

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 939 637**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/20** (2006.01)

**A61K 38/51** (2006.01)

**A61K 35/76** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2016 PCT/KR2016/010480**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2017 WO17052160**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2016 E 16848886 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2023 EP 3354284**

54 Título: **Composición para el tratamiento del dolor**

30 Prioridad:

**21.09.2015 KR 20150133349**

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

**25.04.2023**

73 Titular/es:

**KOLON LIFE SCIENCE, INC. (100.0%)  
KOLON One & Only TOWER, 110, Magokdong-ro,  
Gangseo-gu  
Seoul 07793, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SUJEONG;  
CHOI, HEONSIK;  
CHOI, KYOUNGBAEK;  
LEE, HYEONYOUL;  
KIM, MINJU;  
KIM, DAEWOOK;  
KIM, MIN;  
PARK, JANGJOON y  
KIM, MINJUNG**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 939 637 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

Composición para el tratamiento del dolor

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición para uso en el alivio o tratamiento del dolor, comprendiendo la composición un gen que codifica la glutamato descarboxilasa y un gen que codifica la citoquina antiinflamatoria IL-10.

Técnica antecedente

10 El término "dolor" utilizado por la International Association for the Study of Pain se define como "daño tisular real o potencial o una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con el mismo". El dolor protege partes del cuerpo dañado durante la curación del daño de la ocurrencia del daño y motiva al ser humano a evitar experiencias similares en el futuro. La mayoría del dolor se alivia gradualmente si se elimina la causa del estímulo, pero a veces el dolor persiste aunque el sitio dañado haya sanado claramente ya que el estímulo ha desaparecido, o el dolor se desarrolla en un estado en el que no se ha producido irritación, daño o enfermedad.

15 El dolor neuropático es un tipo de dolor crónico no maligno que es inducido por una anomalía de un nervio, una médula espinal o un cerebro y se supone que el 1% o más de la población lo padece. Las causas más comunes del dolor neuropático son los traumatismos, los trastornos metabólicos, isquémicos, etc., que hacen que se transmitan impulsos nerviosos patológicos al cerebro a través de la médula espinal, lo que provoca la aparición del dolor. El dolor neuropático se puede clasificar en dolor neuropático periférico y dolor neuropático central dependiendo de la ubicación afectada.

20 Si dicho dolor neuropático persiste durante un largo período de tiempo, puede provocar dolor mental además de dolor físico y, por lo tanto, es probable que disminuya la calidad de vida de un paciente. Por lo tanto, se debe realizar un tratamiento activo para el alivio del dolor. Actualmente, dado que el dolor en sí mismo se reconoce como una enfermedad y se está extendiendo el interés por el dolor, se espera que la demanda de analgésicos aumente constantemente en el futuro. Principalmente, los analgésicos como el ácido acetilsalicílico, el ibuprofeno y el acetaminofén son ampliamente utilizados en los tratamientos actuales contra el dolor. Si se utiliza aspirina, cuyo ingrediente principal es el ácido acetilsalicílico, con fines analgésicos, se debe administrar una dosis alta de al menos 500 mg. Sin embargo, dado que la aspirina es un analgésico antiinflamatorio no esteroideo (NSAIDs) e interfiere con la producción de la mucosa gástrica al bloquear la enzima (COX-1) que promueve la producción de prostaglandina, que desempeña un papel en la protección de la mucosa gástrica, el estómago puede ser fácilmente dañado por el ácido gástrico y puede ocurrir fácilmente sangrado gastrointestinal. Además, dado que la aspirina previene la formación de trombos, puede causar sangrado. El ibuprofeno también es un ingrediente analgésico antiinflamatorio no esteroideo y, por lo tanto, también puede causar trastornos gástricos. En el caso de los analgésicos cuyo ingrediente principal es el acetaminofén tal como Tylenol, dado que el acetaminofén se metaboliza principalmente en el hígado, el hígado puede dañarse. Por lo tanto, existen problemas de seguridad para reducir su dosis máxima, etc. Además, el uso a largo plazo de los analgésicos mencionados anteriormente a menudo conduce a la resistencia y la pérdida de eficacia, incluso si son eficaces en la etapa inicial, y específicamente en caso de dolor neuropático, existe el problema de que el agente antiinflamatorio no esteroideo no es eficaz ni siquiera en la dosis máxima para cada paciente y, por tanto, se prescribe la administración de dosis altas a corto plazo. Por lo tanto, se requiere con urgencia el desarrollo de un nuevo analgésico para el dolor neuropático que muestre una excelente eficacia analgésica a dosis bajas sin efectos secundarios.

40 Actualmente, se están desarrollando varias sustancias nuevas como analgésicos para el dolor neuropático. Recientemente, se han desarrollado bloqueadores de los canales de sodio, pero en su mayoría se encuentran en forma de moléculas pequeñas y tienen baja selectividad para ciertas isoformas. Además, muestran efectos secundarios como cardiotoxicidad, deterioro motor, etc. y, por lo tanto, se necesita más investigación en el futuro. En cuanto a un agente terapéutico génico, Periphagen Holdings Inc. ha desarrollado un agente terapéutico en el que se introdujo un gen que codifica la encefalina, un péptido opioide, en el vehículo del gen del virus del herpes simple (HSV). Sin embargo, en un ensayo clínico, se encontró el problema de la disminución de su eficacia analgésica y, por lo tanto, su progresión se detuvo en el estudio de fase 2. El HSV tenía la ventaja de administrar genes a los nervios periféricos incluso cuando se administraba por vía subcutánea, pero, de hecho, la eficiencia de la administración de genes es inferior y parece tener dificultades para suprimir el dolor solo con encefalina, un péptido opioide.

50 Divulgación de la invención

Problema técnico

Un ejemplo de la presente invención se refiere a una composición para uso en el alivio o tratamiento del dolor, que comprende un gen que codifica la glutamato descarboxilasa (GAD) y un gen que codifica la citoquina antiinflamatoria IL-10.

55 Un ejemplo adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un primer vector viral adenoasociado que contiene un gen que codifica GAD y un segundo vector viral adenoasociado que

contiene un gen que codifica IL-10 en una relación de mezcla basada en el título del virus por unidad de volumen de 1:1 a 1:50.

#### Solución al problema

5 La presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el alivio o tratamiento del dolor, que comprende un gen que codifica la glutamato descarboxilasa (GAD) y un gen que codifica la citoquina antiinflamatoria IL-10, y una composición farmacéutica que comprende un primer vector viral adenoasociado que contiene un gen que codifica GAD y un segundo vector viral adenoasociado que contiene un gen que codifica IL-10 en una relación de mezcla basada en el título del virus por unidad de volumen de 1:1 a 1:50.

#### Efectos ventajosos de la invención

10 Una composición farmacéutica de la presente invención puede exhibir un efecto analgésico con solo una pequeña cantidad de suministro de genes, y la eficacia para aliviar el dolor se puede observar incluso con una cantidad menor de suministro de genes en comparación con la administración única. GABA, un producto del gen GAD, tiene la eficacia de bloquear la transducción de señales de dolor, pero una cantidad excesiva puede causar síntomas como picazón, mareos, somnolencia, etc., así como efectos secundarios como aumento de la frecuencia cardíaca o respiratoria. Se sabe que la IL-10 es una citoquina que muestra un efecto antiinflamatorio, pero se observaron efectos secundarios como la reducción del nivel de glóbulos rojos, etc., cuando se usaron dosis altas sistémicamente. Por otro lado, una composición farmacéutica de la presente invención muestra una excelente eficacia analgésica incluso con una dosis más pequeña empleando la coadministración de GAD e IL-10 en comparación con la administración única y, por lo tanto, muestra la eficacia sinérgica de reducir efectos secundarios convencionales y toxicidad por la administración de dosis bajas.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un mapa de vectores del plásmido pAAV-hGAD65 utilizado para la producción de virus adenoasociados recombinantes.

25 La Figura 2 muestra un mapa de vectores del plásmido pAAV-rIL-10 utilizado para la producción de virus adenoasociados recombinantes.

La Figura 3 muestra un mapa de vectores del plásmido pAAV-rIL-4 utilizado para la producción de virus adenoasociados recombinantes.

30 La Figura 4 es un diagrama que confirma el nivel de expresión de cada proteína por transferencia Western, donde se prepararon virus adenoasociados introducidos respectivamente con los genes GAD65, IL-10 e IL-4, y luego células 293T, una línea celular de riñón embrionario humano, se trataron con los virus y las células o los medios de cultivo se recogieron después de 48 horas.

35 La Figura 5 ilustra la expresión de GABA por un virus adenoasociado recombinante AAV-hGAD65, que es un diagrama que muestra los niveles de GABA en los medios medidos por ELISA, donde las células 293T, una línea celular de riñón embrionario humano, se trataron con AAV-GAD65, y los medios de cultivo se recogieron después de 48 horas. Se prepararon dos muestras idénticas por separado para cada grupo de experimentos, y la barra representa el valor de cada muestra.

40 La Figura 6 muestra los resultados de comparar las eficacias de la coadministración de AAV-GAD65 y AAV-IL-10 con la administración de Gabapentina, que es un gráfico que confirma la diferencia en las eficacias sinérgicas de la coadministración de AAV-GAD65 y AAV-IL-10 en comparación con la Gabapentina utilizada como analgésico neuropático en el mercado.

La Figura 7 ilustra las eficacias de AAV-GAD65 y AAV-IL-10 dependiendo de las relaciones de composición de combinación de los mismos. En particular, es un gráfico que muestra los efectos sinérgicos en el análisis del comportamiento animal con las relaciones de composición de combinación de AAV-IL-10 a AAV-GAD de 1:1, 1:5, 1:30

45 La Figura 8 es un gráfico que muestra los efectos sinérgicos cuando se coadministraron AAV-GAD65 y AAV-IL-10 en 1: 10 y 1: 30 por inyección epidural transforaminal.

La Figura 9 muestra los resultados de comparar las eficacias de AAV-GAD65 y AAV-IL-10 con AAV-GAD65 y AAV-IL-4, lo que ilustra los efectos sinérgicos en el análisis del comportamiento animal cuando se administraron IL-10 e IL-4 respectivamente combinado con GAD65 para su uso.

#### Mejor modo de llevar a cabo la invención

50 A continuación, la presente invención se describirá en detalle.

En un ejemplo de la presente invención, un gen que codifica GAD y un gen que codifica la citoquina antiinflamatoria IL-10 se proporcionan en forma de ser contenidos en un vehículo, y el vehículo incluye vectores virales y no virales tales como un plásmido, liposoma o similares.

5 El gen que codifica GAD puede estar contenido operativamente en un primer vector, y el gen que codifica la citoquina antiinflamatoria IL-10 puede estar contenido operativamente en un segundo vector.

El vector viral puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes simple, lentivirus, retrovirus y poxvirus.

10 Un vehículo que contiene un gen que codifica GAD de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, un primer vector) y un vehículo que contiene un gen que codifica la citoquina antiinflamatoria IL-10 (por ejemplo, un segundo vector) pueden tener una relación de mezcla basada en el título del virus por unidad de volumen de 1:1 a 1:50, y lo más preferiblemente 1:5 a 1:30

15 Una composición farmacéutica de la presente invención puede exhibir un efecto analgésico con solo una pequeña cantidad de genes o vehículos que la contengan. La composición de la presente invención consiste en un vector que contiene un gen que codifica GAD y un vector que contiene un gen de acción antiinflamatoria en tejidos neurales, y la eficacia para aliviar o tratar el dolor se puede lograr con una cantidad menor en comparación con la administración única por coadministrar sustancias que tienen diferentes mecanismos analgésicos. En consecuencia, dado que una composición de la presente invención utiliza una pequeña cantidad de genes o vehículos que los contienen, se muestra una sinergia de eficacias analgésicas superiores al mismo tiempo que se reduce la toxicidad.

20 De acuerdo con un ejemplo de la presente invención, el primer vector y el segundo vector pueden ser virus adenoasociados. El virus adenoasociado no se limita a un serotipo específico y, preferiblemente, puede ser uno cualquiera de AAV1 a AAV5.

25 GAD de acuerdo con la presente invención es una enzima que descarboxila glutamato para producir GABA (ácido gamma-aminobutírico). El gen que codifica GAD aplicable a la presente invención puede ser uno de GAD65 y GAD67, que son dos isoformas. El GAD65 puede ser una proteína humana o de rata o un gen que codifica el mismo, y un ejemplo específico del mismo puede consistir en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 de acceso NCBI no. NM\_000818, y también puede consistir en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. El GAD67 puede ser una proteína humana o de rata o un gen que codifica el mismo, y un ejemplo específico del mismo puede consistir en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 de acceso NCBI no. NM\_000817, y también puede consistir en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.

30 En una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, la citoquina inflamatoria es la interleucina-10 (IL-10), y la coadministración de IL-10 y GAD65 muestra una eficacia sinérgica para el alivio del dolor.

35 La IL-10 es una de las citoquinas antiinflamatorias y también se conoce como factor inhibidor de la síntesis de citoquinas (CSIF). La IL-10 pertenece a la clase II de citoquinas y es un homodímero que consiste en dos subunidades de 178 aminoácidos de longitud. La IL-10 cumple la función de inhibir la actividad de las células NK (asesinas naturales) en una respuesta inmunitaria y participa en la transducción de señales al formar un complejo con el receptor de la IL-10. IL-10 puede ser una proteína humana o de rata o un gen que codifica la misma, y un ejemplo específico de la misma puede consistir en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 de acceso NCBI no. NM\_012854 o SEQ ID NO: 9 de acceso NCBI no. NM\_000572, y también puede consistir en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10

40 Las secuencias de nucleótidos del gen que codifica GAD y/o el gen que codifica IL-10 incluyen mutantes de los mismos, que pueden ser secuencias de nucleótidos modificadas por optimización de codones para ratas o humanos. Específicamente, se incluyen las secuencias de nucleótidos que tienen una homología de secuencia de al menos 60 %, preferiblemente 70 % o más, más preferiblemente 80 % o más, incluso más preferiblemente 90 % o más, lo más preferiblemente 95 % o más, donde el "% de homología de secuencia" se identifica comparando dos secuencias y regiones de comparación dispuestas de manera óptima, y una parte de las secuencias en la región de comparación puede incluir adición o eliminación (es decir, brecha) en comparación con una secuencia de referencia (sin incluir adición o eliminación) con respecto a las disposiciones óptimas de las dos secuencias.

45 Se describe un método para aliviar y/o tratar el dolor que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica a un paciente que necesita aliviar y/o tratar el dolor. El método anterior puede comprender además, antes del paso de administración, determinar al paciente como un paciente que necesita aliviar y/o tratar el dolor. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" puede depender de la cantidad de un gradiente activo para lograr una eficacia deseada, alivio del dolor y/o eficacia terapéutica.

55 El dolor de acuerdo con la presente invención puede incluir dolor nociceptivo, dolor psicogénico, dolor inflamatorio asociado con daño tisular e infiltración de células inmunes, dolor patológico que es un estado de enfermedad inducido por daño al sistema nervioso o su función anormal (dolor disfuncional tal como fibromialgia, síndrome del intestino irritable, dolor de cabeza por tensión), etc. Además, el dolor puede incluir dolor de espalda distinguido anatómicamente, como: dolor de cuello, dolor de espalda media, dolor de espalda baja o dolor de coxis. Además, el

dolor puede incluir dolor tal como dolor neuropático, migraña, etc. El dolor neuropático puede resultar de daños o enfermedades que afectan el sistema somatosensorial. El dolor neuropático puede estar asociado con una sensación anormal llamada disestesia y con alodinia en la que se evoca la sensación de dolor incluso con estimulación indolora. Además, el dolor neuropático también puede ser un factor continuo y/o intermitente (convulsiones). Este último está vinculado a la descarga eléctrica en sentido figurado. Las características generales incluyen estar caliente o frío, alfileres y agujas, entumecimiento y picazón.

Por el contrario, el dolor nociceptivo a menudo se expresa como "dolor". Además, la migraña es un trastorno crónico que se asocia con una serie de síntomas del sistema nervioso autónomo y provoca dolores de cabeza de intensidad normal a severa. Los mecanismos precisos de estas migrañas aún no se han aclarado. La teoría básica está relacionada con el aumento de la excitabilidad de la corteza cerebral y la regulación anormal de las células nerviosas del dolor en el núcleo del trigémino del tronco encefálico.

Como ejemplo específico, el dolor puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en dolor neuropático, dolor por cáncer, dolor posoperatorio, neuralgia del trigémino, dolor idiopático, dolor neuropático diabético, migraña, etc. Como otro ejemplo específico, el dolor puede no ser un espasmo muscular asociado con lumbago.

Preferiblemente, una composición de la presente invención se puede usar para aliviar o tratar el dolor neuropático o el dolor crónico por cáncer. El término "aliviar o tratar" se refiere a cualquier acción que alivia o mejora los síntomas del dolor mediante la administración de una composición de la presente invención.

Se divulga un método para aliviar o tratar el dolor que comprende administrar un gen que codifica GAD y un gen que codifica una citoquina antiinflamatoria a un sujeto que lo necesita. El sujeto puede ser un mamífero, incluido un ser humano, o una célula y/o tejido aislado de un mamífero, incluido un ser humano. Además, el sujeto puede ser un animal no humano, y el término "animal no humano" incluye vertebrados tales como mamíferos y no mamíferos, por ejemplo, primates excepto humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

La cantidad terapéuticamente eficaz y la vía de administración de una composición farmacéutica de la presente invención pueden ser ajustadas apropiadamente en consideración de una condición del paciente, una eficacia deseada y similares por parte de los expertos en la técnica. Por ejemplo, una composición de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar en forma de inyección y puede incluir, por ejemplo, inyección nerviosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular o inyección de pistola génica.

Modo para la invención

A continuación, la presente invención se explica en detalle mediante Ejemplos, pero los siguientes ejemplos pretenden ilustrar más la presente invención sin limitar su alcance.

<Ejemplo 1> Preparación y análisis de propiedades de virus recombinantes adenoasociados

Los virus adenoasociados requeridos para la presente invención se prepararon y produjeron basándose en el sistema sin auxiliar AAV (Agilent, EE. UU.).

A. Preparación de pAAV-hGAD65

Para preparar pAAV-hGAD65 de la Figura 1, la región promotora de CMV de pJDKrGAD65 [Lee B et al, Gene Ther, 12: 1215-1222 (2005)] se amplificó por PCR y luego se introdujo en pGEM-T (Promega, EE. UU.), para preparar pGEM-T-CMV. Las secuencias de cebadores utilizadas para la amplificación del promotor de CMV son las siguientes.

F-JDK (SEQ ID NO: 16): 5'-TTCGGCCGTCGAGGAGCTTGGCCCATG-3'

R-JDK (SEQ ID NO: 17):

5'-GACGTCGACCTAGCTAGCGAATTCGGGGCCGCGGAG-3'

El gen GAD65 se preparó mediante optimización de codones para adaptarlo a seres humanos basándose en la secuencia de GAD65 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (NCBI NM\_000818) y sintetizar la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 (Bioneer, Corea). El gen hGAD65 introducido en pGEM-T se trató con NheI y Sall para obtener un fragmento de ADN de 1,7 Kb, que se ligó a un fragmento de ADN de 3,7 Kb obtenido al tratar pGEM-T-CMV con NheI y Sall, para completar pGEM-T-CMV-hGAD65.

SV40pA se amplificó mediante PCR utilizando pCI (Invitrogen, EE. UU.) como plantilla, seguido de tratamiento con ClaI y Sall, para obtener un fragmento de ADN de 222 pb. El fragmento anterior se ligó a un fragmento de ADN de 5,4 Kb preparado cortando pGEM-T-CMV-hGAD65 con ClaI y Sall, para finalmente preparar pGEM-T-CMV-hGAD65-SV40pA. Las secuencias de cebadores utilizadas para la amplificación de SV40pA son las siguientes.

F-SV40pA (SEQ ID NO: 18):

5'-CCATCGATCAGACATGATAAGATACATTGATGAG-3'

R-SV40pA (SEQ ID NO: 19):

5'-GACGTCGACGCGGCCGCTACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTG -3'

5 El gen de resistencia a la ampicilina en pAAV-MCS (Agilent, EE. UU.) se reemplazó con el gen de resistencia a la kanamicina para la preparación de vectores de virus adenoasociados. El gen de resistencia a la kanamicina se amplificó mediante PCR utilizando pET-28(a) (Novagen, EE. UU.) como plantilla, y el gen de resistencia a la kanamicina de 816 pb amplificado se ligó a pGEM-T para preparar pGEM-T-Kan<sup>r</sup>. Las secuencias de cebadores utilizadas para la amplificación del gen de resistencia a la kanamicina son las siguientes.

F-Can (SEQ ID NO: 20): 5'-AGGCGCCATGAGCCATATTCAACGGGAA-3'

R-Can (SEQ ID NO: 21): 5'-TTCATGATTAGAAAACTCATCGAGCATC-3'

10 Para la introducción del gen de resistencia a la kanamicina, los sitios SpeI y EcoRV se generaron respectivamente en la parte delantera y trasera del gen de resistencia a la ampicilina en pAAV-MCS mediante mutagénesis y se trataron con SpeI y EcoRV, que luego se ligó al fragmento de ADN obtenido cortando el pGEM-T-Kan<sup>r</sup> preparado anteriormente con NheI y EcoRV, para preparar pAAV-MCS-Kan<sup>r</sup>.

15 El pAAV-MCS-Kan<sup>r</sup> preparado se trató con NotI y BamHI, que luego se ligó a un fragmento de ADN de 2,7 Kb obtenido cortando pGEM-T-CMV-hGAD65-SV40pA con EagI y PvuI, para preparar pssAAV-GAD65.

20 Para introducir el casete de expresión GAD65 en pVAX1 (Invitrogen, EE. UU.), se generó el sitio BamHI en la parte posterior de bGHPa mediante mutagénesis, que luego se cortó con MluI y NheI para preparar fragmentos de ADN. Las regiones promotoras de LTR y CMV se amplificaron mediante PCR utilizando pssAAV-GAD65 como plantilla y se clonaron en pGEM-T easy (Promega, EE. UU.), que luego se cortaron con AscI y NheI y se ligaron al vector pVAX1 preparado anteriormente para preparar pVAX1-LTR-CMV. Las secuencias de cebadores utilizadas para la amplificación de las regiones promotoras de LTR y CMV son las siguientes.

F-ITR (SEQ ID NO: 22): 5'-ATGGCGCGCCCCCTGGCCTTTGCTGGCC-3'

R-JDK (SEQ ID NO: 17):

5'-GACGTCGACCTAGCTAGCGAATTCGGGGCCGCGGAG-3'

25 El pVAX1-LTR-CMV se preparó como un fragmento de ADN cortando con NotI y NheI, y se ligó al fragmento de ADN preparado cortando el pssAAV-GAD65 con EagI y NheI, para preparar pVAX1-LTR-CMV-hGAD65-SV40pA.

30 El pVAX1-LTR-CMV-hGAD65-SV40pA se cortó con HpaI y BamHI, y luego se ligó a los fragmentos de ADN obtenidos al tratar el pGEM-T easy-SV40pA-RITR, que había sido amplificado por PCR utilizando pssAAV-GAD65 como plantilla y se clonó en pGEM-T easy, con HpaI y BamHI, para completar pVAX1-LTR-CMV-hGAD65-SV40pA-RITR (en adelante, abreviado como "pAAV-GAD65"). Las secuencias de cebadores utilizadas para la amplificación de las regiones SV40pA y RITR son las siguientes.

F-SV40pA (SEQ ID NO: 18):

5'-CCATCGATCAGACATGATAAGATACATTGATGAG-3'

R-ITR (SEQ ID NO: 23): 5'-ATGGATCCGCTAGTAAATACCGCATCAG-3'

35 El mapa vectorial de pAAV-hGAD65 se muestra en la Figura 1.

#### B. Preparación de pAAV-rIL-10

40 pAAV-rIL-10 se preparó mediante un método similar a pAAV-hGAD65. El gen de IL-10 de rata se preparó mediante optimización de codones para adaptarse a ratas con base en la secuencia de nucleótidos derivada de rata (NCBI NM\_012854) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y sintetizar un gen que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 8 (Bioneer, Corea). Los genes de rIL-10 se amplificaron mediante PCR usando los genes de IL-10 de rata introducidos en pGEM-T easy como plantilla y luego se trataron con NheI y Sall para obtener un fragmento de ADN de 0,5 Kb, que luego se ligó a un fragmento de ADN de 3,7 Kb obtenido cortando el pGEM-T-CMV con NheI y Sall, para preparar pGEM-T-CMV-rIL-10. Las secuencias de cebadores utilizadas para la amplificación de rIL10 son las siguientes.

45 F-rIL-10 (SEQ ID NO: 24): 5'-CCGCTAGCGCCACCATGCCT-3'

R-rIL-10 (SEQ ID NO: 25):

5'-GACGTCGACGCCATCGATGGCTTAATTAATCAATTCTTC-3'

SV40pA se amplificó mediante PCR utilizando pCI como plantilla, seguido de tratamiento con NotI y Sall para obtener un fragmento de ADN de 222 pb. El fragmento anterior se ligó a un fragmento de ADN de 4,2 Kb preparado cortando pGEM-T-CMV-rIL-10 preparado anteriormente con ClaI y Sall, para preparar pGEM-T-CMV-rIL-10-SV40pA. Las secuencias de cebadores utilizadas para la amplificación de SV40pA son las siguientes.

5 F-SV40pA (SEQ ID NO: 18):

5'-CCATCGATCAGACATGATAAGATACATTGATGAG-3'

R-SV40pA (SEQ ID NO: 19):

5'-GACGTCGACGCGGCCGCTACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTG -3'

10 Se obtuvo un fragmento de ADN de 1,6 Kb mediante el tratamiento de pGEM-T-CMV-rIL-10-SV40pA con EagI, y luego se ligó al fragmento de ADN preparado mediante el tratamiento de pAAV-MCS-Kan<sup>r</sup> con NotI y BamHI, para preparar pssAAV-CMV-rIL-10-SV40pA (en lo sucesivo, abreviado como "pAAV-rIL-10"). El mapa vectorial de pAAV-rIL-10 se muestra en la Figura 2.

#### C. Preparación de pAAV-rIL-4

15 El gen de IL-4 de rata se preparó mediante optimización de codones para adaptarse a ratas con base en la secuencia de nucleótidos derivada de rata (NCBI NM\_201270) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 y sintetizando un gen que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 13 (Bioneer, Corea). Los genes de rIL-4 introducidos en pGEM-B1 (Bioneer, Corea) se trataron con NheI y NotI para obtener un fragmento de ADN de 0,5 Kb. El fragmento anterior se ligó a un fragmento de ADN de 3 Kb preparado tratando pAAV-hGAD65 con NheI y NotI, para preparar pssAAV-CMV-rIL-4-SV40pA (en adelante, abreviado como "pAAV-rIL-4"). El mapa vectorial de pAAV-rIL-4 se muestra en la Figura 3.

#### D. Análisis de propiedades de virus adenoasociados recombinantes

25 Los tres tipos de plásmidos (pAAV-hGAD65, pAAV-rIL-10 y pAAV-rIL-4) preparados anteriormente se transfectaron respectivamente en células 293T, una línea celular de riñón embrionario humano, con pHelper y pRC usando PEI (Polysciences, EE. UU.). Aquí, pRC5 en el que se introdujo el gen de la cápside del serotipo 5 de AAV se usó para hGAD65, mientras que pRC1 en el que se introdujo el gen de la cápside del serotipo 1 de AAV se usó para rIL-10 y rIL-4. Las células transfectadas se cultivaron en una incubadora a 37°C, se recolectaron después de 48 horas y se sometieron a 3 ciclos de congelación y descongelación para obtener cada virus crudo.

30 Para confirmar la expresión proteica de los virus adenoasociados recombinantes administrados a las células, las células 293T, una línea celular de riñón embrionario humano, se trataron respectivamente con virus crudos AAV5-hGAD65, AAV1-rIL-10 y AAV1-rIL-4, la expresión de la proteína se confirmó por transferencia Western. En concreto,  $8 \times 10^5$  células 293T se dividieron en alícuotas en matraces T25 y cada matraz se trató con 700 µl de virus sin procesar al día siguiente, seguido de cultivo en una incubadora a 37 °C. Después de 48 horas, las células y los medios de cultivo se recolectaron por separado y las células se disolvieron con un agente solubilizante y los medios de cultivo se concentraron con amicon (Merck Millipore, Alemania). Las muestras preparadas se trataron con los anticuerpos contra GAD65 (Cell signaling, EE. UU.), IL-10 (Santa Cruz, EE. UU.) e IL-4 (Santa Cruz, EE. UU.), respectivamente, y se sometieron a transferencia Western. Los resultados se muestran en la Figura 4.

40 La Figura 4 es un diagrama que muestra la expresión de cada proteína mediante la realización de un análisis de transferencia Western de los lisados celulares de la línea celular 293T, una línea celular de riñón embrionario humano, tratada con AAV5-hGAD65, AAV1-rIL-10 o AAV1-rIL-4. Al confirmar que se expresaba una proteína diana en todos los casos, se confirmó que no había ningún problema en la estructura y propiedad de los virus adenoasociados recombinantes usados en el experimento.

45 Para confirmar que GABA es producido por AAV5-hGAD65, los medios de cultivo de las células tratadas con AAV5-GAD65 se recolectaron en las mismas condiciones que para la preparación de muestras para transferencia Western y se sometieron a análisis GABA ELISA (LDN, Países Bajos). Los resultados se muestran en la Figura 5. Se prepararon dos muestras idénticas por separado para cada grupo de experimentos, y la barra representa el valor de cada muestra. Como resultado, se confirmó que GABA fue secretado en el medio de cultivo por GAD65 introducido en las células por virus AAV5-hGAD65.

#### E. Preparación de virus adenoasociados recombinantes

50 Los virus adenoasociados recombinantes fueron preparados y purificados por KRcrogen (Corea) para experimentos de eficacia en animales, y el método de preparación es el siguiente.

Tres tipos de plásmidos (pAAV-hGAD65, pAAV-rIL-10 y pAAV-rIL-4) preparados anteriormente se transfectaron respectivamente en células 293T, una línea celular de riñón embrionario humano, usando el método de fosfato de calcio con pHelper y pRC. Aquí, pRC5 en el que se introdujo el gen de la cápside del serotipo 5 de AAV se usó para

hGAD65, mientras que pRC1 en el que se introdujo el gen de la cápside del serotipo 1 de AAV se usó para rIL-10 y rIL-4. Las células transfectadas se cultivaron en una incubadora a 37 °C y se recogieron después de 48 horas.

5 Luego, solo las bandas que contenían virus fueron aisladas y purificadas mediante centrifugación de alta velocidad dependiendo del gradiente de concentración de cesio, para obtener AAV5-hGAD65, AAV1-rIL-10 y AAV1-rIL-4. Los títulos de los virus producidos se midieron utilizando el método qPCR establecido por el fabricante.

<Ejemplo 2> Prueba de eficacia analgésica de AAV-IL-10 y AAV-GAD65

#### A. Preparación de muestras de administración

10 30 minutos antes de la administración al animal, el virus adenoasociado recombinante almacenado a -80 °C se descongeló a temperatura ambiente en 1 minuto y se mezcló bien mediante vórtex. Y la solución de colorante azul de Coomassie se preparó mezclando 10 mg de azul de Coomassie en 1 ml de pocillo de PBS y luego filtrando con filtros de jeringa. 1 µL de AAV-GAD65 de  $5,4 \times 10^5$  VG/µL, 1 µL de AAV-IL-10 de  $1,8 \times 10^7$  VG/µL y 1 µL de colorante azul de Coomassie al 0,1% se mezclaron bajo el cálculo de que cada animal obtiene 3 µL en total. Las muestras se prepararon el doble de la cantidad requerida y se administraron 3 µL de la muestra a cada animal.

15 Como grupo de control, se mezcló Gabapentina en el agua de bebida de los animales 1 hora antes de la administración, que se preparó en una concentración de 10 mg/mL.

#### B. Preparación del modelo animal de dolor neuropático y administración de muestras

20 Se anestesiaron ratas macho SD de 180 a 200 g con anestesia por inhalación, y luego se incidieron las partes superiores de las pantorrillas, y se ataron ambos extremos del nervio peroneo común y el nervio tibial y se hicieron nudos con sutura 7-0 a intervalos de 0,5-1 cm. Las regiones de los dos haces de nervios entre los nudos se cortaron con tijeras y se suturó el sitio de la incisión. Dos semanas después, se realizó la prueba de filamento *Von Frey* para confirmar la inducción del dolor y luego se administró la sustancia de prueba (CJ Woolf, Pain 87, 2000).

25 La sustancia de prueba se administró al ganglio de la raíz dorsal (DRG). Después de la anestesia por inhalación del modelo animal de dolor, se hizo una incisión lineal en la espalda de la rata en la columna lumbar de L3 a L5 para exponer los huesos vertebrales, y luego se expuso un proceso transversal, una de las proyecciones espinales, en el lado de la exposición, y el proceso L4 que cubre el DRG en el estado fijo se separó cuidadosamente bajo la vista microscópica de zoom estéreo con una gubia de modo que el DRG no se dañe. El área alrededor del DRG se manipuló para que el DRG que se extiende en una línea oblicua quedara expuesto como granos de arroz.

30 Se conectó una jeringa Hamilton a un catéter de polietileno y se recogieron con precisión 3 µl de la sustancia de prueba. Luego, la jeringa fue reemplazada por una jeringa de 1 mL para la administración. Las ratas se colocaron en un instrumento estereotáxico para animales pequeños y se inyectó la muestra mientras se confirmaba que la microaguja pinchaba el DRG de L4 con precisión bajo un cirujanoscopio. En este documento, se confirmó que la muestra que contenía colorante no se filtró fuera del DRG y se suministró correctamente al interior del DRG. Después de confirmar que la muestra completa se envió al DRG, la jeringa se separó del DRG, se suturó y se recuperaron los animales.

35 La Gabapentina se administró por vía oral con 3 mg/kg.

#### C. Observación de la eficacia analgésica usando la prueba de filamento de *Von Frey*

40 Se empleó el método de umbral de subida y bajada del 50% establecido por Dixon en 1992, ya que es un método comúnmente conocido. El método calcula valores de umbral dependiendo de patrones predeterminados de respuestas de dolor con un total de 8 filamentos cuyos valores de N fueron 0,4, 0,6, 1, 2, 4, 6, 8 y 15 g, respectivamente. Las regiones de aparición del dolor se buscaron a través del cambio de posiciones desde la región de la punta más lateral hasta el talón de la planta donde se produjo el dolor.

45 Las ratas levantan abruptamente la planta y las encogen o lamen cuando se produce dolor. En consecuencia, cuando se encontró una región donde se producía dolor, se pinchó el área circundante 5 veces con el filamento del siguiente paso y si hubo respuestas 3 veces o más, se consideró como una respuesta de dolor y se observaron las ratas con el filamento del siguiente paso. Los patrones se registraron en cada paso. Los patrones de dolor se registraron con base en la tabla de patrones establecida por RS Chaplan (Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. Journal of Neuroscience Methods, 1994) y los valores umbral se calcularon usándolo. El análisis del comportamiento de los grupos de animales se realiza mediante un método ciego durante 4 a 6 semanas, observados por al menos 3 personas, y los resultados de los patrones registrados se procesan estadísticamente para analizar la tendencia del dolor.

50 Los resultados de la observación del dolor empleando la prueba de filamento de *Von Frey* donde se administró el modelo animal de dolor con muestras se muestra en la Figura 6. La Figura 6 muestra los resultados de comparar las eficacias entre la coadministración de AAV-GAD65 y AAV-IL-10 y la administración de Gabapentina. Cuando se coadministraron GAD65 e IL-10, se observó un efecto de alivio del dolor estadísticamente significativo en comparación con el grupo de control no tratado (control negativo), y se encontró que el efecto era mayor que el de la Gabapentina.

<Ejemplo 3> Pruebas de eficacia analgésica de AAV-IL-10 y AAV-GAD65

A. Preparación de muestras de administración

5 Para la preparación de las muestras de administración, se descongelaron rAAV5-GAD65 y rAAV1-rIL-10 que se prepararon en el Ejemplo 1 y se almacenaron congelados, y las muestras se prepararon sustancialmente de acuerdo con el mismo método que el método de preparación de muestras de administración en Ejemplo 2. Específicamente, la sustancia de administración única AAV-GAD65 o AAV-rIL-10 y las sustancias de coadministración AAV-GAD65 y AAV-rIL-10 se diluyeron en PBS en una proporción de mezcla basada en el título del virus de 1:1, 1:5, o 1:30 como se muestra en la Tabla 1, y se añadió 1 µL de colorante azul de Coomassie al 0,1 % a cada muestra bajo el cálculo de que cada animal obtiene 3 µL. Las muestras se prepararon el doble de la cantidad requerida para la población total y se administraron 3 µL de la muestra a cada animal.

[Tabla 1]

Muestras	Tipos de virus y contenidos	
	AAV-GAD65	AAV-IL-10
Ejemplo Comparativo 1 (GAD solo)	5,4x10 <sup>5</sup> VG/ 2 µL	0
Ejemplo Comparativo 2 (IL-10 sola)	0	1,8x10 <sup>7</sup> VG/ 2 µL
Ejemplo Experimental 1 (1:1)	5,4x10 <sup>5</sup> VG/ 1 µL	5,4x10 <sup>5</sup> VG/ 1 µL
Ejemplo Experimental 2 (1:5)	5,4x10 <sup>5</sup> VG/ 1 µL	2,7x10 <sup>6</sup> VG/ 1 µL
Ejemplo Experimental 3 (1:30)	5,4x10 <sup>5</sup> VG/ 1 µL	1,8x10 <sup>7</sup> VG/ 1 µL

B. Observación de la eficacia analgésica utilizando la prueba de filamento de *von Frey*

15 Se administraron muestras a los modelos animales de dolor preparados mediante el mismo método que en el Ejemplo 2, y se observó el dolor usando una prueba de filamento de *Von Frey*, y los resultados se muestran en la Figura 7.

20 La Figura 7 ilustra las eficacias de AAV-GAD65 y AAV-IL-10 dependiendo de las relaciones de composición de los mismos. Particularmente, en comparación con cantidades trazas de AAV-GAD65 y AAV-rIL-10 que no mostraron experimentos de eficacia analgésica con las relaciones de composición de mezcla de AAV-rIL-10 a AAV-GAD de 1:1 (Ejemplo experimental 1), 1:5 (Ejemplo Experimental 2) y 1:30 (Ejemplo Experimental 3) mostraron eficacias sinérgicas en el análisis del comportamiento animal. Como resultado, la composición de coadministración de AAV-GAD65 y AAV-rIL-10 de acuerdo con la presente invención mostró un patrón creciente de la eficacia del tratamiento del dolor a medida que aumentaba la relación de composición de mezcla de AAV-rIL-10 a AAV-GAD.

<Ejemplo 4> Pruebas de eficacia analgésica de AAV-IL-10 y AAV-GAD65 usando inyección epidural transforaminal

A. Preparación de muestras de administración

25 30 minutos antes del experimento de administración animal, los reactivos mantenidos a -80°C se descongelaron a temperatura ambiente en 1 minuto y se mezclaron bien mediante vórtex. AAV-GAD65 y AAV-IL-10 se diluyeron en PBS para obtener los títulos virales que se muestran en la Tabla 2. Para administrar 5 µL de la muestra a cada animal, las dos soluciones diluidas de virus se mezclaron mitad y mitad para obtener 1,5 veces el volumen requerido. Luego, se administraron 5 µL de la muestra a cada animal.

[Tabla 2]

Muestras	Tipos de virus y contenidos	
	AAV-GAD65	AAV-IL-10
Ejemplo Experimental1 (1: 10)	5,0x10 <sup>6</sup> VG/ 2,5 µL	5,0x10 <sup>7</sup> VG/ 2,5 µL
Ejemplo Experimental2 (1: 30)	5,0x10 <sup>6</sup> VG/ 2,5 µL	1,5x10 <sup>8</sup> VG/ 2,5 µL

B. Preparación del modelo de dolor neuropático y administración de muestras

El modelo animal de dolor neuropático se preparó mediante el mismo método que se describe en el Ejemplo 2, y luego se administró la sustancia de prueba.

35 La sustancia de prueba se administró mediante el método de inyección epidural transforaminal en una posición adyacente al ganglio de la raíz dorsal (DRG). Después de la anestesia por inhalación del modelo animal de dolor

neuropático, se hizo una incisión lineal en la espalda de la rata en la columna lumbar de L3 a L5 para exponer los huesos vertebrales, y luego se expuso el proceso transversal L4, una de las proyecciones espinales, en el lado de la exposición. La rata se acostó de lado de manera que su aspecto lateral pudiera verse desde arriba, de modo que el foramen intervertebral L4 fuera visible.

- 5 Se colocó una microaguja unida al catéter en la muestra preparada. Se conectó una jeringa Hamilton al extremo opuesto del catéter y se tiró hasta alcanzar la marca de 5  $\mu$ L para inyectar la muestra en el catéter. Después de retirar la jeringa Hamilton del catéter, la región a 1 cm de la punta de la aguja fue sujeta mediante Halsted-Mosquito. Mientras se sujetaba la columna L4 con fórceps y se tiraba hacia arriba, el área de la punta de la aguja fijada con Halsted-Mosquito Straight se colocó alrededor del foramen intervertebral L4. La punta de la aguja se insertó en el foramen intervertebral cuyo espacio estaba asegurado y se avanzó hasta que la aguja alcanzó una porción doblada dentro del foramen intervertebral y se liberó la aguja que había sido sujeta. Después de confirmar que la aguja está fija, se conectó una jeringa de 1 mL al catéter de polietileno conectado al lado opuesto de la aguja. Se presionó suavemente el pistón para administrar lentamente la sustancia de administración diluida al área circundante del DRG de rata, seguido de sutura, para completar el procedimiento de administración. Por el mismo método que se describe en el Ejemplo 2, los resultados de dolor empleando la prueba de filamentos de von Frey se observaron a las 4 semanas después de la administración de la sustancia. Los resultados se muestran en la Figura 8.

La Figura 8 muestra que una mezcla de AAV-GAD65 y AAV-IL-10 muestra eficacia incluso cuando se administra mediante el método de inyección epidural transforaminal. Además, la eficacia sinérgica en el análisis del comportamiento animal se confirmó en la relación de composición mixta de AAV-GAD65 a AAV-IL-10 de 1:10 (Ejemplo Experimental 1) y 1:30 (Ejemplo Experimental 2).

<Ejemplo 5> Comparación de eficacias de AAV-GAD65 y AAV-IL-10 con AAV-GAD65 y AAV-IL-4

Se preparó un modelo animal de dolor sustancialmente mediante el mismo método que en el Ejemplo 2, y el procedimiento de preparación de la muestra de administración también fue el mismo. El AAV1-rIL-4 descrito en el Ejemplo 1 se descongeló y se preparó para su uso en experimentos con animales como sigue.

- 25 30 minutos antes del experimento de administración de DRG en animales, los reactivos almacenados a -80 °C se descongelaron a temperatura ambiente en 1 minuto y se mezclaron bien mediante vórtex. Se mezclaron bien 10 mg de azul de Coomassie en 1 ml de PBS y luego se prepararon los tintes filtrados por filtros de jeringa. AAV-GAD65 y AAV-rIL-4 se diluyeron en PBS para obtener las proporciones de mezcla basadas en títulos de virus que se muestran en la Tabla 3, y se agregó 1  $\mu$ L de colorante azul de Coomassie al 0,1 % a cada muestra según el cálculo de que cada animal obtiene 3  $\mu$ L. Las muestras se prepararon el doble de la cantidad requerida para la población total y se administraron 3  $\mu$ L de la muestra a cada animal.

[Tabla 3]

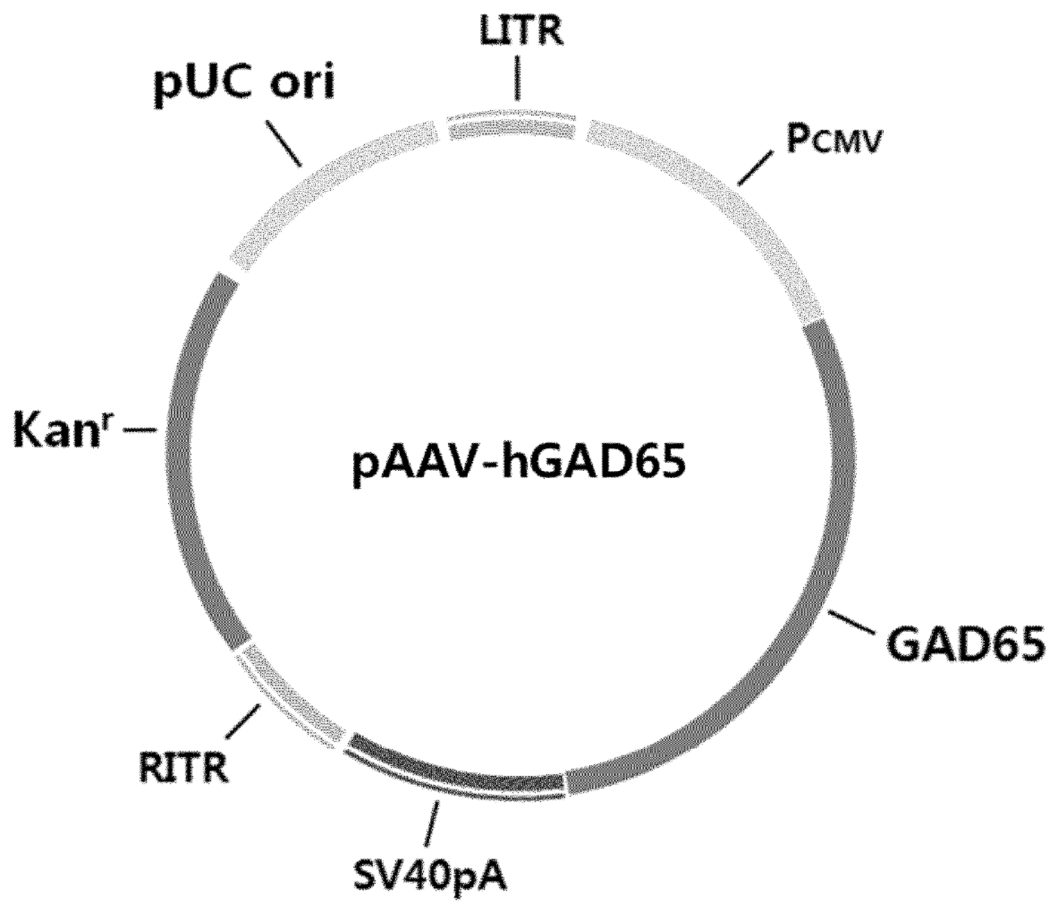
Muestras	Tipos de virus y contenidos		
	AAV-GAD65	AAV-IL-10	AAV-IL-4
Ejemplo Comparativo 1	5,4x10 <sup>5</sup> VG/ 2 $\mu$ L	-	-
Ejemplo comparativo 2	-	1,8x10 <sup>7</sup> VG/ 2 $\mu$ L	-
Ejemplo comparativo 3	-	-	1,8x10 <sup>7</sup> VG/ 2 $\mu$ L
Ejemplo comparativo 4	5,4x10 <sup>5</sup> VG/ 1 $\mu$ L	-	1,8x10 <sup>7</sup> VG/ 1 $\mu$ L
Ejemplo experimental 1	5,4x10 <sup>5</sup> VG/ 1 $\mu$ L	1,8x10 <sup>7</sup> VG/ 1 $\mu$ L	-

- 35 Se observaron los resultados de dolor empleando la prueba de filamento de von Frey, y los resultados se muestran en la Figura 9. La Figura 9 muestra los resultados de comparar las eficacias de AAV-GAD65 y AAV-rIL-10 con AAV-GAD65 y AAV-rIL-4, que ilustra las eficacias sinérgicas que aparecen comparativamente en el análisis del comportamiento animal cuando se usaron IL-10 e IL-4, citoquinas que tienen efectos antiinflamatorios, en combinación con GAD65, respectivamente. Como se muestra en la Figura 9, la eficacia del tratamiento del dolor fue insignificante o no se observó cuando se administraron solos GAD65, IL-10 o IL-4, y no se observó una eficacia analgésica significativa cuando se coadministraron GAD65 e IL-4 en comparación con los casos en los que se administró GAD65 o IL-4 solos. Por otro lado, cuando se coadministraron GAD65 e IL-10, se confirmó que hubo una mayor eficacia analgésica que fue estadísticamente significativa que los otros ejemplos comparativos. En particular, se observó un efecto sinérgico de alivio del dolor, que no se mostró cuando se coadministraron GAD65 e IL-4.

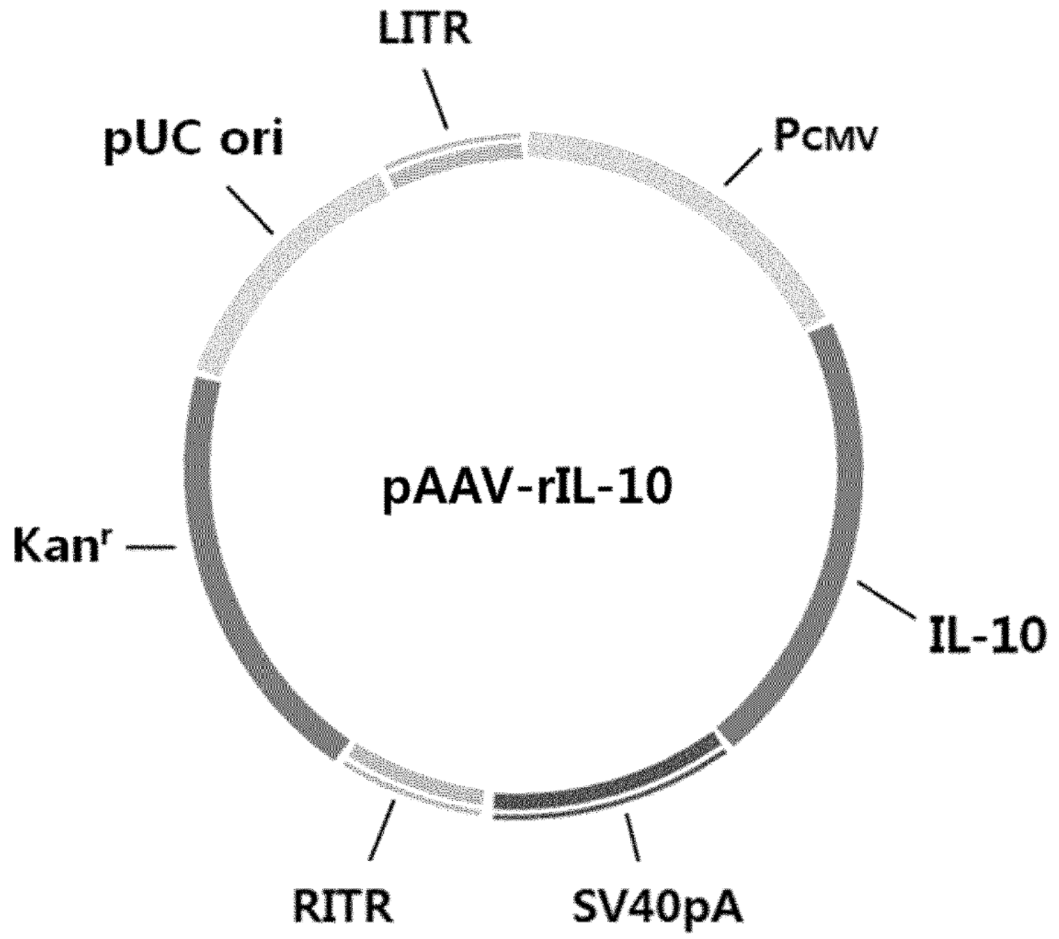
**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica para usar en el alivio o tratamiento del dolor, que comprende un gen que codifica la glutamato descarboxilasa (GAD) y un gen que codifica la interleucina-10 (IL-10).
- 5 2. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende un primer vector que contiene operativamente un gen que codifica GAD y un segundo vector que contiene operativamente un gen que codifica IL-10.
3. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la composición comprende un primer vector que contiene un gen que codifica GAD y un segundo vector que contiene un gen que codifica IL-10 en una relación de mezcla basada en el título del virus por unidad de volumen de 1:1 a 1:50.
- 10 4. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el vector es al menos un vector viral seleccionado del grupo que consiste en adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes simple, lentivirus, retrovirus y poxvirus.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende un primer vector viral adenoasociado que contiene un gen que codifica GAD y un segundo vector viral adenoasociado que contiene un gen que codifica IL-10 en una relación de mezcla basada en el título del virus por unidad de volumen de 1:1 a 1:50.
6. La composición para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la GAD es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en GAD65 y GAD67.
7. La composición para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la GAD consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4.
- 20 8. La composición para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el gen que codifica GAD consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.
9. La composición para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la IL-10 consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 9.
- 25 10. La composición para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el gen que codifica IL-10 consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10.
- 30 11. La composición para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el dolor es dolor nociceptivo, dolor psicogénico, dolor inflamatorio o dolor patológico; en la que opcionalmente el dolor es dolor neuropático, dolor por cáncer, dolor posoperatorio, neuralgia del trigémino, dolor idiopático, dolor neuropático diabético o migraña.
12. La composición para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica comprende además un vehículo fisiológicamente aceptable.
- 35 13. La composición para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la composición farmacéutica es una inyección.

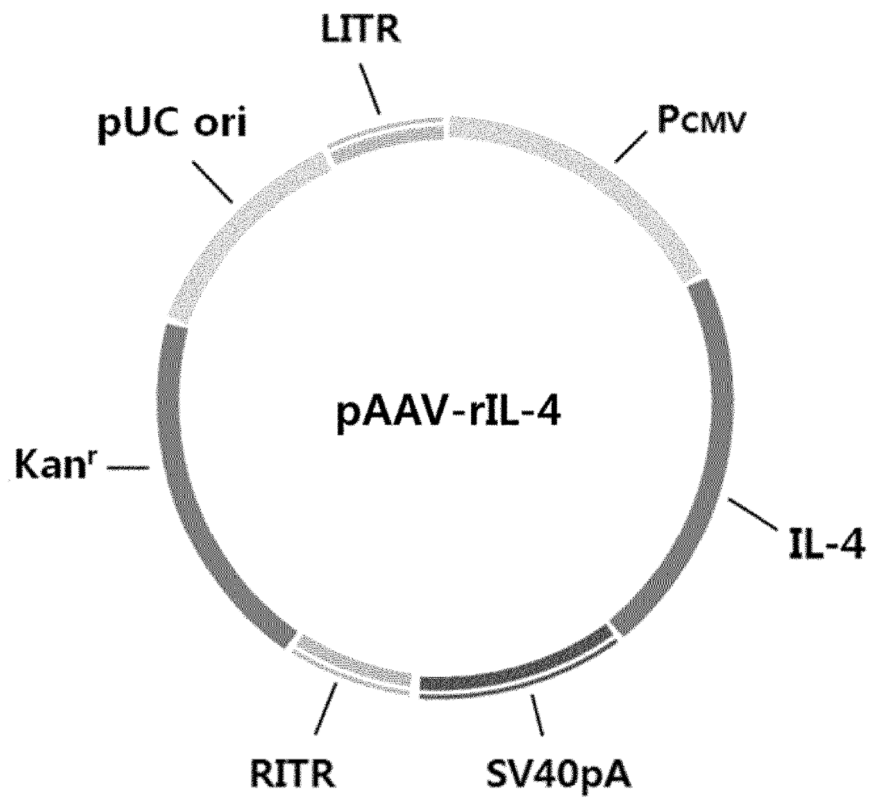
[Fig. 1]



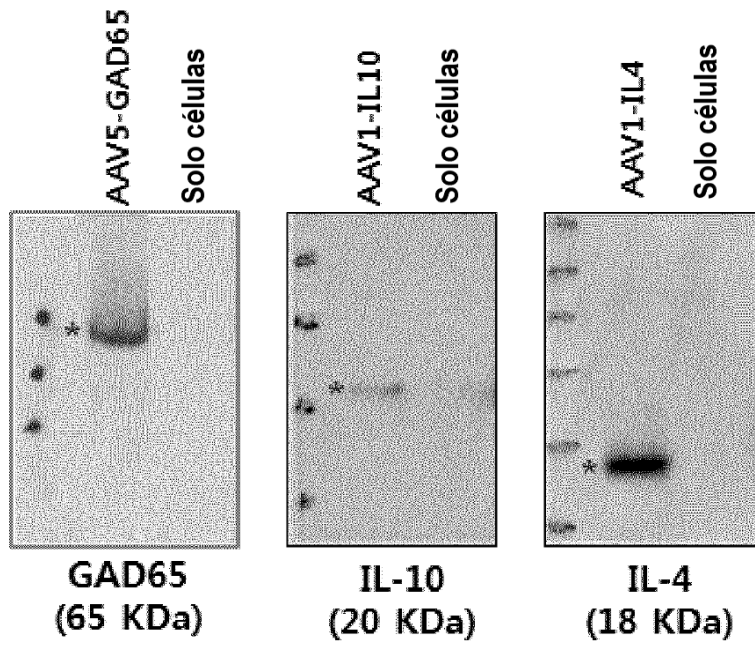
[Fig. 2]



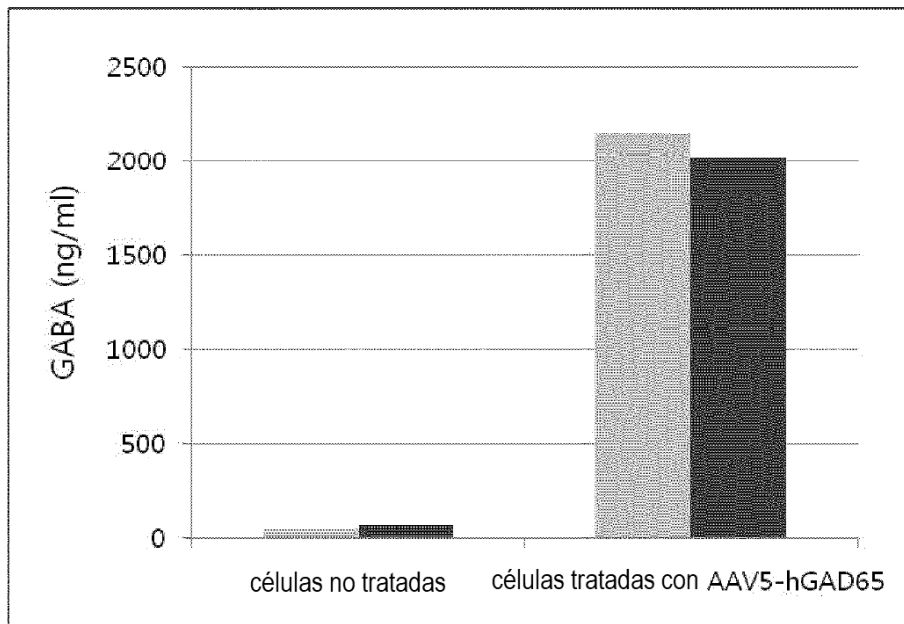
[Fig. 3]



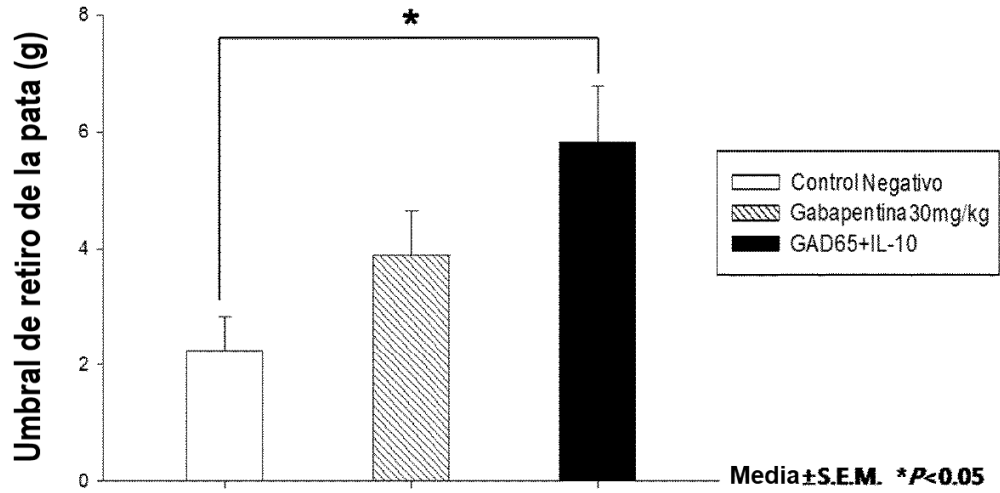
[Fig. 4]



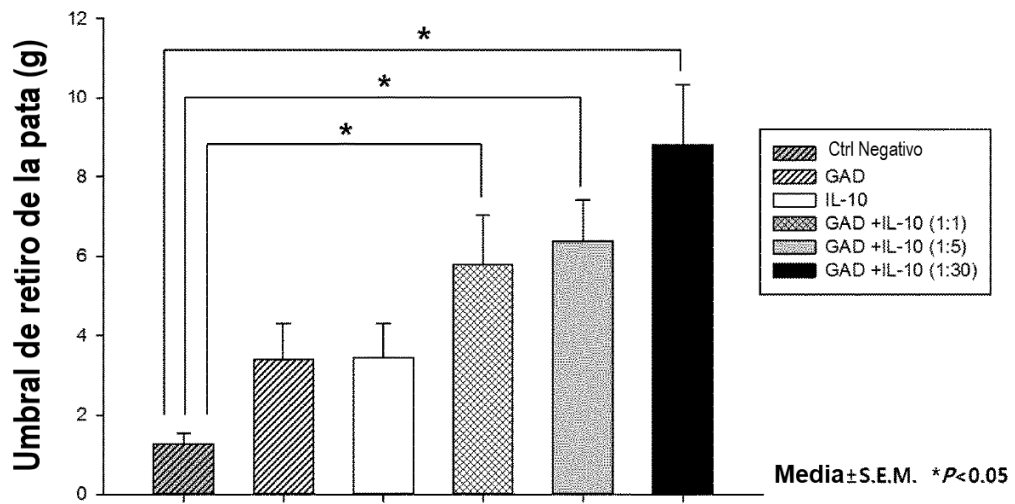
[Fig. 5]



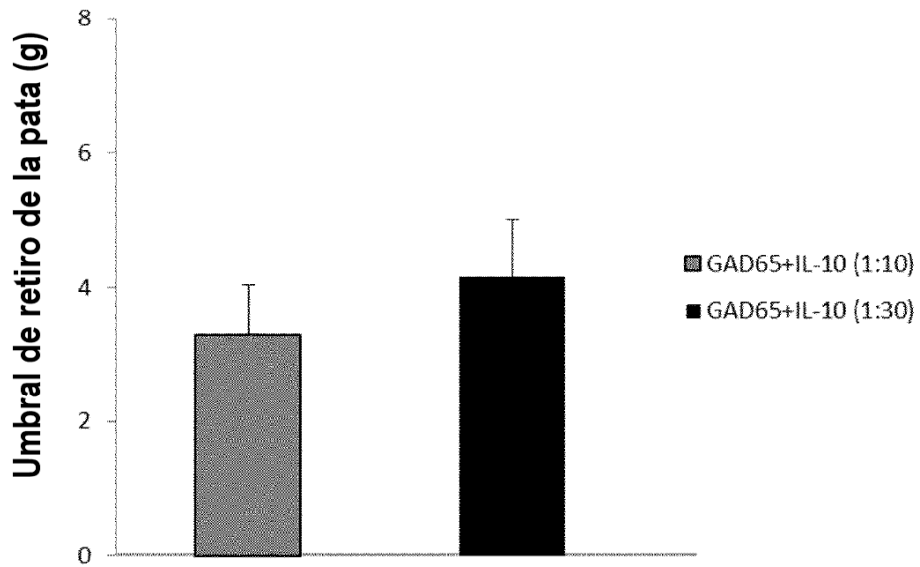
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]

