bien definido y claramente ubicado. Ejemplos de lesiones que producen dolor somático superficial incluyen heridas leves y quemaduras leves (primer grado). El dolor inflamatorio es un dolor que tiene lugar en presencia de un daño tisular o inflamación, incluyendo el dolor postoperatorio, postraumático, el dolor artrítico (reumatoide u osteoartrítico) y el dolor asociado con lesiones en las articulaciones, los músculos y los tendones, como en el dolor lumbar axial. Una inflamación es responsable de la sensibilización de las neuronas sensoriales periféricas, lo que provoca un dolor espontáneo e invalida la hipersensibilidad al dolor. La inflamación tisular patológica aguda o crónica impacta fuertemente en la percepción del dolor al sensibilizar las neuronas sensoriales periféricas, dando lugar a una hipersensibilidad al dolor local e incapacitante. Se sabe que los mediadores inflamatorios mejoran la excitabilidad de las fibras aferentes primarias nociceptivas, en parte modificando la expresión y/o la función de los canales iónicos presentes en las terminaciones nerviosas. El dolor neuropático es un tipo común de dolor crónico no maligno, que es el resultado de una lesión o de un mal funcionamiento en el sistema nervioso periférico o central. El dolor neuropático puede tener diferentes etiologías y puede aparecer, por ejemplo, debido a un traumatismo, cirugía, hernia de un disco intervertebral, lesión de la médula espinal, diabetes, infección con herpes zoster (culebrilla), VIH/SIDA, cáncer en estadio tardío, amputación (incluida una mastectomía), síndrome del túnel carpiano, consumo crónico de alcohol, exposición a una radiación y como un efecto secundario no deseado de agentes de tratamiento neurotóxico, como ciertos fármacos anti-VIH y quimioterapéuticos. A menudo se caracteriza por una alodinia crónica (definida como un dolor resultante de un estímulo que normalmente no provoca una respuesta dolorosa, tal como un toque ligero) e hiperalgesia (definida como una mayor sensibilidad a un estímulo normalmente doloroso), y puede persistir durante meses o años más allá de la aparente curación de cualquier tejido dañado. El dolor también puede aparecer en pacientes con cáncer, lo que puede deberse a múltiples causas; inflamación, compresión, invasión, diseminación metastásica en el hueso u otros tejidos. El dolor también incluye migraña y dolor de cabeza asociado con una activación de las fibras sensoriales que inervan las meninges del cerebro. Preferiblemente, los compuestos de TFA4 de la invención se usan para prevenir o tratar un dolor neuropático y/o inflamatorio.

El "umbral" de un dolor, dentro del contexto de la presente invención, indica el estímulo mínimo necesario para producir dolor. En particular, el umbral de percepción del dolor es el punto en el que el estímulo comienza a doler, y el umbral de tolerancia al dolor se alcanza cuando el sujeto actúa para detener el dolor. Por ejemplo, los umbrales del dolor se miden aumentando gradualmente la intensidad de un estímulo, tal como una corriente eléctrica o calor aplicado al cuerpo.

El término "nociceptores", dentro del contexto de la presente invención, indica todas las neuronas sensoriales posibles que median en la información nociceptiva relativa al dolor. Los nociceptores inervan los tejidos cutáneos. El término "nociceptores" incluye, sin limitación, mecanorreceptores, mecano-nociceptores, nociceptores multimodales, quimiorreceptores y/o pruriceptores que detectan y transducen una variedad de estímulos nocivos, incluidos los estímulos químicos, térmicos o mecánicos o combinaciones de esos estímulos. Un ejemplo específico de nociceptores de acuerdo con la invención corresponde al mecanorreceptor de bajo umbral (C-LTMR), que responde específicamente a estímulos mecánicos y químicos.

Los nociceptores se pueden modular con los compuestos de TFA4 de la invención, o se pueden usar esos compuestos para modular adicionalmente la excitabilidad de interneuronas específicas de la médula espinal, por ejemplo, mediante la activación de una corriente de umbral bajo.

El término "interneuronas", dentro del contexto de la invención, indica neuronas conectoras que transmiten una información entre otras neuronas. Preferiblemente, las interneuronas son neuronas que transmiten información nociceptiva desde las neuronas sensoriales a las neuronas de proyección de la médula espinal. Las interneuronas preferidas de acuerdo con la invención son las interneuronas de la lámina II de la médula espinal. Las interneuronas son neuroquímicamente diversas, por ejemplo, pueden ser interneuronas excitadoras (usando glutamato) y/o interneuronas inhibitoras (usando GABA o glicina).

Normalmente, las interneuronas de acuerdo con la invención son interneuronas que están moduladas directa y/o indirectamente por compuestos de TFA4 tal y como se describe en la presente solicitud. Las interneuronas expresan varios marcadores histoquímicos, varios tipos de receptores, incluidos los receptores endocíticos, los receptores metabotrópicos, los receptores inotrópicos, los receptores del factor de crecimiento, pero también otras moléculas de señalización; y la excitabilidad de las interneuronas se modula preferiblemente mediante una modulación de la actividad de esos receptores.

El término "receptor", dentro del contexto de la presente invención, incluye cualquier receptor seleccionado a partir de receptores metabotrópicos, receptores endocíticos (por ejemplo, el receptor LRP1) y receptores ionotrópicos tales como canales iónicos activados por ligando y canales iónicos activados por voltaje (por ejemplo, canales de potasio, canales de calcio y canales de sodio), o una combinación de los mismos, cuya actividad puede estar modulada por los compuestos de TFA4 de la invención. Los receptores endocíticos incluyen receptores que median en la internalización de una variedad de macromoléculas extracelulares y complejos macromoleculares, que incluyen lipoproteínas, proteinasas, complejos inhibidores de la proteinasa y proteínas de la matriz extracelular. Un ejemplo específico de un receptor endocítico de ese tipo de la invención, es la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (receptor LRP1). Los receptores endocíticos incluyen receptores que también están implicados en la transducción de señales mediada por ligando. Los receptores ionotrópicos incluyen canales iónicos, receptores ligados a canales y canales iónicos activados por ligandos (LGICs). Los canales iónicos activados por voltaje (como los canales de potasio, los canales de sodio, los canales de calcio) son canales que tienen un papel fundamental en la excitabilidad neuronal, que son directamente responsables del inicio y la propagación de los potenciales de acción, y están implicados en diferentes trastornos del dolor crónico. Los LGICs incluyen un grupo de canales de iones transmembranales que se abren o se cierran como respuesta a la unión de un mensajero químico (es decir, un ligando), tal como un neurotransmisor. El sitio de unión de los ligandos endógenos en los complejos de proteínas LGICs se encuentra normalmente en una porción diferente de la proteína (un sitio de unión alostérico), en comparación con el lugar en donde se encuentra el poro de conducción de iones. El enlace directo entre la unión del ligando y la apertura o el cierre del canal iónico, que es característico de los canales iónicos activados por un ligando, se contrasta con la función indirecta de los receptores metabotrópicos, que utilizan segundos mensajeros. Los LGICs también son diferentes de los canales iónicos activados por voltaje (que se abren y se cierran dependiendo del potencial de membrana) y de los canales iónicos activados por estiramiento (que se abren y se cierran según la deformación mecánica de la membrana celular). Los receptores metabotrópicos comprenden una gran familia de proteínas de receptores transmembranales que detectan moléculas fuera de la célula y activan las vías de transducción de señales hacia adentro y, en última instancia, las respuestas celulares. Los receptores metabotrópicos incluyen receptores acoplados a la proteína G (GPCRs), también conocidos como receptores de siete dominios transmembranales, receptores heptahelicales, receptores de serpentina y receptores unidos a proteína G (GPLR).

El término "modulación" o "modulación de la excitabilidad neuronal", dentro del contexto de la presente invención, indica un cambio en la sensibilidad y/o excitabilidad de neuronas implicadas en la transmisión de señales de dolor, mediante el uso de compuestos de TFA4 de la invención. El término "modulación" incluye una "disminución" de la excitabilidad neuronal y/o un "aumento" de la excitabilidad neuronal, dependiendo del tipo de interneuronas, cuya actividad se esté modulando. Las neuronas que pueden estar moduladas por TFA4 son neuronas sensoriales y/o interneuronas. Las neuronas pueden estar moduladas por TFA4 directa o indirectamente, eléctrica o químicamente, a través de receptores o canales iónicos, o mediante cualquier combinación de los modos de modulación anteriores. Un ejemplo de modulación de nociceptor es una modulación de nociceptor que comprende un control del umbral de la sensación somática como respuesta a estímulos mecánicos o químicos. Un ejemplo de modulación de las interneuronas es una modulación de la excitabilidad de las interneuronas que comprende una modulación de la actividad de los receptores presentes en las interneuronas de la médula espinal.

Dentro del contexto de la presente invención, el término "tratamiento" o "tratar" un dolor en un sujeto, indica retrasar, estabilizar, curar, sanar, aliviar, retirar, alterar, mejorar, incrementar, remediar o influir sobre cualquier forma de dolor en un sujeto tal y como se describe en esta memoria, o cualquier enfermedad o afección asociada con el dolor (en particular, cualquier afección neuropática asociada con el dolor neuropático), o cualquier síntoma de una enfermedad o afección de ese tipo, después de la aplicación o la administración de un compuesto de TFA4 adecuado o de una composición de acuerdo con la invención. El término "tratamiento" o "tratar" también se refiere a cualquier indicador de éxito en el tratamiento del dolor (que puede estar asociado con cualquier lesión, patología o afección), incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo, tal como una reducción, remisión, progresión lenta o gravedad, estabilización, disminución de los síntomas de dolor o hacerlo más tolerable para el sujeto. El término "tratar" el dolor también incluye aumentar la tolerancia frente al dolor y/o disminuir el dolor percibido. En realizaciones particulares, los métodos, los compuestos y la composición de la invención son para aumentar la tolerancia frente al dolor y/o para disminuir el dolor percibido. Tal y como se usa en esta memoria, la expresión

"tolerancia frente al dolor" se refiere a la cantidad de dolor que un sujeto puede percibir y soportar antes de quebrarse emocional y/o físicamente. La tolerancia frente al dolor es distinta del umbral del dolor (el estímulo mínimo necesario para producir dolor). Tal y como se usa en esta memoria, "aumentar la tolerancia frente al dolor" generalmente se refiere a una situación en la que un sujeto puede desarrollar una mayor tolerancia frente al dolor (es decir, menos dolor percibido), en comparación con un estado anterior, por ejemplo, después de la administración de compuestos o composiciones de TAF4A4 adecuados a un sujeto.

Dentro del contexto de esta invención, "prevenir" o "prevención" en relación con el dolor en un sujeto, se refiere al menos a la reducción de la probabilidad de riesgo (o susceptibilidad) de adquirir cualquier tipo de dolor en un sujeto, después de la aplicación o administración de un compuesto de TAF4A4 adecuado o una composición de acuerdo con la invención. Por ejemplo, "prevenir" incluye causar que al menos uno de los síntomas clínicos del dolor no se desarrolle en un sujeto que puede estar expuesto o predispuesto al mismo, pero que aún no experimenta o muestra síntomas de dolor.

Ingrediente activo

Un objeto de la presente invención es una proteína TAF4A4 o un agonista de la misma tal y como se define en las reivindicaciones, para uso como ingrediente activo para prevenir o tratar el dolor en un sujeto, en particular dolor neuropático, dolor inflamatorio, dolor agudo, dolor subagudo, dolor crónico, alodinia, hiperalgesia, dolor parcialmente tratado, dolor inducido químicamente, dolor inducido mecánicamente, así como dolores refractarios, mientras que se evitan preferiblemente ventajosamente efectos secundarios perjudiciales. En una realización preferida, la invención es para controlar eficazmente el dolor neuropático o el dolor inflamatorio. La invención también se puede emplear para prevenir o tratar el dolor crónico en sujetos que padecen patologías tales como cáncer, quemaduras, etc., a los cuales generalmente se pueden administrar analgésicos (como la morfina) durante un período de tiempo prolongado, opcionalmente en forma retardada. La invención también se puede emplear junto con dosis diarias reducidas de morfina para mejorar el cuadro clínico de los pacientes (limitando los efectos secundarios de los morfínomiméticos, tales como trastornos intestinales, por ejemplo).

En una realización preferida, el compuesto para uso en la invención es una proteína TAF4A4 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1, o un agonista de TAF4A4 que comprende un fragmento de SEQ ID NO: 1 que modula la actividad de al menos un receptor presente en las interneuronas de la lámina III de la médula espinal (en particular, el receptor de proteínas de baja densidad LRP1 o un canal de potasio, o un canal de calcio, u otro receptor fisiológicamente relevante). En una realización particular, los compuestos de TAF4A4 de la invención modulan ventajosamente la actividad de un receptor adicional (distinto del primer receptor).

Sujeto

En el contexto de la presente invención, el paciente o sujeto es un animal, preferiblemente un vertebrado, normalmente un mamífero. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano, independientemente de su edad o sexo. El mamífero puede ser además un animal, en particular un animal doméstico o reproductor, en particular un caballo, un perro, un gato, etc. En una realización particular, el sujeto padece un dolor neuropático o un dolor inflamatorio, en particular un dolor inflamatorio crónico. En otra realización particular, el sujeto padece cualquier enfermedad o afección asociada con el dolor, iniciado de cualquier manera.

Composiciones

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de TAF4A4 tal y como se define en las reivindicaciones, como un ingrediente activo y preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una "composición farmacéutica" se refiere a una formulación de un compuesto de la invención (ingrediente activo) y a un medio generalmente aceptado en la técnica para la administración de compuestos biológicamente activos al sujeto que lo necesita. Un vehículo de ese tipo incluye por lo tanto todos los vehículos, diluyentes, medios o soportes farmacéuticamente aceptables. Ese vehículo se puede seleccionar, por ejemplo, a partir de metil-beta-ciclodextrina, un polímero de ácido acrílico (como carbopol), una mezcla de polietilenglicol y polipropilenglicol, monoetanol amina e hidroximetil celulosa. Se puede emplear la práctica farmacéutica convencional para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas a sujetos, por ejemplo, en forma de dosificación unitaria.

Esa composición es normalmente una composición analgésica/antihiperálgica local.

Los compuestos y composiciones de la invención están adaptados para uso para prevenir, aliviar o tratar el dolor en un sujeto como se ha descrito anteriormente.

La composición de la invención puede comprender además al menos un compuesto activo adicional. Ese compuesto se puede seleccionar ventajosamente a partir de un AIE, AINE o un fármaco opioide.

En otra realización, un compuesto o una composición de la invención también se puede administrar, por ejemplo,

junto con un agente destinado a tratar una afección simultánea (por ejemplo, un agente antitumoral).

Los compuestos para uso en la presente invención se pueden administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente.

Métodos de producción de compuestos de la invención

5 También se describen métodos para la producción de compuestos de TFAA. El compuesto de TFAA4 de la invención (p. ej., una proteína o un agonista peptídico) se puede producir por cualquier método de expresión de proteínas y método de purificación, convencionalmente conocidos. Por ejemplo: (i) un método para sintetizar péptidos (ii); un método para purificarlos y aislarlos del cuerpo vivo o de células cultivadas; o (iii) un método para producirlos con el uso de técnicas de recombinación genética; y similares (por ejemplo, las técnicas convencionales
10 descritas, por ejemplo, en Molecular Cloning (Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press) (1989) y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F. M., John Wiley and Sons, Inc. (1989)). Por lo tanto, las proteínas o los agonistas preferidos para uso en la invención se aíslan o purifican. Tal y como se usa comúnmente, "aislado" indica, por ejemplo, que la proteína o el agonista está al menos separado de algunos componentes de su entorno natural o de producción, tal como un medio de cultivo celular o un organismo vivo. Más preferiblemente, las proteínas o los agonistas se usan como un material aislado o puro con un nivel de pureza superior al 50%, superior al 60%, superior al 70%, superior al 80%, superior al 90%, o incluso más preferiblemente superior al 95%. La proteína o el agonista aislado o purificado, a continuación, se puede combinar o mezclar con ingredientes adicionales tales como excipientes u otros agentes activos, como se describen en secciones posteriores.

20 Tratamiento/Protocolo/Régimen

También se describe en esta memoria un método para la prevención o el tratamiento del dolor en un sujeto. Un objetivo del método es modular la excitabilidad neuronal usando compuestos o composiciones de TFAA4 tal y como se han definido anteriormente. Un método particular para prevenir, aliviar o tratar un dolor mediado por nociceptor (en particular un dolor mediado por C-LTMR) en un sujeto que lo necesita, comprende administrar al sujeto una
25 cantidad eficaz de un compuesto o composición de TFAA4 tal y como se describe en esta memoria.

Un método particular adicional para prevenir, aliviar o tratar el dolor en un sujeto que lo necesita, comprende una etapa de administrar a dicho sujeto, un compuesto o una composición de TFAA4, tal y como se describe en esta memoria, en una cantidad terapéuticamente eficaz, posiblemente en combinación con al menos un compuesto activo adicional, tal como una cualquiera de las moléculas mencionadas en la parte de antecedentes, por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, paracetamol, opiode, etc.
30

Preferiblemente, el método de tratamiento se refiere a un tratamiento del dolor neuropático o neuropatía, que comprende cualquier mejora de los síntomas de esa neuropatía o cualquier retraso o reducción de los signos externos, por ejemplo, una reducción de su frecuencia, del problema o el malestar, del dolor, o incluso una desaparición total de la neuropatía. En una realización particular, los compuestos o composiciones de TFAA4 de la invención son útiles para prevenir un dolor neuropático o prevenir una neuropatía antes del desarrollo de los primeros signos de la enfermedad, con el fin de proteger a un sujeto de ese dolor neuropático o neuropatía a la que el sujeto está, o puede estar expuesto.
35

La duración, las dosificaciones y la frecuencia de administración de los compuestos o composiciones de la invención para ese tratamiento también se pueden adaptar de acuerdo con diferentes formas de dolor (es decir, dolor neuropático agudo o crónico). El tratamiento se puede usar solo o en combinación con otros ingredientes activos, ya sea simultáneamente o por separado o secuencialmente.
40

Los compuestos o composiciones de acuerdo con la invención se pueden administrar de varias formas o por varias rutas. Los compuestos o composiciones de la invención se pueden administrar por vía intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, cutánea, subcutánea, dérmica, transdérmica, intratecal, ocular (por ejemplo, córnea) o rectal, o mediante una administración tópica en un sitio de inflamación, y preferiblemente mediante inyección intramuscular o intravenosa.
45

Un régimen típico comprende una administración única o repetida de una cantidad eficaz de un compuesto de TFAA4 durante un período de uno o varios días, hasta un año, e incluye entre una semana y aproximadamente seis meses, o puede ser crónica. Se entiende que la dosificación de un compuesto o composición farmacéutica de la invención administrada *in vivo* dependerá de la edad, la salud, el sexo y el peso del receptor (sujeto), el tipo de tratamiento concurrente, si hay alguno, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto farmacéutico deseado. Los intervalos de dosis eficaces proporcionados en esta memoria no pretenden ser limitantes y representan intervalos de dosis preferidos. Sin embargo, la dosificación más preferida se adaptará al sujeto individual, tal como lo entiende y puede determinar un experto en las técnicas relevantes (véase, por ejemplo, Berkow et al., compiladores, The Merck Manual, 16ª edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Goodman et al., compiladores, Goodman and Gilman's The pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª edición, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (2001)).
50
55

La dosis total requerida para cada tratamiento se puede administrar en múltiples dosis o en una sola dosis, preferiblemente tan pronto como aparecen los primeros síntomas de dolor, o preventivamente, por ejemplo, antes o durante una cirugía, cuando sea necesario. El compuesto farmacéutico se puede administrar solo o junto con al menos otro compuesto farmacéutico dirigido a la patología, o dirigido a otros síntomas de la patología. Las cantidades eficaces de un compuesto o una composición de acuerdo con la invención son de aproximadamente 1 µg a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente administradas a intervalos de 4-24 horas durante un período de varios días, semanas, meses o hasta 1 año, y/o cualquier intervalo o valor entremedias, tal como 0,001-0,01, 0,01-0,1, 0,05-100, 0,05-10, 0,05-5, 0,05-1, 0,1-100, 0,1-1,0, 0,1-5, 1,0-10, 5-10, 10-20, 20-50 y 50-100 mg/kg, por ejemplo, entre 0,05 y 100 mg/kg, preferiblemente entre 0,05 y 5 mg/kg, por ejemplo, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4 o 5 mg/kg, a intervalos de 1-4, 4-10, 10-16, 16-24, horas, durante un período de 1-14, 14- 28, o 30-44 días, o 1-24 semanas, o cualquier intervalo o valor entremedias. Una pauta de administración típica comprende de 1 µg a 100 mg/kg/día.

Los destinatarios de la administración de compuestos y/o composiciones de la invención pueden ser cualquier sujeto tal y como se define en esta memoria, preferiblemente seres humanos.

Formulaciones/Concentraciones

Los compuestos o composiciones de acuerdo con la invención se pueden administrar de diversas formas. Por lo tanto, se pueden formular en forma de ungüento, gel, pasta, soluciones líquidas, suspensiones, comprimidos, cápsulas de gelatina, cápsulas, supositorios (en particular para un dolor asociado con un síndrome gastrointestinal), polvos, gotas nasales o aerosol, preferiblemente en forma de ungüento. Los compuestos de la invención se administran normalmente en forma de ungüentos, geles, aceites, comprimidos, supositorios, polvos, cápsulas de gelatina, cápsulas, etc., opcionalmente mediante formas de dosificación o dispositivos que aseguran una liberación prolongada y/o retardada. Para ese tipo de formulación, se usa ventajosamente un agente tal como celulosa, carbonato o almidón. Para las inyecciones, los compuestos generalmente se envasan en forma de suspensiones líquidas, que se pueden inyectar a través de jeringas o perfusiones, por ejemplo. A este respecto, los compuestos se disuelven generalmente en soluciones salinas, fisiológicas, isotónicas o tamponadas, etc., compatibles con el uso farmacéutico y conocidas por el experto en la materia. Por lo tanto, las composiciones pueden contener uno o varios agentes o excipientes seleccionados a partir de agentes dispersantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes, etc. Los agentes o excipientes que se pueden usar en formulaciones líquidas y/o inyectables son especialmente metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, polisorbato 80, manitol, gelatina, lactosa, aceites vegetales, acacia, etc. Se entiende que el caudal y/o la dosis administrada las puede ajustar una persona experta en la técnica de acuerdo con el paciente, el dolor observado, el área a tratar, el o los compuestos activos en cuestión, el modo de administración, etc.

Para aplicaciones tópicas, se prefiere que el sujeto que se va a tratar se exponga a una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de acuerdo con la invención, para las áreas diana, por ejemplo, superficies de la piel, membranas mucosas y similares, que están adyacentes a las neuronas periféricas que se van a tratar.

Normalmente, los compuestos se administran con dosis que pueden variar entre aproximadamente 50 µg hasta aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal de un compuesto de la invención, dependiendo de los criterios mencionados anteriormente, si el uso es profiláctico o terapéutico y la naturaleza del vehículo tópico empleado. Una administración preferida es una inyección intramuscular o intravenosa o intraperitoneal. Además, una administración mediante inyección puede comprender varias (2, 3 o 4) administraciones al día, si es necesario. Además, para los tratamientos crónicos, los sistemas retrasados o prolongados pueden ser ventajosos, asegurando que el sujeto tenga un tratamiento del dolor efectivo y duradero.

También se describe un kit que comprende (i) un compuesto o una composición de TAFA4, como se ha descrito previamente, y (ii) al menos un compuesto activo distinto adicional, eficaz contra el dolor, y opcionalmente (iii) instrucciones escritas para el uso del kit.

Además se describe un kit que es adecuado para el tratamiento mediante los métodos descritos en esta memoria. Esos kits comprenden (i) un compuesto o una composición de TAFA4, como se ha descrito previamente, normalmente en las dosificaciones indicadas en esta memoria, y (ii) una segunda composición que contiene un compuesto analgésico, preferiblemente un compuesto opiáceo, en dosificaciones generalmente disminuidas en comparación con las prescritas clásicamente, para una administración simultánea, por separado o secuencial, en cantidades eficaces.

Las figuras y los ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance.

Ejemplos

I. Procedimientos experimentales

Todos los animales (ratones) se mantuvieron en condiciones de alojamiento convencionales (22°C, 40% de humedad, ciclos de luz de 12 h y libre acceso a alimentos y agua). Se hizo un esfuerzo especial para minimizar la cantidad, así como el estrés y el sufrimiento de los ratones utilizados en los siguientes experimentos. Todos los

protocolos están de acuerdo con las recomendaciones de la Unión Europea para la experimentación con animales.

1.1 Generación de ratones *tafa4-GFP KI* con el gen TAF4 inactivado de forma dirigida

Para generar ratones *tafa4-GFP KI* usamos una recombinación homóloga basada en cromosomas artificiales bacterianos (BACs) en células madre embrionarias. El vector de direccionamiento final se construyó basándose en un clon genómico de 209 kb del locus *tafa4* de ratón en pBAC (RP23-427L8), obtenido a partir de una genoteca del Centro de Recursos "BACPAC" (BPRC) 129SVJ (Figura 2A). La recombinación bacteriana en el vector RP23-427L8 BAC se diseñó gracias a una estructura artificial intermedia para el direccionamiento que se había ensamblado utilizando los vectores plasmídicos pL452 y pCS2/venus sv40. Se reemplazaron 109 pb del exón1 del gen *tafa4* por el casete "YFP (Venus de aquí en adelante GFP)-polyA loxP-EM7-PGK-Neo-loxP". Los brazos de homología se aislaron como productos de una PCR de 271 pb y 265 pb, usando una polimerasa Taq phusion (Finnzymes). Después de una recombinación homóloga del BAC en bacterias, la estructura artificial final de direccionamiento se linealizó usando un sitio *Ascl* y se transfeció en células madre embrionarias obtenidas a partir de 129/SV, CK35. Los clones recombinantes homólogos se identificaron mediante transferencia Southern usando sondas ubicadas en el extremo 3' de la estructura artificial, y mediante una sonda de neomicina. Se inyectaron dos clones dirigidos en blastocistos obtenidos a partir de C57Bl6/J en la instalación transgénica del Centro de Inmunología. Las quimeras resultantes se aparearon con hembras C57Bl6/J para producir una transmisión por la línea germinal del alelo recombinante.

Los siguientes oligonucleótidos se usaron para las PCRs de genotipado:

GFP 436: GAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTG,

1585: CTGTGGAGGAAATGGTTTCAACT,

1587: CTGCAAAGAGAAGCCAAAGCTAC.

Los machos y hembras heterocigotos se aparearon para generar la población descrita en las pruebas de comportamiento del manuscrito. Con el fin de aumentar la visualización de GFP para los experimentos celulares y moleculares, también generamos una línea TAF4 GFP-NEO-. El casete Neo se retiró cruzando ratones TAF4^{GFP/+} con una línea de ratones cre-deleter. La ausencia del casete neo se confirmó por PCR. A excepción de los análisis de comportamiento y el registro de la fijación por voltaje (del inglés "patch-clamp") de células completas procedentes de cortes de médula espinal con la raíz dorsal adjunta, se utilizaron ratones TAF4 GFP recombinados con Cre en todos los experimentos.

1.2. Secciones tisulares e hibridación *in situ*/inmunofluorescencia

Para obtener tejidos adultos, los ratones se anestesiaron profundamente con una mezcla de ketamina/xilazina y luego se perfundieron de forma transcardial con una solución helada de paraformaldehído al 4% en PBS (PAF). Después de la disección, se fijaron posteriormente durante al menos 24 h en el mismo fijador a 4°C. P0 se recogieron en PBS 1X helado, se lavaron suavemente y se fijaron durante 24 h en PAF al 4%. Para la inmunofluorescencia de la piel, se extirpó la piel del tronco de ratones anestesiados y se fijó directamente en 15% (v/v) de ácido picrico-2% de formaldehído durante 24 h a 4°C. A continuación, los tejidos se transfirieron a una solución de sacarosa al 30% (p/v) para una crioprotección antes de congelar y almacenar a -80°C. Las muestras se seccionaron (12 a 40 µm) usando un criostato convencional (Leica). La hibridación *in situ* y la inmunofluorescencia se realizaron siguiendo protocolos convencional (Moqrich et al., 2004). Se sintetizaron sondas de ARN (*Tafa4*, *TH*, *Vglut3*, *TrkB*, *MrgprD*, *SCG10*) utilizando cebadores de PCR específicos de genes y moldes de ADNc procedentes de DRG de ratón embrionario o adulto. Más particularmente, la hibridación *in situ* se realizó usando una combinación de sondas marcadas con digoxigenina y/o fluoresceína/biotina. Las sondas se hibridaron durante la noche a 55°C, y los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo anti-digoxigenina/fluoresceína/biotina y peroxidasa de rábano picante (Roche). La detección final se logró utilizando el kit fluoresceína/cy3/cy5 TSA plus (Perkin Elmer). Para los experimentos *in situ* con fluorescencia doble, el primer anticuerpo se inactivó usando un tratamiento con H₂O₂.

Los siguientes oligonucleótidos se usaron para las PCRs anidadas para la síntesis de sondas:

tafa4-F1: TGCTCAGAAGTTCATAGCCAAA,

tafa4-R1: TAAAGGAACATTTGCAAGCTCA,

tafa4-F2: ATATGTGCAGTGTGG,

tafa4-R2+T7: TAATACGACTCACTATAGGGCAGCCAAGTTCAAAC,

TH-F1: AAGCCAAAATCCACCACTTAGA,

TH-R1: CCGTGGAGAGTTTTTCAATTC,

TH-R2+T7: TAATACGACTCACTATAGGGAGAGATGCAAGTCCAATGTCCT,

Vglut3-F1: TAGCTCAGTTTCCAGGAATGGT,

Vglut3-R1: GGAGATCTAACAACATCTGATAACAC,

Vglut3-F2: CCCCTAGAGTATCAGGAATTT,

Vglut3-R2+T7:

TAATACGACTCACTATAGGGTGGGAAGTTTTAAAAATCTATGATTAG, TrkB-F1:

5 *CTGAGAGGGCCAGTCACTTC,*

TrkB-R1: CATGGCAGGTCAACAAGCTA,

TrkB-F2: CAGTGGGTCTCAGCACAGAA,

TrkB-R2+T7: TAATACGACTCACTATAGGGCTAGGACCAGGATGGCTCTG,

MrgprD-F1: GGGCATCAACTGGTTCTTACTC,

10 *MrgprD-R1: AGGGATTGTCTTGACTGTGC,*

MrgprD-F2: AACGGGATGTGAGGCTACTTTA,

MrgprD-R2+T7: TAATACGACTCACTATAGGGATTTATGCCTTGACTTCCCTGA,

SCG10-F1: GCAATGGCCTACAAGGAAAA,

SCG10-R1: GGCAGGAAGCAGATTACGAG,

15 *SCG10-F2: AGCAGTTGGCAGAGAAGAGG,*

SCG10R2+T7: TAATACGACTCACTATAGGGGGCAGGAAGCAGATTACGAG.

Para la inmunofluorescencia, los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS - 10% de suero de burro o cabra (Sigma) - 3% de albúmina bovina (Sigma) - 0,4% de Triton X-100 y se incubaron durante la noche a 4°C. Las concentraciones y referencias de anticuerpos primarios son: anti-TrkA de conejo 1:1000 (Interchim), anti-TrkC de cabra 1:1000 (R&D Systems), anti-Ret de cabra 1:500 (R&D Systems), anti-CGRP de conejo 1:2000 (Chemicon), anti-proteína fluorescente verde de pollo (GFP) 1:1000 (Aves Labs), anti-PKCy de conejo 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology), anti-S100 1:400 (Dako) y anti-parvalbúmina de cabra 1:1000 (Swant). Para la detección secundaria se utilizaron los anticuerpos correspondientes de burro o cabra Alexa 488, 555 o 647 anti-conejo, anti-pollo y anti-cabra (anticuerpos de Invitrogen o Molecular probe). Los conjugados de isolectina IB4 con el colorante Alexa FluorR 568 se usaron 1:100 (Invitrogen).

1.3. Recuentos celulares y análisis estadístico

Secciones en serie de 12 µm de DRG torácico (T12) y lumbar (L4) se distribuyeron sobre seis y ocho portaobjetos, respectivamente, y se sometieron a diferentes marcadores, incluyendo el marcador pan-neuronal *SCG10*. Este enfoque, además de proporcionar el número total de neuronas, nos permitió representar todos los recuentos como un porcentaje de neuronas *SCG10*⁺. Para cada genotipo, se hizo un recuento de dos a cuatro DRGs en al menos tres ratones independientes. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$ y se determinó usando ANOVA de una vía seguida de una prueba t no apareada.

1.4. Registro electrofisiológico y formación de imágenes con calcio

A continuación se describe el registro de la fijación por voltaje de células completas de cultivos de neuronas DRG y de cortes de médula espinal con raíz dorsal adjunta, así como protocolos de formación de imágenes con calcio:

- Cultivos de neuronas DRG para el registro de fijación por voltaje

Se anestesiaron con halotano ratones machos heterocigotos o TAF4-nulos de 7 a 14 semanas de edad y se sacrificaron seccionando las arterias carótidas de acuerdo con la *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*. La disociación y los cultivos de las neuronas DRG se realizaron a partir de los DRGs lumbares extirpados y liberados de sus vainas de tejido conectivo como se ha descrito anteriormente (Hao y Delmas, 2010, 2011). Se incubaron en una solución enzimática que contenía 2 mg/ml de colagenasa IA durante 45 minutos a 37°C y se trituraron en medio de Hanks (GIBCO BRL). La suspensión resultante se colocó en placas Nuncunon recubiertas con 10 ng/ml de laminina (Sigma). El medio de cultivo era medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) complementado con FCS inactivado por calor al 10%, 100 U/ml de penicilina-estreptomicina, 1-glutamina 2 mM, 25 ng/ml de factor de crecimiento nervioso (NGF7S, Sigma Aldrich, Francia) y 2 ng/ml de factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, Invitrogen, Francia) (todos de GIBCO BRL). Las neuronas se mantuvieron en una atmósfera humidificada (5% de CO₂, 37°C) durante 12 h antes del registro.

- Registro de fijación por voltaje de células completas

Los registros de fijación por voltaje se realizaron usando electrodos de borosilicato que tenían resistencias que variaban de 2 a 3 MΩ. En el registro de Nav1.8 e ICaT se utilizó una solución con pipeta basada en CsCl que consistía en (mM): CsCl 125, Hepes 10, NaCl 5, NaGTP 0,4, MgATP 4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 4,8 y EGTA 10 (ajustada a pH 7,3 con CsOH). Las corrientes IKA, h y MA se registraron utilizando una solución con pipeta basada en KCl que contenía (mM): KCl 134, Hepes 10, MgATP 4, NaGTP 0,4, MgCl₂ 1, CaCl₂ 4,8, EGTA 10 (pH 7,3). Se usó la misma solución con pipeta basada en KCl para el registro de fijación por corriente. La solución externa convencional consistía en (mM): NaCl 132, KCl 1, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2,5, HEPES 10, D-glucosa 10 y TTX (500 nM, Ascent Scientific) (ajustada a pH 7,3 con NaOH, 300 mOsm/l). Las neuronas se perfundieron con una solución de baño con un caudal de 2-3 ml/min.

- Estimulación mecánica

La estimulación mecánica usando una sonda mecánica accionada piezoeléctricamente se ha detallado en otra parte (Hao y Delmas, 2010). Brevemente, se usó como sonda mecánica una micropipeta de vidrio pulido al fuego cementada con un actuador piezoeléctrico (Step Driver PZ-100; Burleigh) y se colocó en un ángulo de 45° respecto a la horizontal. El movimiento hacia abajo de la sonda hacia la célula estaba dirigido por el programa pClamp (Molecular Devices). La sonda tenía una velocidad de 800 μm/s (observada de otro modo) durante el segmento de rampa del comando para el movimiento hacia adelante, y el estímulo se aplicó durante un período desde 200 ms a varios segundos. A menos que se indique lo contrario, las corrientes MA fijadas por voltaje se registraron con un potencial de retención de -100 mV.

Las constantes de tiempo de la disminución de la corriente MS se ajustaron a exponenciales utilizando el procedimiento de ajuste de mínimos cuadrados no lineal de Chebyshev (Hao y Delmas, 2010). Las trazas de corriente se ajustaron con funciones monoexponenciales o biexponenciales. Las funciones biexponenciales eran las siguientes: $I(t) = A1 \cdot \exp(-t/\tau1) + A2 \cdot \exp(-t/\tau2) + A0$, en donde $\tau1$ y $\tau2$ representan los componentes exponenciales rápido y lento, $A1$ y $A2$ representan la amplitud de cada componente respectivo, y $A0$ representa la corriente de referencia. Los ajustes con más de dos componentes exponenciales no mejoraron significativamente la descripción de la disminución de la corriente, tal y como se juzgó por un análisis residual. Las células se clasificaron como que expresaban una corriente catiónica MS particular si el componente principal ($\geq 80\%$) de la corriente evocada a -100 mV disminuía monoexponencialmente. Las corrientes MS que no cumplían ese requisito se clasificaron como mixtas. Basándose en las constantes de tiempo de disminución de corriente, se podían distinguir tres tipos de corrientes MS: corrientes de adaptación rápida (IR, 3-6 ms), corrientes de adaptación lenta (IS, 200-300 ms) y corrientes de adaptación ultralenta (luS, ≥ 1000 ms).

- Adquisición y análisis de datos

Los registros del voltaje y la corriente se realizaron con un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices), se filtraron a 1 kHz y se tomaron muestras a 40-100 μs. Los errores de voltaje se minimizaron usando una compensación de resistencia en serie del 75-85%. La capacitancia celular se estimó a partir de la constante de tiempo de la fase de disminución de una corriente evocada de forma transitoria por una etapa de hiperpolarización de 10 mV. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. El programa informático PRISM 4.0 (GraphPad) se utilizó para realizar el análisis de datos. Los resultados se presentan como media $\pm$ SEM y n representa el número de neuronas examinadas. El análisis estadístico utilizó la prueba t de Student y $P < 0,01$ se consideró estadísticamente significativo.

- Registro de la fijación por voltaje de células completas procedentes de cortes de la médula espinal con raíz dorsal adjunta

Se prepararon cortes transversales de la médula espinal con raíces dorsales adjuntas a partir de ratones juveniles (P21 a P34) TAF4A4-nulos y WT para el registro de células completas siguiendo el protocolo descrito en Mouro et al. (Mouro et al., 2012). Los ratones se anestesiaron profundamente con isoflurano antes de ser decapitados rápidamente. Se extrajo rápidamente un fragmento de tejido que contenía la columna vertebral y los músculos circundantes y se sumergió en líquido cefalorraquídeo artificial oxigenado bajo en calcio (ACSF) (en mM: NaCl 101; KCl 3,8; MgCl₂ 18,7; MgSO₄ 1,3; KH₂PO₄ 1,2; HEPES 10; CaCl₂ 1; glucosa 1) después de la laminectomía, la médula espinal se retiró suavemente y su parte lumbar se colocó en un bloque pequeño de agarosa al 3%. Se cortaron secciones espinales (300 μm de grosor) utilizando un vibratomo de Leica VTS1000 y se transfirieron a ACSF tibio (31°C) (en mM: NaCl 130,5; KCl 2,4; CaCl₂ 2,4; NaHCO₃ 19,5; MgSO₄ 1,3; KH₂PO₄ 1,2; HEPES 1,25; glucosa 10; pH 7,4) equilibrado con 95% de O₂ - 5% de CO₂ durante al menos una hora antes de comenzar los registros de fijación por voltaje. Se colocaron cortes espinales en una cámara de registro bañada con ACSF calentado (31°C). Las mediciones electrofisiológicas se realizaron con el control de un microscopio Olympus BX51 utilizando un multiclamp 2B (Molecular devices). Las pipetas de la fijación (7-11 Ω) se llenaron con la solución de pipeta apropiada (en mM: KGluconato 120; KCl 20; CaCl₂ 0,1; MgCl₂ 1,3; EGTA 1; HEPES 10; GTP 0,1; AMPc 0,2; leupeptina 0,1; Na₂ATP 3; D-manitol 77; pH 7,3). Para la medición de las corrientes de calcio de tipo T, la pipeta de la fijación tenía la siguiente concentración (en mM: Cs metano sulfonato 120; CsCl 20; CaCl₂ 0,1; MgCl₂ 1,3; EGTA 1; HEPES 10; GTP 0,1; AMPc 0,2; leupeptina 0,1; Na₂ATP 3; D-manitol 77; pH 7,3) y TTX (0,5 μM), CNQX (5 μM),

DL-APV (10 μ M), estricnina (10 μ M), bicuculina (5 μ M) y TEA (2,5 mM) se añadieron al ACSF para bloquear el voltaje de sodio activado y las corrientes sinápticas. Se usó un electrodo de succión de vidrio conectado a un estimulador Master 8 (A.M.P. Instrument Ltd) para estimular las raíces dorsales. Normalmente, se usaron estimulaciones de alta duración (500 μ s) y alta intensidad (350 μ A) para reclutar la mayoría de las fibras aferentes primarias en el corte registrado. Los potenciales de unión líquida (-16,5 mV de valor calculado) no se corrigen.

- Identificación molecular de las interneuronas espinales de la lámina III registradas

Para determinar el fenotipo del neurotransmisor de las neuronas de la lámina II registradas, se añadió biocitina al 0,5% a la solución de registro con pipeta. Al final de los registros, la pipeta de la fijación se retiró cuidadosamente para preservar lo más posible la integridad de la neurona registrada. Las secciones espinales se fijaron a continuación durante la noche a 4°C en PFA al 4% y se mantuvieron a -4°C en PFA al 0,5% para revelar posteriormente la biocitina y GAD. Las secciones se enjuagaron 3 veces en PBST y se incubaron en anticuerpo primario (anti GAD6567, sigma G5163, 1/2000 en PBST, BSA al 0,5%) durante 48 horas a 4°C. Las secciones se enjuagaron 3 veces en PBST y se incubaron durante la noche en una mezcla de anticuerpo secundario (de cabra anti-conejo-alexa568, Molecular Probes A-11011, 1/500) y estreptavidina-alexa488 (Invitrogen S-11266, 1/500). Las secciones se enjuagaron 3 veces en PBST y se montaron en medio de montaje fluorescente de Dako. Las adquisiciones se realizaron en un microscopio confocal Leica SPE utilizando objetivos de inmersión en aceite x63.

- Formación de imágenes con Ca^{2+}

Se sembraron neuronas DRG lumbares procedentes de ratones TAF4 heterocigóticos o desactivados, de 7 a 14 semanas de edad en cámaras con fondo de vidrio recubierto con laminina (Fluorodish WPI) y se cultivaron durante 16-22 horas a 37°C en medio Neurobasal A complementado con B27 (Invitrogen, Francia) con 100 ng/ml de NGF 7S (Sigma Aldrich, Francia), 2 ng/ml de GDNF (Invitrogen, Francia) y 10 ng/ml de NT4 (Peprotech, Francia). La formación de imágenes con calcio se realizó 12-17 horas después de la siembra. Antes del registro, las neuronas se incubaron con fura-2AM 5 μ M en una solución de Tyrode durante 1 hora a 37°C. Las mediciones de la fluorescencia se realizaron con un microscopio invertido (Olympus IX70) equipado con una cámara HQ coolsnap (Roper Scientific, Francia). Fura-2 se excitaba a 340 nm y 380 nm y las relaciones de la fluorescencia emitida a 510 nm se adquirieron simultáneamente con la temperatura del baño utilizando el programa informático Metafluor (Universal Imaging). La temperatura se controló con una perfusión controlada por gravedad (1-2 ml/min) enfría con un dispositivo peltier montado en serie con un calentador resistivo (CellMicroControls). La perfusión se enfrió primero a 12°C después se calentó a 37°C antes de la aplicación sobre la cámara. La temperatura se controló con una sonda de termistor ubicada cerca de la salida de perfusión, siempre en el mismo lugar. El enfriamiento rápido desde 37 a menos de 15°C, que se logró al desconectar el calentamiento, duraba normalmente menos de 40 segundos. Se prepararon agonistas farmacológicos de varios canales de iones receptores transitorios (mentol 100 μ M, isotiocianato de alilo 100 μ M (AITC), capsaicina 0,5 μ M, sulfato de pregnenolona 10 μ M) en la solución Tyrode y se aplicaron secuencialmente a las neuronas durante unos segundos a 37°C. Para las estimulaciones iso e hipotónicas, las soluciones extracelulares se prepararon manteniendo constante la concentración de NaCl y variando el nivel de manitol para controlar la osmolaridad. La solución isotónica (300 mOsm) contenía (en mM): NaCl 87, manitol 100, KCl 3, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2,5, Hepes 10, glucosa 10; y la solución hipotónica (200 mOsm) contenía (en mM): NaCl 87, manitol 51, KCl 3, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2,5, Hepes 10, glucosa 10. Los datos se analizaron sin conexión utilizando metafluor, excel y graphpad prism.

II. Ensayos del comportamiento

Todos los análisis del comportamiento (campo abierto, Rotarod, placa caliente, placa fría, gradiente térmico, elección de dos temperaturas, umbral nociceptivo térmico (prueba de Hargreave), prueba de prurito, prueba de Von Frey, prueba dinámica de Von Frey y formalina) se realizaron en machos de una camada de 8-12 semanas de edad. Una descripción detallada de todas estas pruebas se proporciona a continuación. Una inyección de adyuvante completo de Freund (CFA) y carragenano en la pata trasera, una inyección intratecal de TAF4 recombinante y una constricción crónica del nervio ciático (CCI) también se describen a continuación. Se utilizó la prueba t de Student para todos los cálculos estadísticos.

Más particularmente, todos los ensayos de comportamiento se realizaron en camadas de 8-12 semanas de edad con antecedentes genéticos mixtos C57BL6/129SV. Los animales se aclimataron durante 20 minutos al entorno de su prueba antes de realizar todos los experimentos a temperatura ambiente (~22°C). Los experimentadores desconocían el genotipo de los ratones durante las pruebas. Se utilizó la prueba T de Student para todos los cálculos estadísticos. Todas las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). El comportamiento general (actividad locomotora y de aprendizaje) se midió utilizando un aparato Rotarod (LSI Letica Scientific Instruments). El gradiente, las placas térmicas, el campo abierto, los aparatos de Hargreaves y Von Frey eran de Bioseb instruments.

II.1. Ensayos generales del comportamiento

II.1.A. Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto se usa comúnmente para evaluar el comportamiento locomotor, exploratorio y similar a

la ansiedad. Consiste en un recinto cuadrado vacío y brillante (40x40x35 cm), rodeado por paredes para evitar que el animal escape. Los animales se colocaron individualmente en el centro del recinto y se grabó su comportamiento con una cámara de video durante un período de 5 minutos. El comportamiento relacionado con la ansiedad se mide por el grado en que el roedor evita el área central (20x20 cm), analizado por el programa informático de seguimiento Bioseb.

II.1.B. Prueba de Rotarod

Se usó un aparato Rotarod (LSI Letica Scientific Instruments) para explorar la función locomotora coordinada, de equilibrio y aprendizaje en ratones. Los ratones se colocaron sobre una varilla que se aceleró lentamente de 4 rpm a 44 rpm de velocidades constantes de rotación durante 5 minutos, y se registró la latencia hasta que los ratones se caían durante ese período. La prueba se realizó 4 días consecutivos. Cada día, los animales se sometieron a la prueba tres veces, separadas por al menos 5 minutos de descanso. La prueba de respuesta a la elección de temperatura y el ensayo de gradiente de respuesta a la temperatura se realizaron como se describe en (Moqrich et al., 2005) pero utilizando un aparato Bioseb.

II.2. Pruebas de sensibilidad térmica

II.2.A. Placa caliente

Para evaluar la sensibilidad al calor, los ratones se confinaron individualmente sobre una superficie metálica mantenida a 48°, 50° o 52°C mediante un cilindro de plexiglás de 20 cm de altura, y se midió la latencia frente a las respuestas nociceptivas (lamer, sacudir o levantar las patas traseras). Para evitar un daño tisular, los ratones fueron retirados de la placa inmediatamente después de una respuesta nociceptiva o después de un máximo de 90 s, 60 s y 45 s, respectivamente. Cada ratón fue sometido a la prueba dos veces con una latencia de 5 minutos entre cada prueba; el tiempo de retirada corresponde a la media de las dos mediciones. Se respetó una latencia de al menos 1 h entre cada temperatura de la prueba.

II.2.B. Placa fría

Para analizar la sensibilidad al frío, los ratones se colocaron individualmente en una cámara de plexiglás mantenida a 22°, 10° o 4°C. Se mide el tiempo que tardan los ratones en erguirse sobre sus patas durante el primer minuto. Cada ratón se expone tres veces a cada temperatura con un mínimo de cinco minutos de descanso entre las pruebas y una hora de separación entre las temperaturas.

II.2.C. Prueba de gradiente térmico

Esta prueba ha sido descrita previamente (Moqrich et al., 2005). Brevemente, se realizó un seguimiento de los ratones individualmente durante 90 minutos en cuatro recintos separados del aparato para el gradiente térmico (Bioseb). Se mantuvo un gradiente de temperatura controlado y estable de 14°C a 53,5°C utilizando dos dispositivos de calentamiento/enfriamiento de Peltier ubicados en cada extremo del suelo de aluminio. Cada recinto se dividió virtualmente en 15 zonas de igual tamaño (8 cm) cada una con una temperatura distinta y estable. El seguimiento se realizó utilizando una cámara de video controlada por el programa informático proporcionado por el fabricante.

II.2.D. Pruebas de elección entre dos temperaturas

Se colocaron dos ratones simultáneamente en cada carril del aparato de elección de dos temperaturas (Bioseb). Se realizó un seguimiento de los ratones durante 10 minutos usando el programa informático de Bioseb. Durante el primer día, ambas placas se mantuvieron a 20°C durante 10 min. Días después de ese período de aclimatación, 2 placas se calentaron o enfriaron individualmente a diferentes temperaturas (42°C a 16°C) y se mantuvieron a la temperatura adecuada durante una prueba de 10 minutos. Se respetó un lapso de tiempo de 1 hora entre 2 pruebas diferentes.

II.2.E. Umbral nociceptivo térmico (prueba de Hargreave)

Para evaluar la sensibilidad térmica de la pata trasera, se realizó la prueba de Hargreaves utilizando un dispositivo de prueba plantar (Bioseb). Los ratones se colocaron individualmente en cámaras de plexiglás sobre una plataforma de vidrio elevada y se permitió que se aclimataran durante al menos 30 minutos antes de la prueba. Luego se aplicó una fuente de calor radiante móvil de intensidad constante sobre la superficie sin pelo de la pata, a través de la placa de vidrio y se midió la latencia hasta la retirada de la pata. La latencia de retirada de la pata se indica como la media de tres mediciones para ambas patas traseras con al menos una pausa de 5 minutos entre las mediciones. La fuente de IR se ajustó al 20% y se aplicó un límite de 20 s para evitar daños en el tejido.

II.3. Pruebas de sensibilidad mecánica

II.3.A. Dinámica de Von Frey

Para evaluar la sensibilidad mecánica de la pata trasera, se realizó una prueba dinámica de Von Frey, utilizando un aparato Bioseb. El filamento de Von Frey se aplica con una fuerza creciente de hasta 7 g durante 20 s. La pata

trasera inyectada y no inyectada se pellizca tres veces con al menos 5 minutos de latencia entre los pellizcos y se calcula el promedio de retirada (g o segundo).

II.3.B. Prueba de filamentos de Von Frey

- 5 Para el modelo de constricción crónica, utilizamos los filamentos capilares de Von Frey con tres fuerzas de flexión diferentes (0,07, 0,6 y 1,4 g). Para el modelo de carragenano, se evaluaron la alodinia mecánica y la hiperalgesia utilizando los filamentos capilares de Von Frey con cuatro fuerzas de flexión diferentes (0,07, 0,4, 0,6 y 1,4 g). Para más detalles, véanse los párrafos "Mononeuropatía periférica unilateral" e "Inyección de carragenano".

II.4. Prueba de sensibilidad química

II.4.A. Prueba de formalina

- 10 Una solución de formalina se preparó al 2% en PBS IX a partir de una reserva de formalina (Fischer Scientific) (téngase en cuenta que la reserva de formalina corresponde a una solución de formaldehído al 37%). Los ratones se alojaron individualmente en cámaras de plexiglás, se les permitió habituarse al entorno de la prueba durante 30 minutos. Después de una inyección subcutánea de 10 µl de formalina en la pata trasera izquierda, los animales se colocaron inmediatamente de forma individual en cámaras de observación y luego se realizó un seguimiento del comportamiento del dolor (sacudir, lamer y morder la pata inyectada) durante 60 minutos. El tiempo acumulado de comportamiento de dolor de la pata inyectada se contó a intervalos de 5 minutos. El tiempo dedicado a mostrar esos comportamientos de dolor se registró para la primera fase (0-10 min) y la segunda fase (10-60 min).

II.4.B. Prueba de prurito empleando el agente prurigénico 48/80

- 20 El agente prurigénico 48/80 (Sigma-Aldrich, C2313) se preparó con 2 µg/µl en PBS IX. Se inyectaron 100 µg (50 µl) en el cuello del ratón. El tiempo acumulado de prurito se contó durante 40 minutos.

II.4.C. Inyección de CFA

- 25 Se inyectaron 10 µl de adyuvante completo de Freund (CFA) en la pata trasera izquierda de ratones anestesiados usando una jeringa Hamilton, para producir inflamación y alteraciones en la sensibilidad nociceptiva. Las patas inyectadas se evaluaron para detectar signos de inflamación aguda, tales como edema y enrojecimiento, 24 horas después de la inyección. Las respuestas a los estímulos térmicos y mecánicos se midieron antes de la inyección (Día 0), así como uno, tres y siete días (solo para los estímulos mecánicos) después de la inyección de CFA. Las patas traseras derechas no inyectadas sirven como control.

II.4.D. Inyección de carragenano

- 30 Se inyectaron 20 µl de λ-carragenano al 1% (Sigma-Aldrich, 22049-5G-F) en PBS1X en la pata trasera izquierda del ratón usando una jeringa Hamilton.

Para el modelo de carragenano, se evaluaron la alodinia mecánica y la hiperalgesia antes y después de la inyección utilizando los filamentos capilares de Von Frey con cuatro fuerzas de flexión diferentes (0,07, 0,4, 0,6 y 1,4 g). Para cada filamento, se aplicaron dos veces cinco estímulos con un intervalo de 3 a 5 segundos. Las patas traseras derechas no inyectadas sirven como control.

II.4.E. Mononeuropatía periférica unilateral

- 35 Para la constricción crónica del modelo de nervio ciático (CCI), se indujo una mononeuropatía periférica unilateral en ratones anestesiados con ketamina (40 mg/kg ip) y xilasina (5 mg/kg ip) con tres suturas crónicas absorbibles (4_0) unidas sin apretar (con aproximadamente 1 mm de espacio) alrededor del nervio ciático común (Bennett y Xie, 1988).

- 40 El nervio se contrajo en un grado apenas perceptible, de modo que la circulación a través de los vasos epineurales no se interrumpió (Descœur et al., 2011). Para el modelo de constricción crónica, se evaluaron la alodinia mecánica y la hiperalgesia antes de la cirugía y cada cinco días después de la cirugía, utilizando los filamentos capilares de Von Frey con tres fuerzas de flexión diferentes (0,07, 0,6 y 1,4 g). Para cada filamento, se aplicaron dos veces cinco estímulos con un intervalo de 3 a 5 segundos.

II.4.F. Inyección intratecal de TFAA4 recombinante

- 45 Se realizaron inyecciones intratecales (i.t.) de TFAA4 (200 µg/ml, TFAA4 recombinante humana, R&D Systems) o vehículo (PBS) con un volumen de 10 µl, 15 minutos antes de la prueba de formalina. Se sostuvo a los ratones por la cintura pélvica con una mano y se insertó una aguja de calibre 25 conectada a una jeringa Hamilton de 20 µl en el espacio subaracnoideo entre las vértebras lumbares L5 y L6, hasta que se produjo un movimiento de la cola.

III. Resultados

III.1. TFAFA4 es un marcador específico de C-LTMRs

Curiosamente, los inventores han descubierto que los transcritos de *Tafa4* estaban altamente enriquecidos en neuronas de DRG adulto y del trigémino. Utilizando una hibridación *in situ*, los inventores han demostrado que los transcritos de *Tafa4* se expresan en aproximadamente el 8% y el 19% de las neuronas de DRG adultas lumbares (L4) y torácicas (T12) totales, respectivamente (Figura 1A). Experimentos de marcado doble fluorescente mostraron que *Tafa4* está completamente excluida de las neuronas TrkA⁺ y se identifica un subconjunto de neuronas Ret⁺ (Figuras 1C y 1D). Las neuronas TFAFA4⁺ no se unen a IB4 y son completamente distintas de las neuronas *mrgrpd*⁺ (Figuras 1E y 1F). En contraste, TFAFA4 se coexpresa predominantemente con *TH* y *VGLUT3* (Figura 1G). Utilizando secciones de DRGs de VLT3-EGFP (Seal et al., 2009), los inventores han encontrado que 92 +/-4% de las neuronas TFAFA4⁺ coexpresan EGFP y 94 +/-6% de las neuronas EGFP⁺ coexpresan TFAFA4 (Figura 1H), identificando a TFAFA4 como un marcador específico de C-LTMRs. A diferencia de TH y VGLUT3, TFAFA4 está casi restringida a neuronas del DRG y trigeminales, con baja expresión en las neuronas del sistema nervioso central, es decir, en la habénula y en poblaciones dispersas de neuronas en los núcleos del tronco encefálico y el hipotálamo.

III.2. Las neuronas que expresan TFAFA4 muestran propiedades de nociceptores mecánicos

Para investigar el papel de TFAFA4 en C-LTMRs, los inventores han generado un modelo de ratón activado que permite marcar genéticamente las neuronas que expresan TFAFA4 al tiempo que se elimina la proteína TFAFA4 de una manera específica (es decir, sin afectar a genes desconocidos) (Figura 5A). Los inventores han confirmado primero que los transcritos de TFAFA4 se eliminaron por completo en ratones homocigotos TFAFA4^{GFP/GFP} (en esta memoria, ratones TFAFA4-nulos) (Figuras 5B y 5C). Las neuronas GFP⁺ proyectadas a la capa más interna de la lámina II inervaban de forma central y exclusiva la parte pilosa de la piel periféricamente (Figuras 5G-5J).

Utilizando registros de fijación por voltaje y formación de imágenes con calcio, los inventores han descubierto que las neuronas GFP⁺ mostraban muchas propiedades de los nociceptores C no mielinizados, incluyendo una capacitancia celular baja, alta resistencia de entrada, potencial de acción de corta duración desprovisto de joroba prominente en la fase de repolarización, y una notable expresión concomitante de las corrientes Nav1.8 resistente a TTX, Ca²⁺ de tipo T de umbral bajo (ICa_T), K⁺ de tipo A (IK_A) y h activada por hiperpolarización (I_h) (Figuras 2A-2C). Los potenciales de recuperación mediados por ICa_T también se observaron normalmente en la repolarización (Figura 2D). La activación de IK_A daba lugar a un retraso en la aparición de potenciales de acción (APs) o potenciales de recuperación como respuesta a etapas de corriente positivas o negativas, respectivamente (Figuras 2D y 6). La presencia homogénea de esas diferentes corrientes configura la descarga de la célula de una manera única, con una respuesta de "caída" despolarizante frente a las etapas de corriente negativa, debido a I_h y un "hueco" en la descarga de AP como respuesta a las etapas de corriente despolarizante. Esas propiedades de descarga se pueden usar como criterios específicos para clasificar las neuronas que expresan TFAFA4.

Las neuronas GFP⁺ no respondían a muchos agentes nociceptivos putativos, incluyendo la capsaicina, el mentol, el sulfato de pregnenolona y 5HT, ni al enfriamiento rápido (Figura 2E). En contraste, las neuronas GFP⁺ mostraban respuestas diferenciales frente al agonista de TRPA1, isotiocianato de alilo (AITC) y una solución hipoosmótica (Figura 2E), lo que sugiere cierta heterogeneidad funcional dentro de los C-LTMRs.

Las características clásicas de los C-LTMRs, incluidas las velocidades de conducción lentas, los trenes de picos como respuesta a una fuerza mecánica ligera y la adaptación lenta a un estímulo mecánico sostenido, se han determinado utilizando preparaciones *ex vivo* de nervios de la piel (Bessou et al., 1971; Li et al., 2011; Seal et al., 2009; Woodbury et al., 2001). Una aplicación de fuerzas mecánicas sobre el cuerpo celular de neuronas GFP⁺ revelaba la presencia de corrientes catiónicas activadas mecánicamente (MA) en el 95% de las neuronas analizadas (Figuras 2F y 2G). Aunque las corrientes MA de adaptación rápida podían encontrarse ocasionalmente (15%), las corrientes MA de adaptación lenta y ultralenta eran predominantes (21,3 y 57,9%, respectivamente) en las neuronas GFP⁺ (Figura 2F). Todas esas corrientes eran catiónicas y no selectivas, con un potencial de inversión que oscilaba entre -2 y +4 mV. De acuerdo con las propiedades de adaptación lenta de las corrientes MA, un estímulo en rampa de velocidad lenta era capaz de desencadenar APs (Figura 2G), lo que indica que las neuronas GFP⁺ mecanosensoriales responden a los estímulos de movimiento lento.

En conclusión, todos los datos de expresión anteriores, combinados con la formación de imágenes con calcio y los registros electrofisiológicos, demuestran que las neuronas TFAFA4⁺ muestran propiedades fisiológicas de mecanonociceptores C no mielinizados.

III.3. Los ratones TFAFA4-nulos desarrollan una hipersensibilidad mecánica y química inducida por lesiones graves

Para obtener una información sobre el papel funcional de TFAFA4 en C-LTMRs, los inventores han sometido a los ratones TFAFA4-nulos a una amplia serie de pruebas somatosensoriales en condiciones de dolor agudo, inflamatorio y neuropático. Los ratones TFAFA4-nulos parecían normales en términos de peso corporal, campo abierto (Figura 6A) y perfiles de Rotarod (Figura 6B), lo que demostraba que los ratones TFAFA4-nulos no tienen anomalías en la actividad motora o ansiedad. Los inventores no han encontrado diferencias entre los ratones WT y TFAFA4-nulos en la placa caliente (Figura 6C), el ensayo de gradiente de termotaxis (Figura 6D) o la prueba de Hargreaves (Figura

6E), así como en la placa fría, la elección de dos temperaturas y las pruebas dinámicas de placa fría y caliente. A continuación, los inventores han sometido a ensayo la capacidad de los ratones TFAA4-nulos para detectar estímulos mecánicos en condiciones de dolor agudo, inflamatorio y neuropático.

En el modelo con adyuvante completo de Freund (CFA), la sensibilidad mecánica se midió utilizando el aparato automatizado de Von Frey (Figura 3A). Ambos genotipos mostraban una disminución significativa del umbral de retirada de la pata tratada, 24 horas después de la inyección de CFA. Cuando se sometieron a ensayo 3 días después del CFA, los ratones TFAA4-nulos mostraban un umbral de retirada significativamente menor que en comparación con los ratones WT.

Una recuperación completa de ambos genotipos se logró 7 días después de la inflamación. Para explorar más a fondo el papel de TFAA4 en la sensibilidad mecánica, los inventores han utilizado filamentos de Von Frey como respuesta al carragenano (Figuras 3B-3E). De acuerdo con el modelo de CFA, los ratones TFAA4-nulos mostraban una hipersensibilidad prolongada frente al dolor como respuesta a todos los filamentos analizados, 3 y 7 días después del tratamiento. Muy interesante, los ratones TFAA4-nulos mostraban una hipersensibilidad mecánica incrementada, ya 1 y 3 horas después del tratamiento con carragenano con todos los filamentos, incluyendo los calibres más finos de 0,07 y 0,4 g, lo que sugiere un papel importante de TFAA4 en la alodinia táctil (Figuras 3B-3E).

Finalmente, para evaluar el papel de TFAA4 en el dolor neuropático, los inventores han utilizado la constricción crónica del modelo de nervio ciático (CCI) (Figuras 3F-3H). Los ratones TFAA4-nulos mostraban un fenotipo de hipersensibilidad mecánica prolongada para todos los filamentos analizados, demostrando un papel de TFAA4 en el dolor neuropático.

III.4. TFAA4 recombinante humana recuperaba completamente la hipersensibilidad al dolor mecánico e inducido por formalina en ratones TFAA4-nulos

Una administración intratecal de 2 µg de TFAA4 recombinante humana, siete días después de carragenano o 30 días después de CCI, revertía ambos fenotipos de hipersensibilidad observados en los ratones TFAA4-nulos a los niveles de WT (Figuras 3B-3H, día 7+TFAA4 y día 30+TFAA4). Para analizar si la hipersensibilidad mecánica incrementada en los ratones TFAA4-nulos era específica de la modalidad, los inventores han llevado a cabo la prueba con formalina (Figuras 3I y 3J). Una inyección intraplantar de 10 µl de formalina al 2% desencadenaba una primera respuesta fuerte al dolor en ambos genotipos. Los ratones TFAA4-nulos mostraban una respuesta enormemente elevada en la segunda fase, lo que sugiere una mayor sensibilización central en esos ratones. Es importante destacar que la hipersensibilidad inducida por formalina en los ratones TFAA4-nulos se revertía a niveles de WT después de la administración intratecal de TFAA4, quince minutos antes de la inyección de formalina (Figura 3K).

Tomados en conjunto, los resultados anteriores demuestran que se requiere TFAA4 para mantener el umbral normal de hipersensibilidad frente al dolor mecánico y químico inducido por lesiones.

III.5. Las neuronas de la lámina II muestran una excitabilidad aumentada en ratones TFAA4-nulos

Para explorar más a fondo el fenotipo de sensibilización central inducido por una pérdida de TFAA4, los inventores han realizado registros de células completas de neuronas de la lámina II en cortes de la médula espinal fijados a la raíz dorsal de ratones WT (n = 19) y TFAA4-nulos (n = 25). Sin embargo, una inyección de impulsos de corriente despolarizante con amplitudes crecientes (0-50 pA), provocaba más potenciales de acción en las neuronas TFAA4-nulas que en las WT (Figuras 4A1 y 4A2, ANCOVA, p < 0,001). Este efecto era aún más pronunciado al inicio del impulso de corriente despolarizante, ya que las neuronas TFAA4-nulas mostraban una mayor frecuencia de descarga al comienzo del impulso de la corriente, antes de adaptarse a tasas de descarga comparables con las de las neuronas WT (Figura 4A3). Además, una inyección de impulsos de corriente hiperpolarizante (-50 o -25 pA) provocaba un AP de recuperación más alto en las neuronas TFAA4-nulas que en comparación con WT (Figuras 4A1 y 4A4, p = 0,049 y p = 0,001 respectivamente). En conjunto, estos datos demuestran un aumento de la excitabilidad de las neuronas de la lámina II en los ratones TFAA4-nulos.

Las diferencias observadas en los ratones TFAA4-nulos muestran una regulación diferencial de las corrientes de umbral bajo que se inactivan lentamente. Para caracterizar esas corrientes, los inventores han medido la corriente de salida producida a -40 mV en las neuronas de la lámina II, utilizando un protocolo de rampa de voltaje simétrico (-40 a -120 y de vuelta a -40 mV). Mientras que en las neuronas WT se podía observar una corriente de salida con una desensibilización lenta al final de la rampa de voltaje ascendente, esa corriente estaba casi ausente en las neuronas TFAA4-nulas (Figuras 4B1 y 4B2, p = 0,001). Como TFAA4 recombinante administrada intratecalmente disminuye el comportamiento exagerado frente al dolor en ratones TFAA4-nulos lesionados, los inventores han examinado los efectos de añadir TFAA4 humana recombinante sobre las neuronas de la lámina II de ratones TFAA4-nulos. Los inventores han encontrado que una aplicación exógena de TFAA4 (20-30 mn, 20 nM) inducía la expresión de una corriente de salida, similar a la observada en las neuronas de animales WT en condiciones de control (es decir, sin TFAA4) (Figuras 4C1 y 4C2, n = 19, p < 0,001). Esta corriente no se vio afectada por TEA externa (2,5 mM, n = 3), pero se bloqueaba completamente mediante 4AP (1 mM), lo que demuestra que la farmacología de corriente de tipo A está involucrada, es decir, los canales iónicos de potasio. Estos efectos eran

específicos de TFAA4, ya que la adición de TFAA5 recombinante (n = 5, Figuras 4D1 y 4D2) o TFAA2 (n = 6, Figura 4D2) no podía provocar ese umbral bajo de corriente de salida de las neuronas TFAA4-nulas.

Después de la adición de TFAA4, la distribución de las intensidades de corrientes de salida entre las neuronas de la lámina Ili se ajustó mejor mediante una combinación de dos curvas gaussianas, lo que revelaba la existencia de dos poblaciones distintas: un tercio de las neuronas mostraba corrientes de salida significativas mientras que las neuronas restantes eran débiles o no estaban afectadas por la aplicación de un baño de TFAA4 (Figura 4E1). Una caracterización fenotípica de las neuronas sensibles a TFAA4 mostraba que TFAA4 provocaba corrientes de salida similares tanto en las neuronas positivas para GAD como en las negativas para GAD (Figura 4E2).

Los datos experimentales muestran que TFAA4 debilita un subconjunto de interneuronas excitadoras glutamérgicas (GAD-) e inhibitoras GABAérgicas (GAD+), preferiblemente mediante la activación de corrientes de salida de umbral bajo. En particular, dado que la transmisión excitadora parece dominar el procesamiento sensorial en la sustancia gelatinosa de la médula espinal (correspondiente a la lámina II de la médula espinal), el resultado neto de tal debilitamiento doble de las neuronas GABAérgicas y glutamérgicas a través de TFAA4, estaría dominado por una disminución de la transmisión excitadora, reduciendo de este modo la cantidad de información nociceptiva transmitida a las neuronas de la proyección de la lámina I. Por lo tanto, el compuesto de TFAA4 de acuerdo con la invención reduce la información nociceptiva al disminuir la transmisión excitadora en las interneuronas de la médula espinal.

Entre las corrientes de umbral bajo, las corrientes de calcio I_h y de tipo T también pueden dar forma a la descarga de las neuronas de la lámina Ili. Para caracterizar las corrientes similares a I_h en ratones WT y TFAA4-nulos, los inventores han cuantificado la caída provocada por hiperpolarización, midiendo la diferencia entre los potenciales de pico y de estado estacionario como respuesta a un impulso de corriente hiperpolarizante (Figura 7B1). Los inventores han descubierto que las corrientes de tipo T aisladas evocadas por impulsos de potencial cuadrado (véanse los métodos) eran con frecuencia más débiles en ratones WT que en ratones TFAA4-nulos (Figura 7C1). Un análisis estadístico ha revelado un aumento significativo en las densidades de corriente de tipo T en las neuronas de la lámina Ili TFAA4-nulas, en comparación con las WT (Figura 7C2; p = 0,001).

Tomados en conjunto, los resultados anteriores indican que TFAA4 modula la intensidad de las corrientes de salida de umbral bajo en las neuronas de la lámina Ili, directa o indirectamente.

IV. Efecto analgésico de TFAA4 intratecal en animales con dolor neuropático

IV.1. Modelo de dolor neuropático SNI

Se empleó el modelo SNI (lesión nerviosa conservada, desarrollada por Decosterd y Woolf, 2000; Pain, Vol. 87, p 149-158). El modelo SNI consiste en la transección de las ramas tibiales y del nervio peroneo común del nervio ciático: el nervio sural permanece intacto. Este último desarrolla signos de dolores neuropáticos con alodinia mecánica sustancial. El modelo SNI tiene muchas ventajas:

- El dolor neuropático es persistente. Esto permite comprender los fenómenos de habituación tras inyecciones repetidas de TFAA4.
- El dolor generado es fuerte.
- El modelo es muy reproducible.

IV.2. Estudio de dosis-efecto

Para determinar la concentración óptima, se realizó una primera prueba en un modelo de dolor inflamatorio «rápido» (1% de carragenano).

Procedimiento:

Se emplean 18 ratones TFAA4-KO machos de ocho semanas de edad.

TFAA4 humana recombinante (nº 5099-TA, R&D, lote nº PXC0213101) se resuspende en NaCl al 0,9% con 3 concentraciones diferentes (12,5 µg/ml, 50 µg/ml y 200 µg/ml). Medición de filamentos de Von Frey con el método arriba/abajo para determinar la línea base. Inyección intraplantar de 20 µl de carragenano (1%) en una pata trasera.

Medición del umbral de respuesta 4 h después de la inyección para verificar la aparición de dolor inflamatorio.

Un día más tarde, se realiza una nueva medición.

A continuación, se realiza una inyección intratecal ciega de 10 µl de solución de TFAA4 con 3 concentraciones diferentes (n = 6 a 12,5 µg/ml; n = 5 a 50 µg/ml; n = 6 a 200 µg/ml).

La medición del umbral de respuesta se realiza 30 minutos después de la inyección.

Resultados:

Los resultados se muestran en la Fig. 8. La aparición de alodinia mecánica se observa 4 horas después de la inyección de carragenano, y se conserva 24 h más tarde. La inyección de 10 µl de cada una de las soluciones de TFAA4 inducía un fuerte aumento en la respuesta umbral frente a los filamentos de Von Frey. Las tres concentraciones analizadas inducían una reducción estadísticamente significativa del dolor inducido por carragenano (* p <0,05).

Esas concentraciones (12,5; 50 y 200 µg/ml) se usaron para las pruebas posteriores del efecto analgésico de TFAA4 mediante una inyección intratecal en el modelo de dolor neuropático SNI.

IV.3. Inyección intratecal en animales con SNI

Procedimiento:

Los experimentos se llevan a cabo en ratones WT C57Bl6 de ocho semanas de edad. Se usaron 42 ratones. TFAA4 humana recombinante (nº 5099-TA, R&D, lote nº PXC0213101) se resuspende en NaCl al 0,9% con 3 concentraciones diferentes (12,5 µg/ml, 50 µg/ml y 200 µg/ml). Se usa una solución de 200 µg/ml de BSA como control negativo. Después de haber medido el umbral base de los ratones con filamentos de Von Frey mediante el método de arriba/abajo, el módulo SNI se coloca en su lugar. Se anestesian los ratones, se pone en práctica la ligadura del nervio tibial y el nervio fibular y luego se cortan esos dos nervios. El nervio sural que se ha dejado intacto, desarrolla una neuropatía con bastante rapidez. Tres días después de la cirugía, se determina la aparición de una neuropatía. Se observa de este modo una disminución del umbral de respuesta frente a los filamentos de Von Frey de la pata ipsilateral.

Siete días después de la cirugía, se vuelve a medir el umbral de respuesta. Después se inyectan intratecalmente de forma ciega 10 µl de cada una de las 3 soluciones de TFAA4 (n = 10 a 12,5 µg/ml; n = 10 a 50 µg/ml; n = 9 a 200 µg/ml) y de solución BSA (n = 10).

El umbral de respuesta se mide después de 30 minutos, 2 horas, 4 horas, 6 horas y luego 24 horas después de la inyección.

Resultados:

Los resultados se presentan en la Fig. 9. Después de la inyección intratecal, se observaba un aumento significativo del umbral de respuesta para las tres soluciones de TFAA4, apenas 30 minutos después de la inyección. Por otro lado, la inyección de BSA no tenía ningún efecto sobre el umbral de respuesta de los ratones. Después de 2 h, el efecto analgésico se conserva al máximo para las tres concentraciones. Después de 4 h, los ratones que habían recibido una inyección de 2 µg de TFAA4, todavía muestran un umbral de respuesta alto (**: p <0,01; *: p <0,05). También se realizó un seguimiento de la respuesta de las patas contralaterales después de una inyección intratecal de soluciones de TFAA4 o BSA, y no se observaron diferencias estadísticas (véase la Fig. 10).

Estos resultados muestran que una inyección intratecal de las tres concentraciones de TFAA4 sometidas a ensayo causaba un efecto analgésico sustancial comparable sobre el dolor neuropático. El efecto de la concentración más alta (200 µg/ml, es decir, 2 µg de TFAA4) dura más tiempo. Además, TFAA4 no inhibía la actividad del impulso nervioso de las neuronas sensoriales, tal y como se indica por una falta de cambio en la respuesta de la pata contralateral.

V. Efecto analgésico de TFAA4 subcutáneo en animales con dolor neuropático

Este ejemplo ilustra el efecto analgésico de TFAA4 sobre un modelo de dolor neuropático después de una inyección subcutánea.

V.1 Estudio de dosis-efecto

Para aprehender las dosis que se pueden analizar por vía subcutánea, se realizó una primera prueba "rápida" en un modelo de dolor inflamatorio (1% de carragenano) en un número restringido de ratones TFAA4-KO.

Procedimiento:

Se usan 9 ratones TFAA4-KO machos de ocho semanas de edad. TFAA4 humana recombinante (nº 5099-TA, R&D, lote nº PXC0213101) se resuspende en NaCl al 0,9% con 2 concentraciones diferentes (10 µg/ml y 30 µg/ml), para una inyección de 10 µl por gramo. Medición con filamentos de Von Frey por el método de arriba/abajo para determinar la línea base. Inyección intraplantar de 20 µl de carragenano (1%) en una pata trasera. Medición del umbral de respuesta, 24 h después de la inyección, seguido de una inyección ciega subcutánea de una solución de TFAA4 con 2 concentraciones diferentes (n = 3 a 100 µg/kg; n = 3 a 300 µg/kg) o una solución de pregabalina a 30 mg/kg (n = 3), para el experimentador.

Medición del umbral de respuesta, 30 minutos después de la inyección de los compuestos, y posteriormente a las 2

h y 4 h.

Resultados:

Los resultados se muestran en la Fig. 11. Después de la inyección de carragenano, los ratones desarrollaron una alodinia mecánica. La inyección de pregabalina provoca un aumento en el umbral de respuesta. De manera similar, la inyección de TFAA4 también inducía un aumento estadísticamente significativo en el umbral de respuesta con 100 µg/kg e incluso más fuerte con 300 µg/kg.

TFAA4 causaba por lo tanto un efecto analgésico mediante una inyección subcutánea en el modelo con carragenano.

V.2 Inyección subcutánea en animales con SNI

10 Procedimiento:

Los experimentos se realizaron en ratones WT C57Bl6 machos de ocho semanas de edad. Se usaron 48 ratones. TFAA4 humana recombinante (nº 5099-TA, R&D, lote nº PXC0213101) se resuspende en NaCl al 0,9% con 3 concentraciones diferentes (3 µg/ml, 10 µg/ml y 30 µg/ml). Se utiliza una solución de 30 µg/ml de BSA como control negativo. Después de haber medido el umbral base de los ratones con filamentos de Von Frey por el método de arriba/abajo, el modelo SNI se coloca en su lugar. Se anestesian los ratones, se pone en práctica la ligadura del nervio tibial y del nervio fibular y luego se seccionan esos dos nervios. El nervio sural que se ha dejado intacto desarrolla una neuropatía con bastante rapidez. La aparición de una neuropatía se determina 3 días después de la cirugía. Se observa de este modo una disminución en el umbral de respuesta frente a los filamentos de Von Frey de la pata ipsilateral.

20 Siete días después de la cirugía, se vuelve a medir el umbral de respuesta. Después se inyectan por vía subcutánea de forma ciega 100 µl/10 g de cada una de las soluciones de TFAA4 (n = 11 a 30 µg/kg; n = 12 a 100 µg/kg; n = 11 a 300 µg/kg) y de BSA (n = 12) para el experimentador.

El umbral de respuesta se mide 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas y luego 24 horas después de la inyección.

Resultados (Fig. 12):

25 La inyección subcutánea de TFAA4 inducía un fuerte aumento en el umbral de respuesta ya 1 hora después de la inyección. Ese efecto se mantuvo durante al menos 4 h con las tres concentraciones analizadas. En cuanto a la inyección intratecal, el efecto parece durar más con la concentración más alta.

Por lo tanto, una inyección subcutánea de TFAA4 induce un efecto analgésico sobre la alodinia mecánica inducida por el modelo de dolor neuropático con SNI. La concentración de 300 µg/kg se usó para la continuación del estudio.

30 VI. TFAA4 induce un efecto analgésico sostenido sin efectos secundarios

Los fines de estos experimentos eran confirmar adicionalmente el efecto analgésico de TFAA4 mediante una inyección subcutánea en el modelo SNI, y verificar que ese efecto se conserva y es seguro al lograr varios puntos de inyección.

Procedimiento:

35 Los experimentos se realizaron en ratones WT C57Bl6 machos de ocho semanas de edad. Se usaron 24 ratones. TFAA4 humana recombinante (nº 5099-TA, R&D, lote nº PXC0213101 y nº PXC0214011) se resuspende en 30 µg/ml de NaCl al 0,9%. Se utiliza una solución de 30 µg/ml de BSA como control negativo. Después de haber medido el umbral base de los ratones con filamentos de Von Frey según el método de arriba/abajo, se pone en su lugar el modelo SNI. Se anestesian los ratones, se pone en práctica la ligadura del nervio tibial y del nervio fibular y luego se seccionan esos dos nervios. El nervio sural que se ha dejado intacto, desarrolla neuropatía con bastante rapidez.

40 Siete días después de la cirugía, se observa una disminución del umbral de respuesta frente a los filamentos de Von Frey de la pata ipsilateral. A continuación se inyectan de forma ciega por vía subcutánea 10 µl/g de las soluciones de TFAA4 (300 µg/kg) y BSA (n = 12 para cada uno de los grupos de BSA y TFAA4). El umbral de respuesta se mide 1 hora, 2 horas, 4 horas y 6 horas después de la inyección. El mismo procedimiento experimental se lleva a cabo 7 días, 14 días y 21 días después de la cirugía.

Resultado (Fig. 13):

50 Se observó un fuerte aumento en el umbral de respuesta frente a una estimulación mecánica después de una inyección subcutánea de 300 µg/kg de TFAA4, 7 días, 14 días y 21 días después de la cirugía. Se puede alcanzar aproximadamente un 40-50% del valor inicial (antes de la cirugía). En los tres casos, el efecto se mantuvo similar (sin diferencias significativas) tal y como lo indica el análisis de las áreas bajo la curva.

Por lo tanto, estos resultados confirman el potente efecto analgésico de la proteína TFAA4 o un agonista de la misma de la invención.

Varios órganos (hígado, bazo, riñones, corazón y pulmones) de los animales tratados por vía subcutánea se extrajeron y se congelaron para estudios posteriores. El peso de los animales tratados se controló durante todo el experimento. No se observó ninguna diferencia en la curva del peso (Fig. 14). Además, los diversos órganos extraídos se pesaron con escalas de precisión, antes de prepararlos en paraformaldehído al 4% (PFA) durante una noche a 4°C, y luego se incubaron en sacarosa al 30% antes de conservarlos criogénicamente en OCT a -80°C. No se observó ninguna diferencia en ninguno de los órganos analizados (hígado, bazo, riñones, corazón y pulmones) entre los animales tratados y los animales de control.

Por lo tanto, nuestros resultados muestran el efecto de una proteína TFAA4 en un modelo de dolor neuropático por SNI. La alodinia mecánica (disminución del umbral de respuesta) inducida por este modelo se puede inhibir mediante una inyección intratecal o subcutánea de TFAA4. Es importante tener en cuenta que las dosis utilizadas son bajas (2 µg por vía intratecal y 6-8 µg por vía subcutánea). Además, el umbral de respuesta de las patas contralaterales se mantuvo sin cambios después de la inyección de TFAA4, lo que demuestra que TFAA4 no actúa como un agente que bloquea los impulsos nerviosos.

VII Conclusiones

- La presente invención demuestra, por primera vez, que la proteína TFAA4 está implicada en el control del dolor, y muestra su eficacia en el tratamiento del dolor en diferentes modelos de dolor.
- La invención también muestra que TFAA4 se expresa específicamente en neuronas sensoriales C-LTMRs de pequeño diámetro.
- La invención muestra además que la pérdida de función de TFAA4 conducía a un aumento de la hipersensibilidad química y mecánica inducida por lesiones y a una excitabilidad mejorada de las neuronas de la lámina Ili.
- La invención también muestra que las fibras aferentes TFAA4⁺ inervan exclusivamente los folículos pilosos en la periferia y se proyectan centralmente hacia la capa más interna de la lámina II.
- La invención muestra que Tafa4 modula la excitabilidad neuronal y el umbral de la sensación somática.
- La invención muestra además que la proteína TFAA4 se puede dirigir específicamente a señales nociceptivas inducidas mecánica y químicamente.
- La invención también muestra que los compuestos y composiciones de TFAA4 son capaces de activar una nueva vía analgésica, modulando la excitabilidad mediada por nociceptores C-LTMRs de las interneuronas de la médula espinal (preferiblemente interneuronas de la lámina Ili), por ejemplo, mediante una modulación de la actividad de los receptores presentes en dichas interneuronas (tales como canales de iones de potasio, canales de iones de calcio o receptores de lipoproteínas de baja densidad, por ejemplo, LRP1).
- Los inventores también proponen que TFAA4 puede regular los canales presinápticos en fibras aferentes primarias que a su vez aumentan la transmisión sináptica. Después de la sinapsis, las fibras aferentes C-LTMR "TFAA4érgicas" se enfrentan a una red de interneuronas de la lámina Ili glutamérgicas excitadoras y GABAérgicas/Glicinérgicas inhibitoras que están conectadas a las neuronas de proyección que residen en la lámina I.
- Los inventores muestran además que la hipersensibilidad al dolor mecánico e inducido por formalina en ratones TFAA4-nulos se revertía a niveles de WT después de una administración de TFAA4 recombinante humana.
- Todos los datos experimentales mostrados por los inventores en la presente solicitud, también revelaron que TFAA4 derivada de C-LTMRs modula la segunda fase del dolor provocado con formalina. En particular, los datos proporcionados en esta memoria muestran que los ratones TFAA4-nulos mostraban un dolor provocado con formalina exagerado/incrementado. Los inventores proponen que el comportamiento nocifensivo provocado por la formalina podría desencadenarse específicamente a través de las neuronas sensoriales C-LTMRs.
- Un marcado genético de las neuronas que expresan Tafa4 permitía un estudio detallado *in vitro* de las propiedades fisiológicas de C-LTMRs. El análisis de fijación por voltaje revelaba una población sorprendentemente homogénea de neuronas con capacitancia baja, APs únicos de corta duración, la presencia de una corriente Nav1.8 resistente a TTX y una notable coexpresión de varias corrientes de umbral bajo, así como corrientes activadas de forma mecánica excitadoras que se adaptan de forma lenta y ultralenta.
- Al comparar el fenotipo del dolor en ratones de tipo silvestre (wt) o TFAA4-nulos, los inventores han establecido la prueba de concepto de que una alteración de la función de TFAA4 provoca una modulación de la excitabilidad neuronal, lo que contribuye a la señalización del dolor. En particular, los inventores han demostrado claramente

que una pérdida de la función de TFAA4 mejora la hipersensibilidad mecánica y química en una variedad de modelos de dolor. En conclusión, el uso de TFAA4, como ingrediente activo para el tratamiento de la señalización del dolor patológico a través de la modulación de la excitabilidad neuronal.

Referencias

- 5 Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267-284.
- Bessou, P., Burgess, P.R., Perl, E.R., and Taylor, C.B. (1971). Dynamic properties of mechanoreceptors with unmyelinated (C) fibers. *J Neurophysiol* 34, 116-131.
- 10 Bennett, G.J., and Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107.
- Descoeur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., Couette, B., Busserolles, J., Courteix, C., Noel, J., et al. (2011). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO molecular medicine* 3, 266-278.
- 15 Hao, J., and Delmas, P. (2010). Multiple desensitization mechanisms of mechanotransducer channels shape firing of mechanosensory neurons. *J Neurosci* 30, 13384-13395.
- Hao, J., and Delmas, P. (2011). Recording of mechanosensitive currents using piezoelectrically driven mechanostimulator. *Nature protocols* 6, 979-990.
- Li, L., Rutlin, M., Abaira, V.E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M.P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H.R., et al. (2011). The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* 147, 1615-1627.
- 20 Moqrich, A., Earley, T.J., Watson, J., Andahazy, M., Backus, C., Martin-Zanca, D., Wright, D.E., Reichardt, L.F., and Patapoutian, A. (2004). Expressing TrkC from the TrkA locus causes a subset of dorsal root ganglia neurons to switch fate. *Nat Neurosci* 7, 812-818.
- Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S., Andahazy, M., Story, G.M., and Patapoutian, A. (2005). Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307, 1468-1472.
- 25 Mouro, A., Fehrentz, T., Le Feuvre, Y., Smith, C.M., Herold, C., Dalkara, D., Nagy, F., Trauner, D., and Kramer, R.H. (2012). Rapid optical control of nociception with an ion-channel photoswitch. *Nat Methods* 9, 396-402.
- Seal, R.P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S.N., Woodbury, C.J., Basbaum, A.I., and Edwards, R.H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462, 651-655.
- 30 Todd, A.J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11, 823-836.
- Tang T., Y., Emtage, P., Funk, W.D., Hu, T., Arterburn, M., Park, E.E., and Rupp, F. (2004). TFAA: a novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain. *Genomics* 83, 727-734.
- Woodbury, C.J., Ritter, A.M., and Koerber, H.R. (2001). Central anatomy of individual rapidly adapting low-threshold mechanoreceptors innervating the "hairy" skin of newborn mice: early maturation of hair follicle afferents. *J Comp Neurol* 436, 304-323.
- 35

Lista de secuencias

- 40 <110> Université d'Aix-Marseille , CNRS
- <120> COMPUESTOS DE TFAA4 Y USOS DE LOS MISMOS PARA TRATAR EL DOLOR
- <130> B1600PC00
- <160> 30
- 45 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 79
- 50 <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<223> proteína TAFA4 humana

5

<400> 1

His Arg Gly His Ala Gly His His Lys Gly Thr Cys Val Val Ala Val
1 5 10 15

His Arg Cys Cys Asn Lys Asn Arg Arg Ser Thr Val Lys Cys Ser Cys
20 25 30

Gly Val Ala Gly Thr Thr Arg Ala Ser Cys Val Ala Ser Val Lys Trp
35 40 45

Trp Cys His Met Asn Cys Gly Asp Cys Lys Val Asp Tyr Ser Gly Trp
50 55 60

Ser Cys Ser Ser Gly Asn Lys Val Lys Thr Thr Lys Val Thr Arg
65 70 75

<210> 2

<211> 104

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

15 <223> proteína TAFA4 de ratón

<400> 2

Gln His Leu Arg Gly His Ala Gly His His Leu Ile Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15

Cys Glu Val Val Ala Val His Arg Cys Cys Asn Lys Asn Arg Ile Glu
20 25 30

Glu Arg Ser Gln Thr Val Lys Cys Ser Cys Phe Pro Gly Gln Val Ala
35 40 45

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

Glu Lys Trp Trp Cys His Met Asn Pro Cys Leu Glu Gly Glu Asp Cys
65 70 75 80

Lys Val Leu Pro Asp Ser Ser Gly Trp Ser Cys Ser Ser Gly Asn Lys
85 90 95

Val Lys Thr Thr Lys Val Thr Arg
100

20

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> agonista de TAFA4, péptido 25aa, parte N-terminal de la proteína TAFA4 humana

30 <400> 3

ES 2 813 629 T3

His Arg Gly His Ala Gly His His Lys Gly Thr Cys Val Val Ala Val
1 5 10 15

His Arg Cys Cys Asn Lys Asn Arg Arg
20 25

<210> 4

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> agonista de TAF4A, péptido 27aa, parte C-terminal de proteína TAF4A humana

<400> 4

Asn Cys Gly Asp Cys Lys Val Asp Tyr Ser Gly Trp Ser Cys Ser Ser
1 5 10 15

Gly Asn Lys Val Lys Thr Thr Lys Val Thr Arg
20 25

<210> 5

15 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> cebador tafa4-F1

<400> 5

tgctcagaag tcatagcca aa 22

<210> 6

25 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> cebador tafa4-R1

<400> 6

35 taaaggaaca ttgcaagct ca 22

<210> 7

<211> 15

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador tafa4-F2

<400> 7

45 atatgtgcag tgtgg 15

<210> 8

<211> 35

<212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador tafa4-R2+T7

<400> 8

55 taatagcact cactataggg cagccaagtt caaac 35

<210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador TH-F1
 <400> 9
 10 aagccaaaat ccaccactta ga 22
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador TH-R1
 20 <400> 10
 ccgtggagag ttttcaatt tc 22
 <210> 11
 <211> 42
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebadorTH-R2+T7
 30 <400> 11
 taatacgact cactataggg agagatgcaa gtccaatgtc ct 42
 <210> 12
 35 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> cebador Vglut3-F1
 <400> 12
 tagctcagtt tccaggaatg gt 22
 45 <210> 13
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> cebador Vglut3-R1
 <400> 13
 55 ggagatctaa caacatctga taacac 26
 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> cebador Vglut3-F2
 <400> 14
 65 cccctagag tatcaggaat tt 22

<210> 15
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador Vglut3-R2+T7
 <400> 15
 10 taatacgact cactataggg tgggaagttt taaaaatcta tgattag 47
 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador TrkB-F1
 20 <400> 16
 ctgagagggc cagtcacttc 20
 <210> 17
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador TrkB-R1
 30 <400> 17
 catggcaggt caacaagcta 20
 <210> 18
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> cebador TrkB-F2
 <400> 18
 cagtgggtct cagcacagaa 20
 45 <210> 19
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> cebador TrkB-R2+T7
 <400> 19
 55 taatacgact cactataggg ctaggaccag gatggctctg 40
 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> cebador MrgprD-F1
 <400> 20
 65 gggcatcaac tgggtcttac tc 22

<210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador MrgprD-R1
 <400> 21
 10 agggattgtc ttgactgtcg 20
 <210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador MrgprD-F2
 20 <400> 22
 aacgggatgt gaggtactt ta 22
 <210> 23
 <211> 42
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador MrgprD-R2+T7
 30 <400> 23
 taatacgact cactataggg atttatgcct tgacttcct ga 42
 <210> 24
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> cebador SCG10-F1
 <400> 24
 gcaatggcct acaaggaaaa 20
 45 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> cebador SCG10-R1
 <400> 25
 55 ggcaggaagc agattacgag 20
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> cebador SCG10-F2
 <400> 26
 65 agcagttggc agagaagagg 20

<210> 27
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador SCG10R2+T7
 <400> 27
 10 taatacgact cactataggg ggcaggaagc agattacgag 40
 <210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido para genotipado de PCR, GFP 436
 20 <400> 28
 gaagaagtcg tgctgctca tgtg 24
 <210> 29
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido para genotipado de PCR, 1585
 30 <400> 29
 ctgtggagga aatggttca act 23
 <210> 30
 35 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> oligonucleótido para genotipado de PCR, 1587
 <400> 30
 ctgcaaagag aagccaaagc tac 23
 45

REIVINDICACIONES

1. Una proteína TFAFA4 aislada o un agonista de la misma, para uso como ingrediente activo para prevenir o tratar el dolor en un sujeto, en donde dicha proteína comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 o una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1 o 2; y en donde dicho agonista es un péptido que comprende menos de 60 residuos de aminoácidos y al menos 10 residuos de aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1 o 2, preferiblemente al menos 20, 25, 27 o 30 residuos de aminoácidos consecutivos.
2. El agonista para uso según la reivindicación 1, en donde dicho agonista es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o 4.
3. La proteína aislada o el agonista para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha proteína o dicho agonista se administra por vía intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, oral, anal, cutánea, subcutánea, dérmica, transdérmica o intratecal al sujeto.
4. La proteína aislada o el agonista para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la dosis de proteína TFAFA4 o de agonista de la misma está comprendida entre 1 µg y 100 mg/kg/día.
5. La proteína aislada o el agonista para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha proteína o dicho agonista se usa en combinación con al menos un compuesto activo adicional, eficaz contra el dolor.
6. La proteína aislada o el agonista para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho sujeto es un mamífero, preferiblemente un ser humano.
7. La proteína aislada o el agonista para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho dolor es un dolor neuropático, un dolor inflamatorio, un dolor mediado por un nociceptor, un dolor agudo, un dolor subagudo, un dolor crónico, un dolor somático, un dolor visceral, alodinia, hiperalgesia o un dolor asociado con una lesión nerviosa.
8. Una composición que comprende (i) una proteína TFAFA4 o un agonista de la misma, en donde dicha proteína comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 o una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1 o 2; y en donde dicho agonista es un péptido que comprende menos de 60 residuos de aminoácidos y al menos 10 residuos de aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1 o 2, preferiblemente al menos 20, 25, 27 o 30 residuos de aminoácidos consecutivos, (ii) al menos un compuesto activo adicional y (iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Un agonista peptídico de una proteína TFAFA4, en donde dicho péptido comprende menos de 60 residuos de aminoácidos y comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o 4 y modula la excitabilidad de nociceptores o interneuronas, preferiblemente de nociceptores de fibra C o interneuronas de la médula espinal.

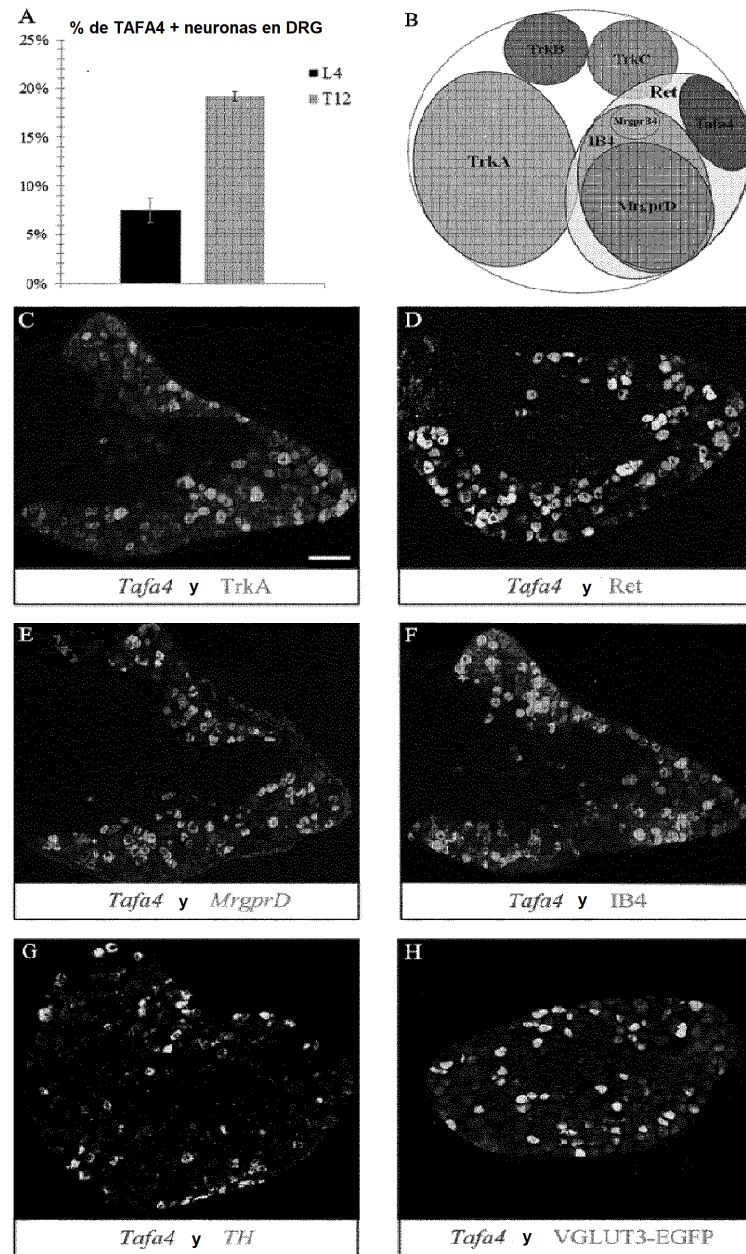
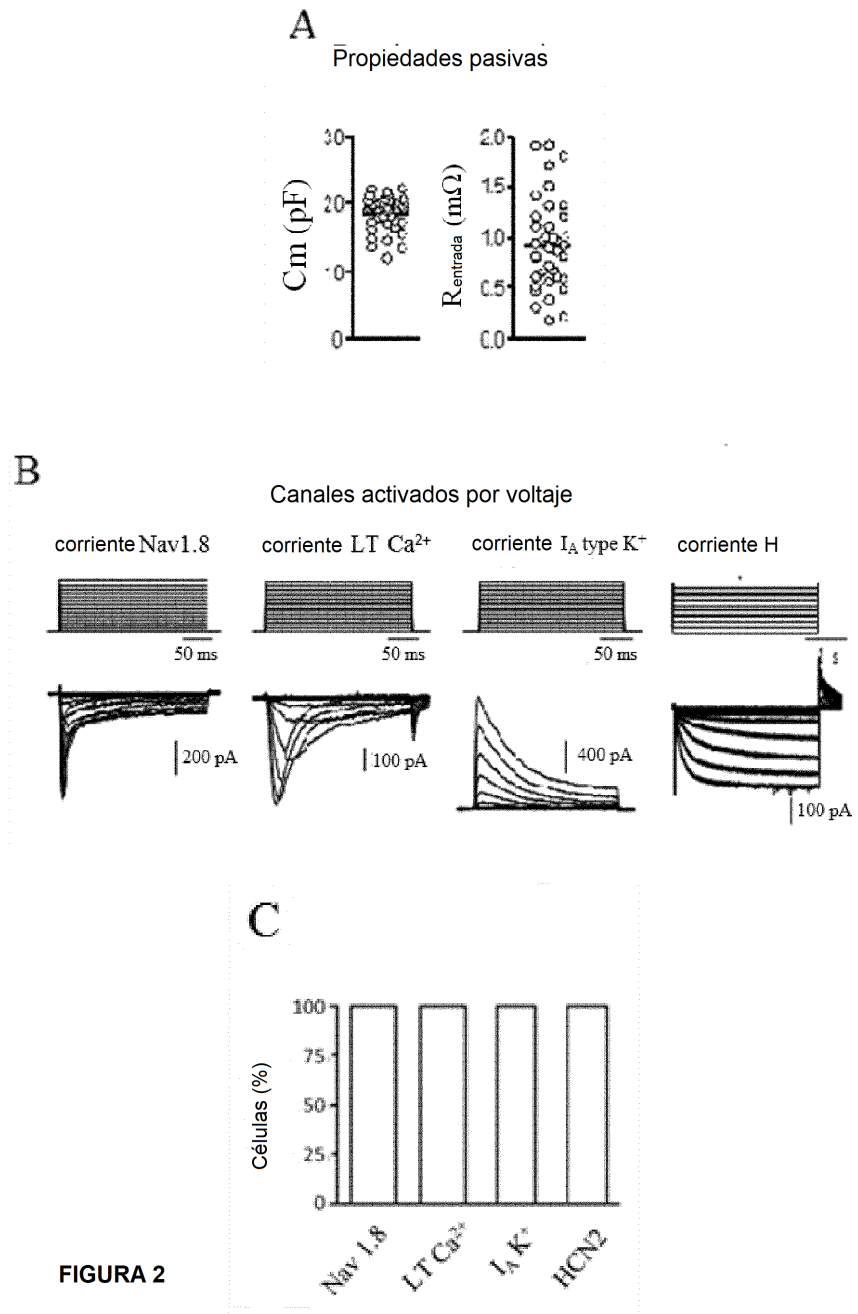


FIGURA 1



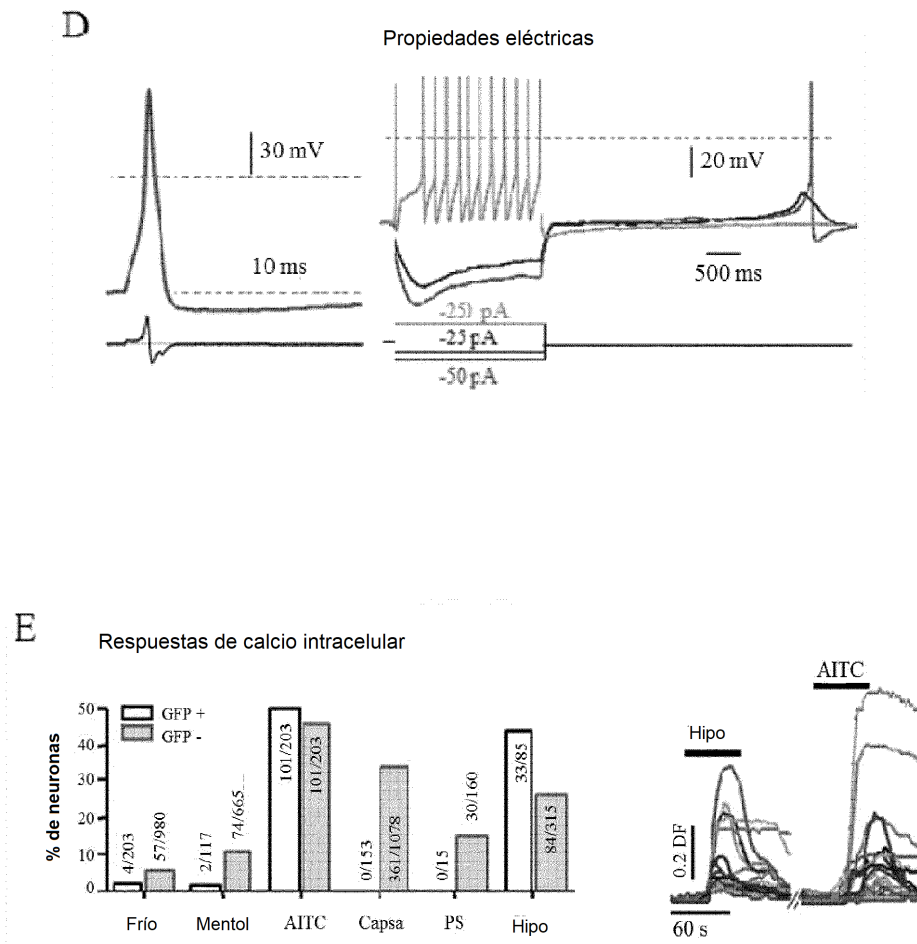
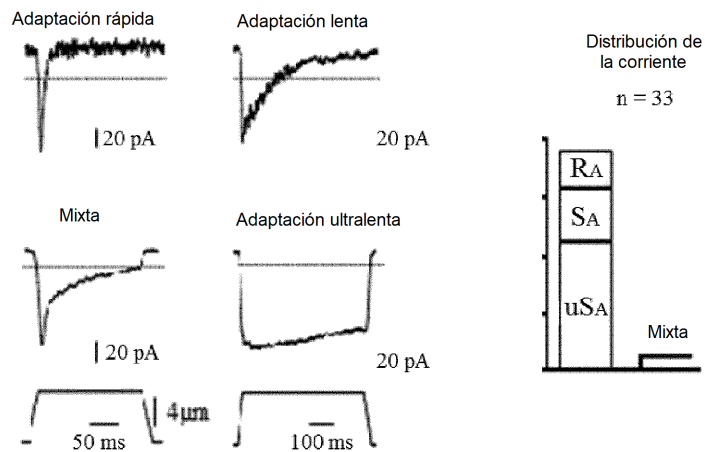


FIGURA 2 cont.

F

Corrientes catiónicas activadas mecánicamente



G

AP desencadenado mecánicamente

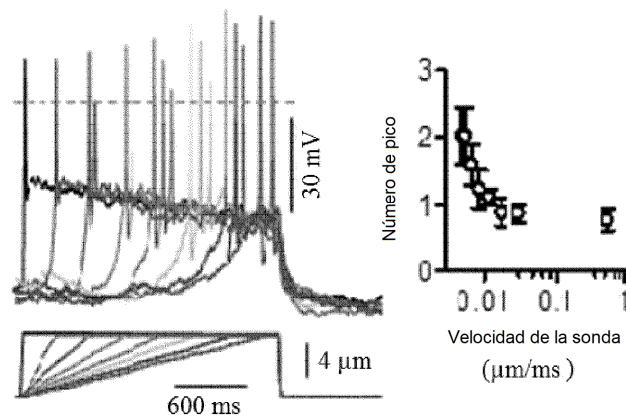
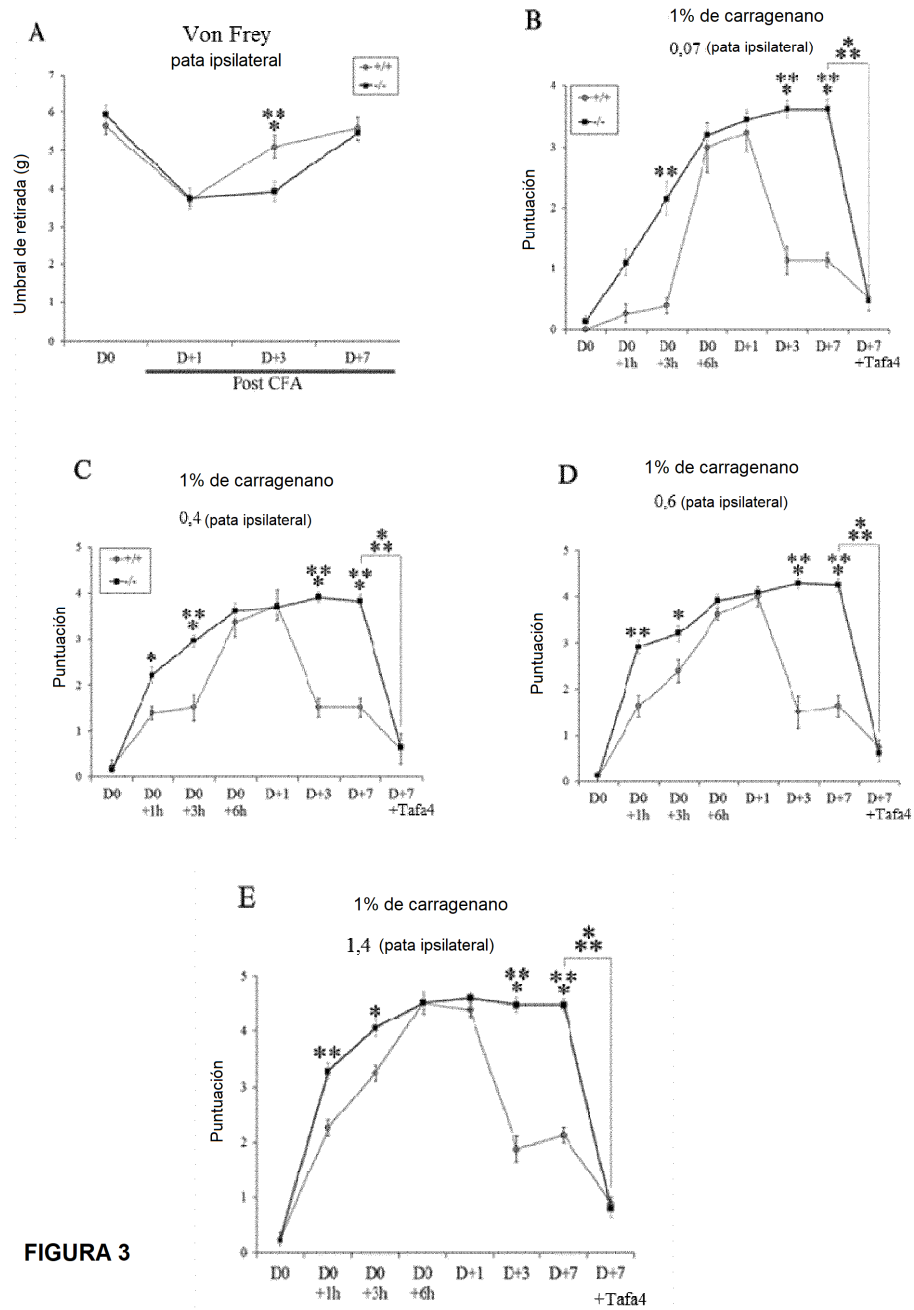


FIGURA 2 cont.



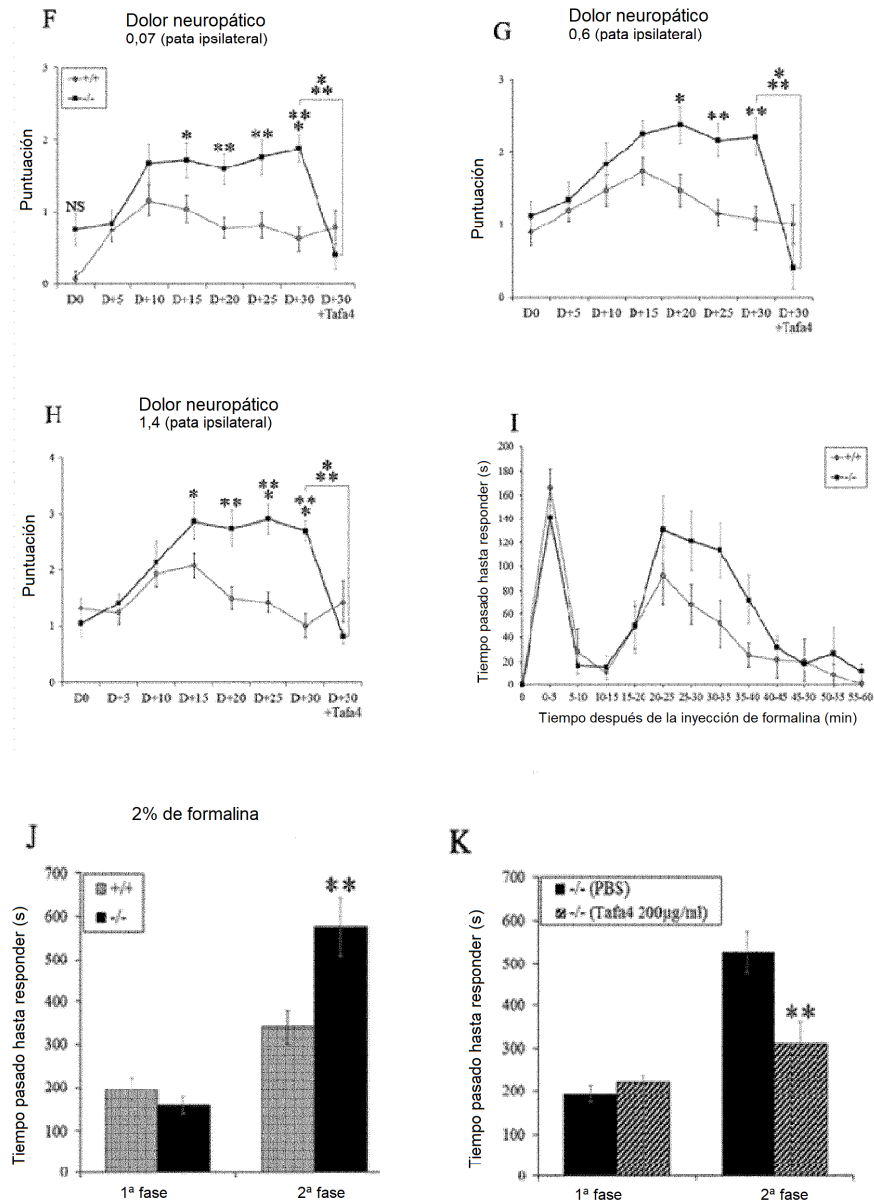


FIGURA 3 cont.

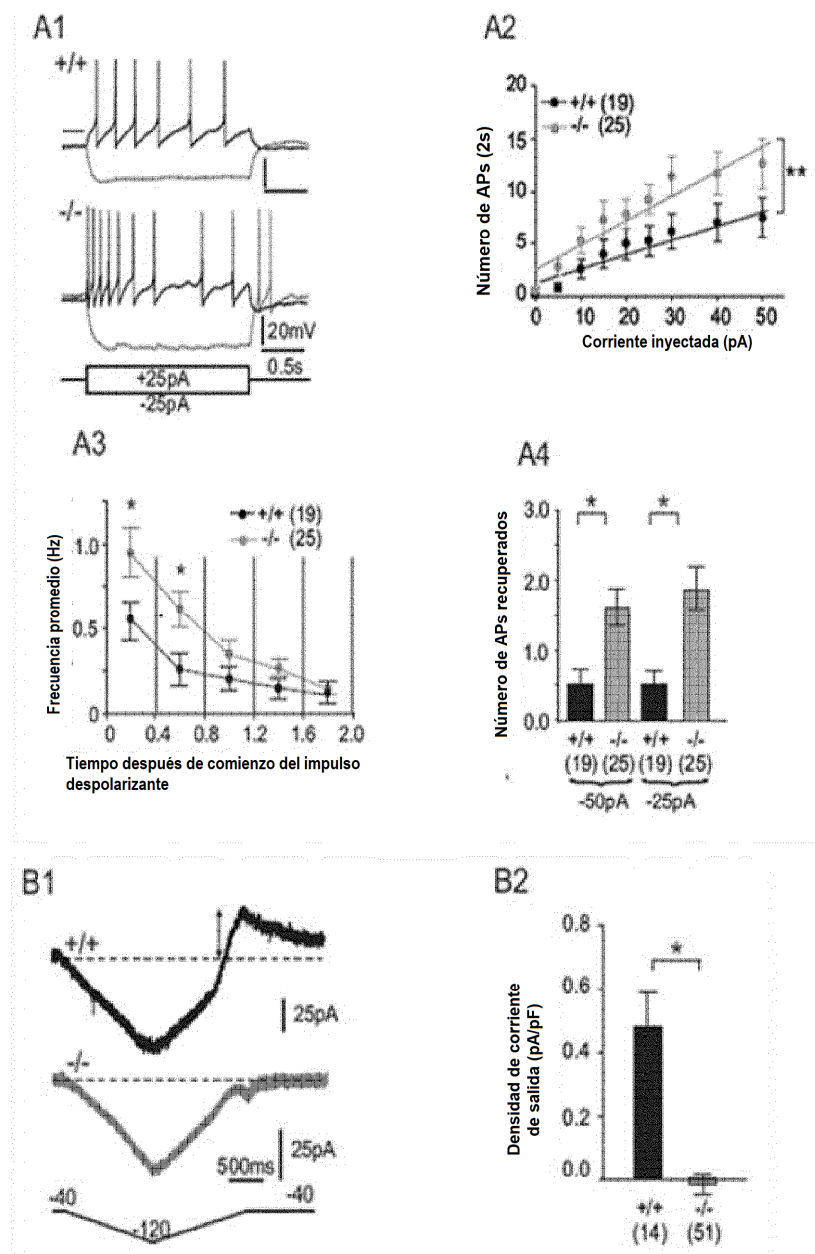


FIGURA 4

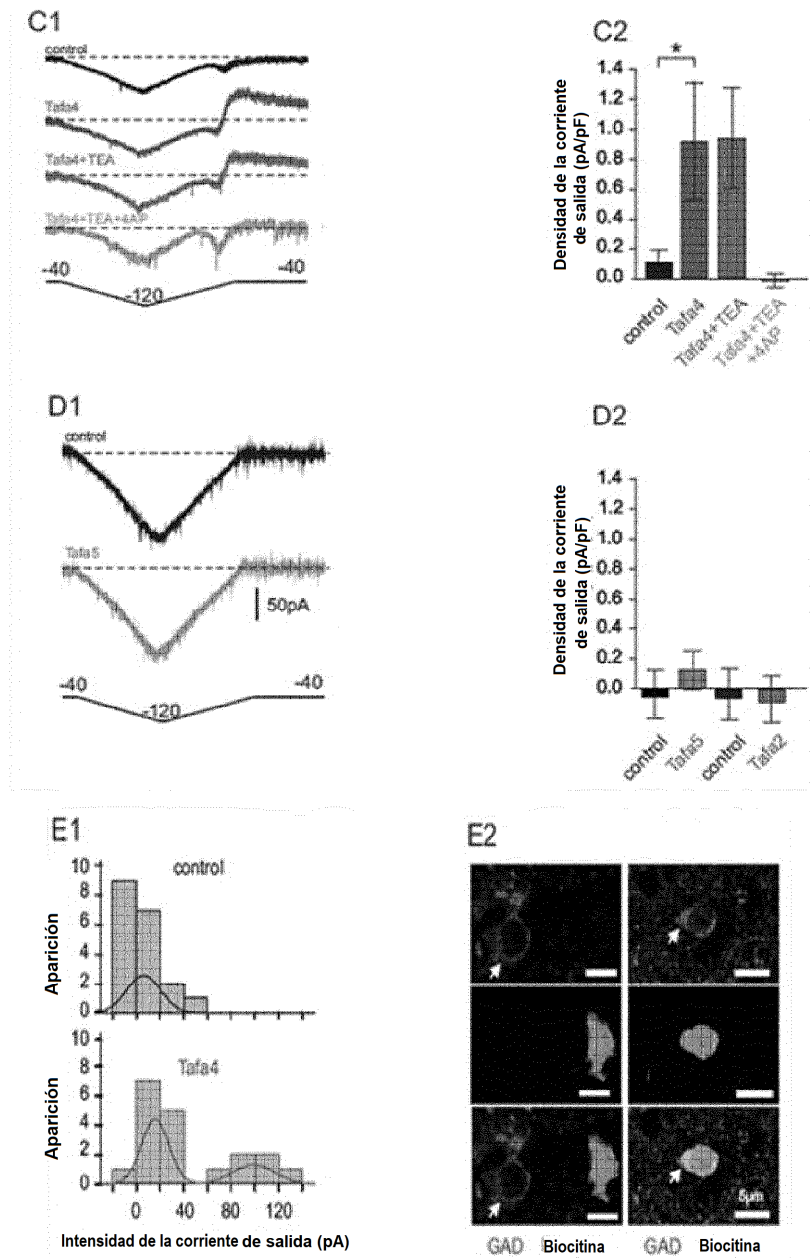


FIGURA 4 cont.

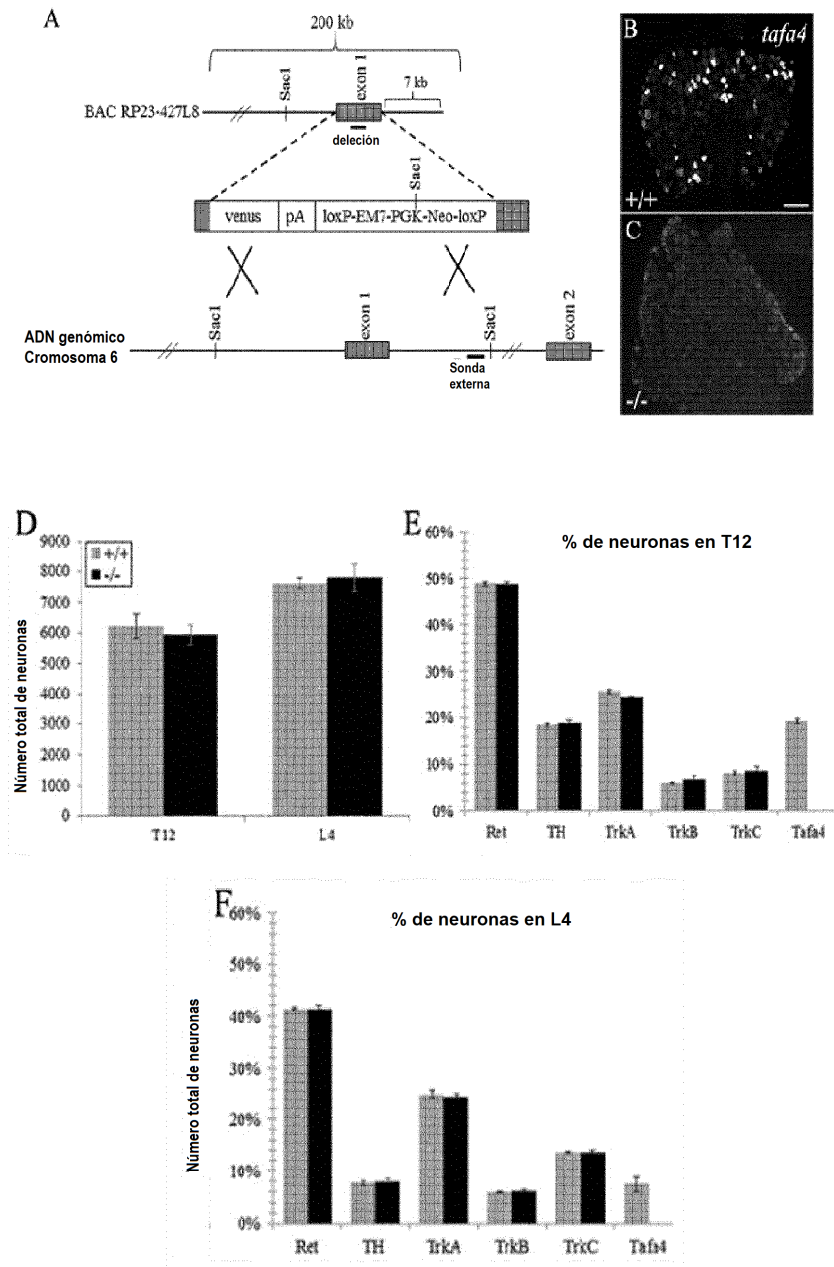


FIGURA 5

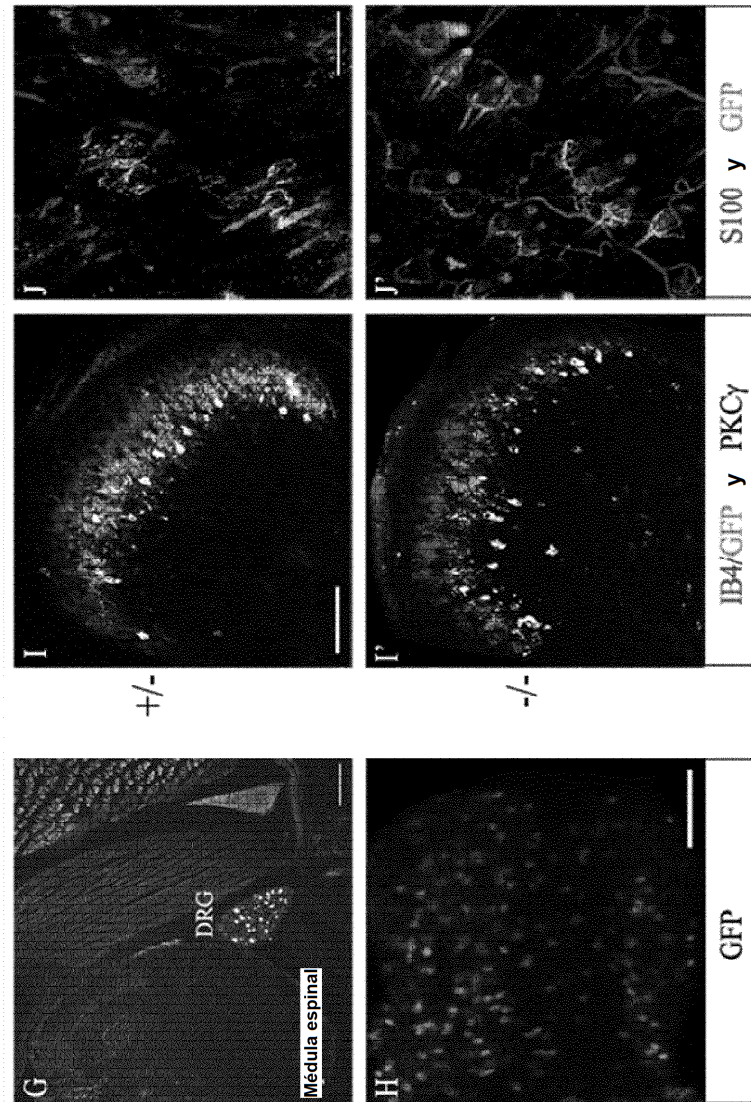


FIGURA 5 cont.

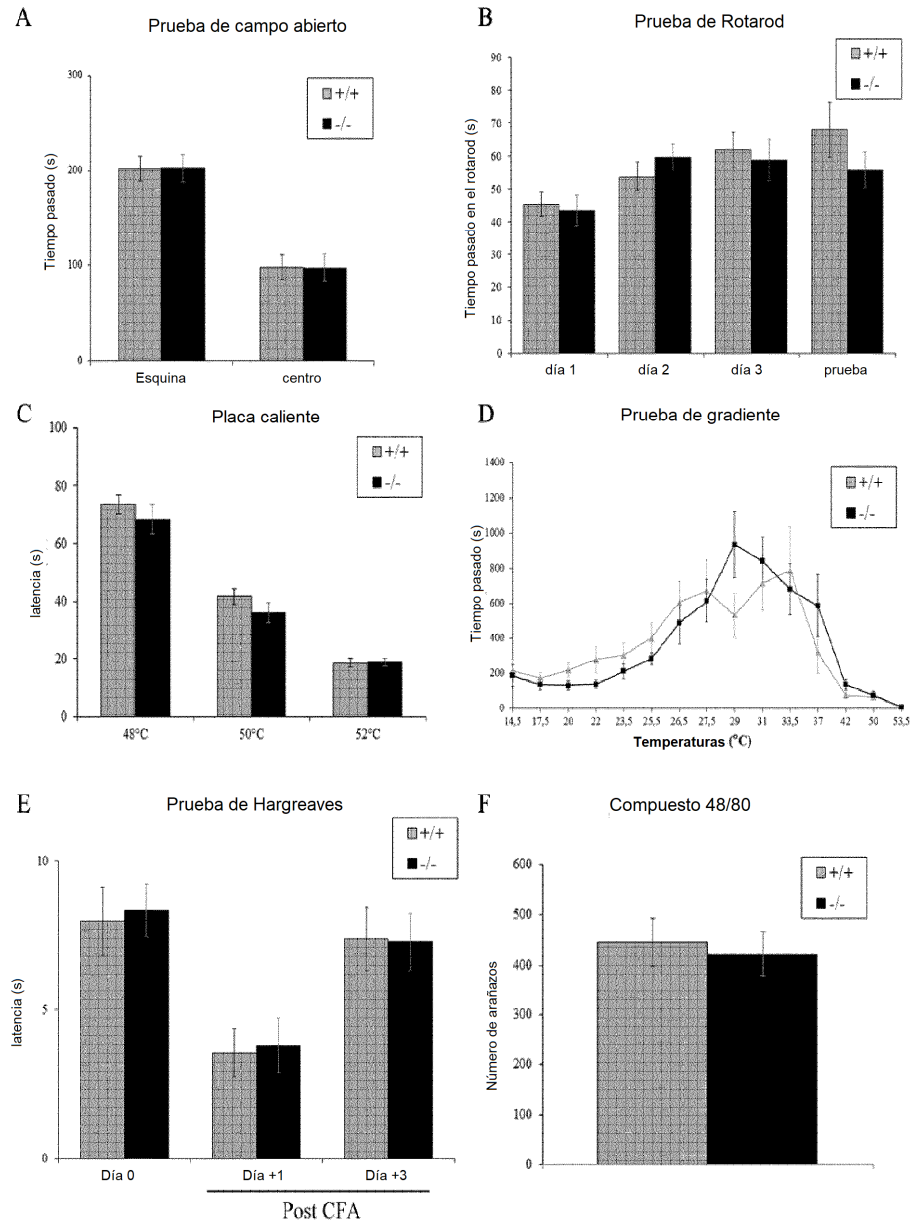


FIGURA 6

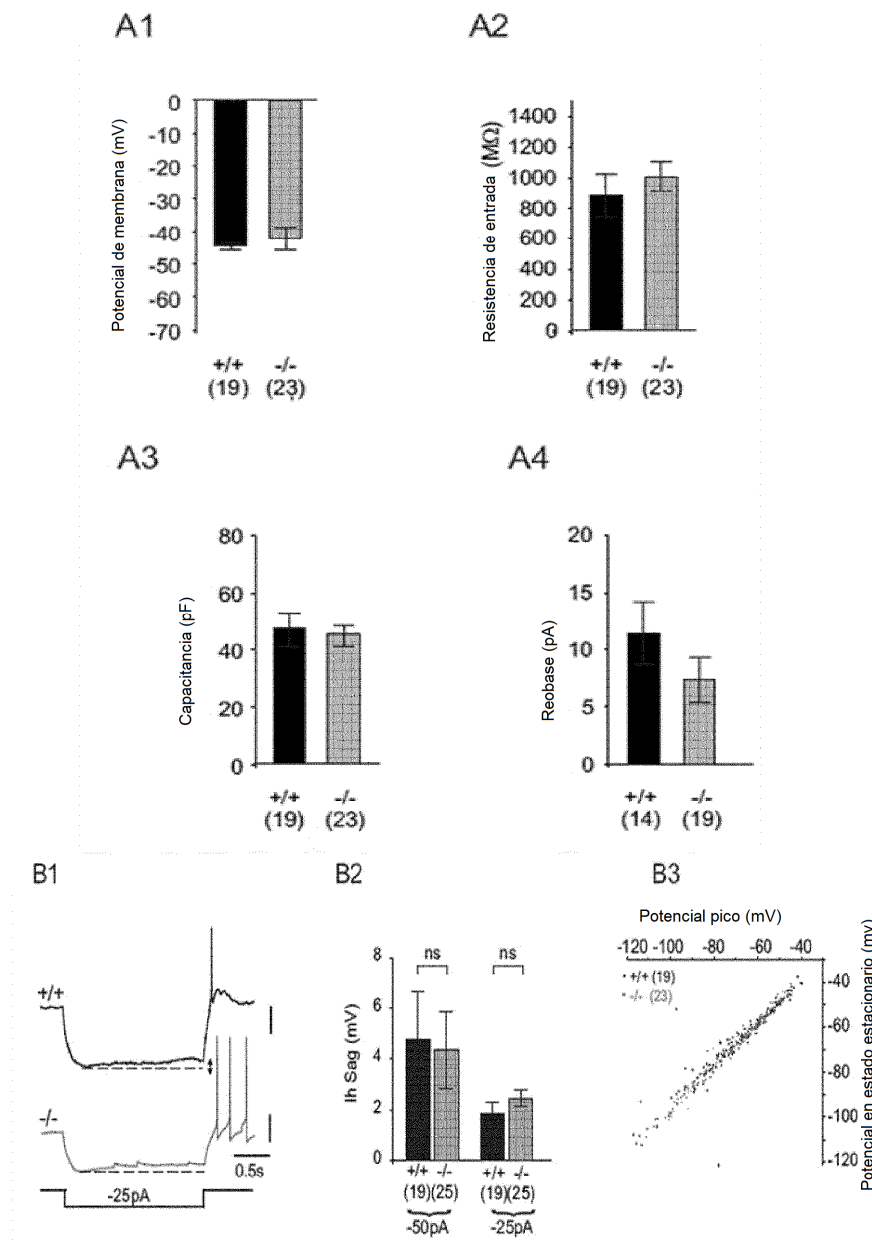


FIGURA 7

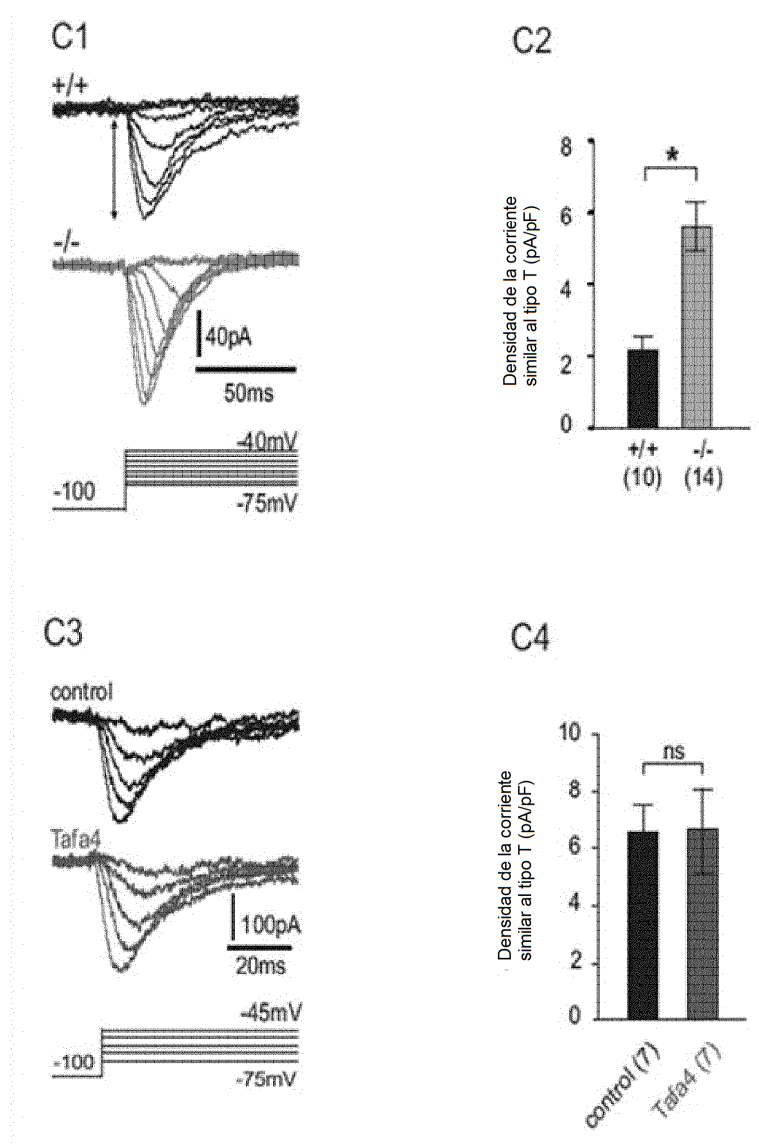


FIGURA 7 cont.

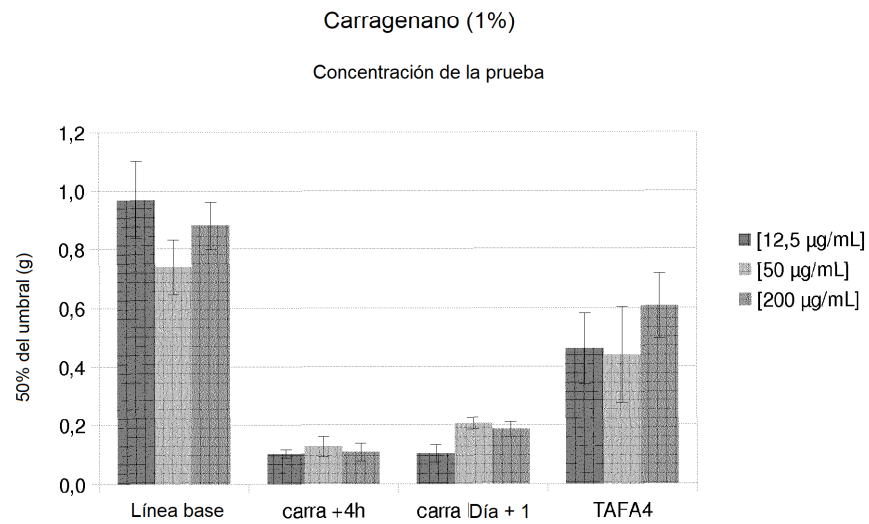


FIGURA 8

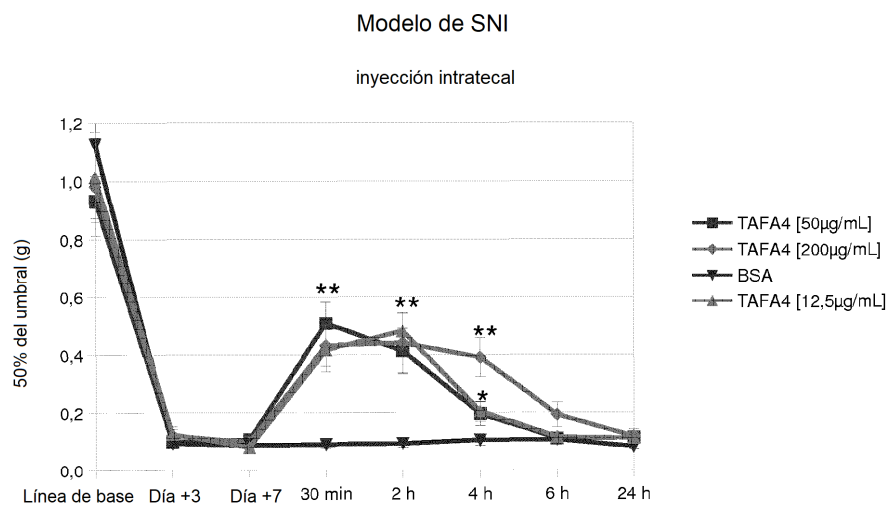


FIGURA 9

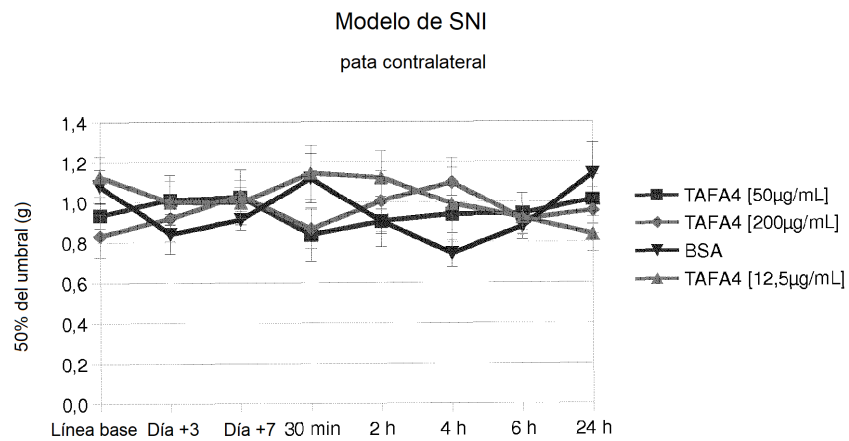


FIGURA 10

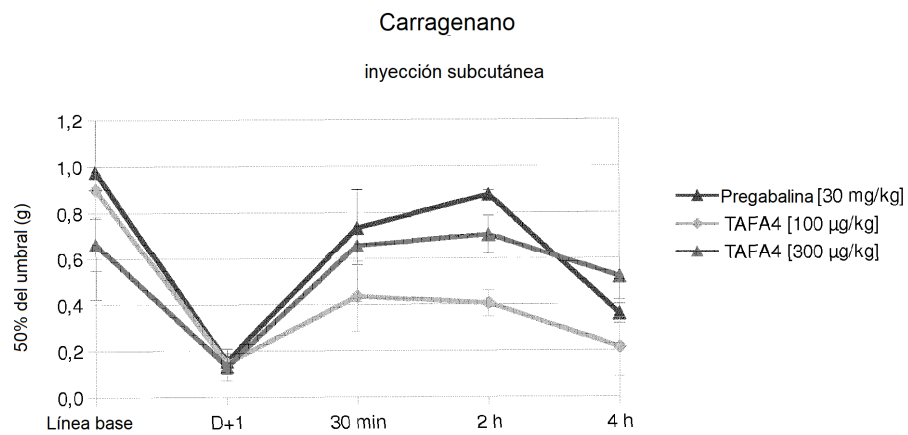


FIGURA 11

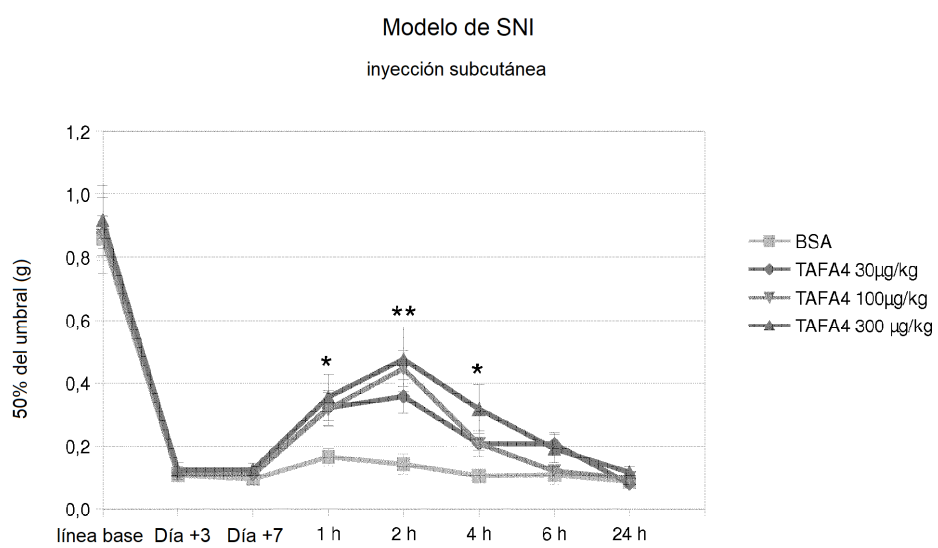


FIGURA 12

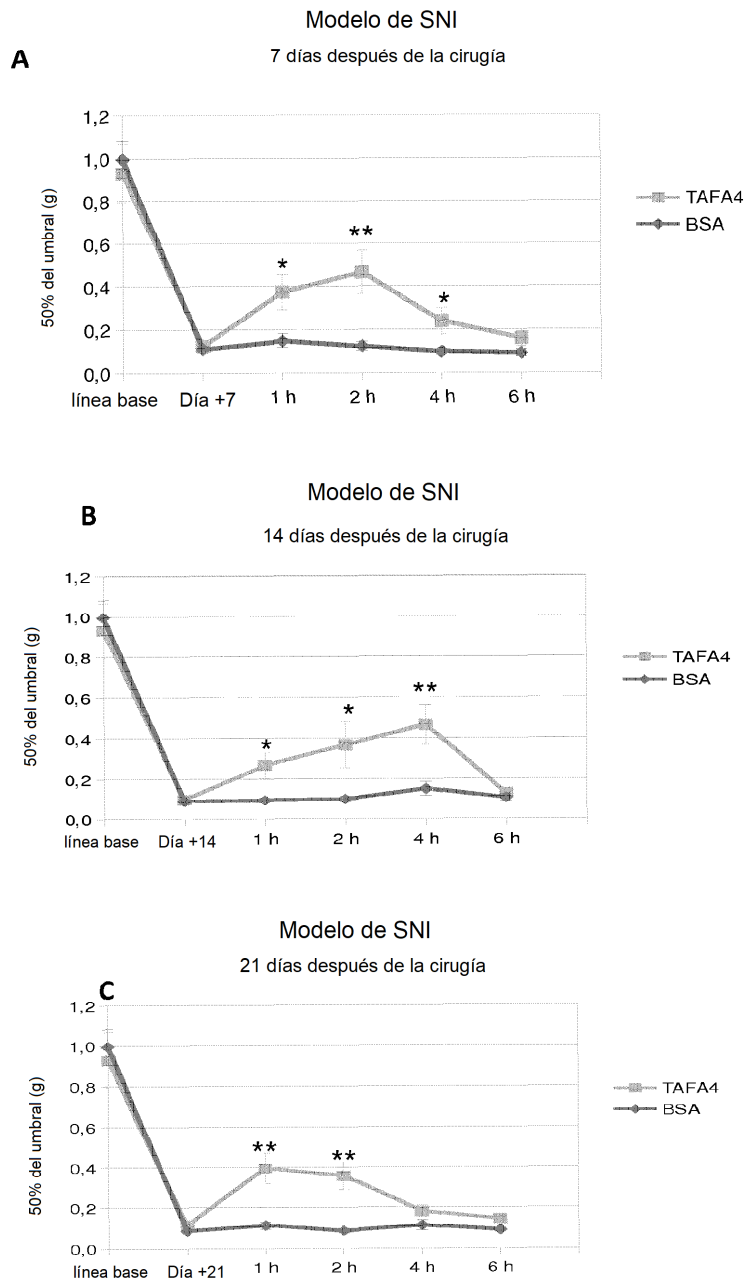


FIGURA 13

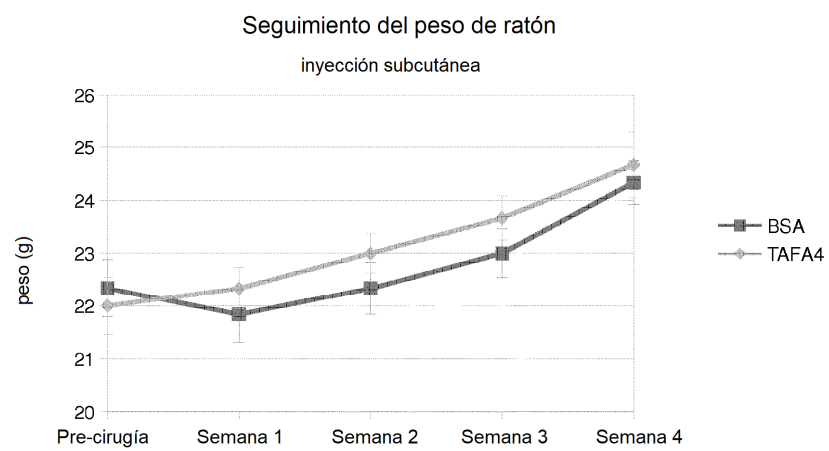


FIGURA 14