

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 905 227**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2017 PCT/KR2017/012136**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2018 WO18080277**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2017 E 17863851 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.01.2022 EP 3533471**

54 Título: **Composición para aliviar o tratar el dolor**

30 Prioridad:

31.10.2016 KR 20160143519

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

07.04.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIM, SUJEONG;
CHOI, HEONSIK;
KWON, YEJIN;
KIM, MINJUNG;
KIM, MINJU;
KIM, DAEWOOK;
PARK, JANGJOON;
CHO, JONGHO;
LEE, SOONDONG;
KIM, JOONSUNG y
SIM, YEOMOON**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 905 227 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 aliviar o tratar el dolor

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición para aliviar o tratar el dolor y a un método para aliviar o tratar el dolor mediante el uso de la misma.

10 Antecedentes de la técnica

Dolor significa una experiencia de daño tisular real o potencial o sensaciones y sentimientos desagradables que se asocian con tal daño. El dolor protege las partes del cuerpo que han sido dañadas durante la curación de los tejidos dañados de la situación dañada y proporciona motivación para evitar experiencias similares en el futuro. La mayor parte del dolor se alivia lentamente cuando se elimina el estímulo causal, pero a veces el dolor persiste aunque los tejidos se hayan curado ya que el estímulo ha desaparecido y el daño se ha curado claramente, o el dolor se produce en un estado sin ninguna irritación, daño o enfermedad.

20 Para el tratamiento del dolor, principalmente, los analgésicos narcóticos como la morfina, que es un alcaloide opiáceo, o los analgésicos no narcóticos como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) que tienen el ingrediente ácido acetilsalicílico, el ibuprofeno o el paracetamol se usan ampliamente.

25 Los analgésicos narcóticos tienen la ventaja de mostrar la dosis-respuesta y una alta eficacia, pero pueden provocar efectos secundarios en el sistema nervioso y, si se usan durante un período prolongado, pueden provocar resistencia y dependencia física, y el dolor puede empeorar.

30 Si la aspirina, un analgésico no narcótico que tiene ácido acetilsalicílico como ingrediente principal, se usa con fines antiinflamatorios, debe administrarse en una dosis alta de al menos 500 mg. Sin embargo, la aspirina es un analgésico antiinflamatorio no esteroideo que bloquea la enzima (COX-1) que promueve la producción de prostaglandinas, que protegen el estómago, que evita de esta manera la formación de la mucosa gástrica. Por lo tanto, el estómago puede dañarse fácilmente por el ácido gástrico y puede producirse una hemorragia gastrointestinal. Además, el ibuprofeno también es un analgésico antiinflamatorio no esteroideo, que puede causar trastornos gástricos. También, en el caso de los analgésicos que tienen paracetamol como ingrediente principal, como el Tylenol, el paracetamol se metaboliza principalmente en el hígado y puede inducirse daño hepático.

35 Incluso si los analgésicos anteriores son efectivos en una etapa temprana, a menudo se vuelven ineficaces debido a la resistencia cuando se usan durante un período prolongado. Específicamente, en el caso del dolor neuropático, existe el problema de que el dolor no responde a la dosis máxima de un agente antiinflamatorio no esteroideo y, por lo tanto, se administra a una dosis alta durante un período corto.

40 Recientemente, se han desarrollado nuevos agentes terapéuticos para el dolor neuropático, pero todavía tienen efectos secundarios. Por ejemplo, los bloqueadores de los canales de sodio se encuentran principalmente en forma de moléculas pequeñas y muestran baja selectividad por las isoformas de proteínas. Además, muestran efectos secundarios como toxicidad cardíaca y trastornos del movimiento.

45 Por lo tanto, existe una necesidad imperiosa de desarrollar un nuevo analgésico para el dolor neuropático excelente en eficacia analgésica mientras reduce los efectos secundarios.

50 Descripción de la invención

Problema técnico

55 En consecuencia, los presentes inventores se han esforzado para desarrollar un nuevo analgésico para el dolor neuropático que exhibe una excelente eficacia analgésica incluso a una dosis baja. Como resultado, los presentes inventores han encontrado que cuando se usa una combinación de dos o más de glutamato descarboxilasa, una citocina antiinflamatoria y un factor neurotrófico derivado de la glía, el dolor puede aliviarse o tratarse significativamente en comparación con un uso individual, y han completado la presente invención.

60 Solución al problema

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para aliviar o tratar el dolor que comprende dos o más que se seleccionan del grupo que consiste en un gen que codifica el glutamato descarboxilasa (GAD), un gen que codifica la interleucina 10 (IL-10) y un gen que codifica un factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF).

65

Efectos ventajosos de la invención

Una composición farmacéutica de la presente invención comprende dos o más que se seleccionan del grupo que consiste en genes que codifican GAD, IL-10 y GDNF. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención exhibe una excelente eficacia analgésica a una dosis más baja a la de la administración individual, ya que los genes se coadministran y, por lo tanto, pueden reducirse los efectos secundarios y la toxicidad convencionales. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser útil para aliviar o tratar el dolor.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el diagrama esquemático de los plásmidos pAAV-GAD65 y pAAV-GAD65-modi que se usaron para la construcción del virus adenoasociado recombinante:

(a) muestra el diagrama esquemático de pAAV-GAD65 y (b) muestra el diagrama esquemático de pAAV-GAD65-modi.

La Figura 2 muestra el diagrama esquemático del plásmido pAAV-IL-10 que se usó para la construcción del virus adenoasociado recombinante.

La Figura 3 muestra el diagrama esquemático del plásmido pAAV-GDNF que se usó para la construcción del virus adenoasociado recombinante.

La Figura 4 es un diagrama esquemático que muestra el plásmido pAAV-GDNF-IL-10.

La Figura 5 muestra la expresión de cada gen que se introduce mediante el plásmido pAAV-GAD65, pAAV-IL-10 o pAAV-GDNF:

(a) muestra la expresión de GAD65 mediante el plásmido pAAV-GAD65; (b) muestra la expresión de la IL-10 mediante el plásmido pAAV-IL-10; y (c) muestra la expresión del GDNF mediante el plásmido pAAV-GDNF.

La Figura 6 muestra la expresión del gen GDNF y el gen IL-10 mediante el plásmido pAAV-GDNF-IL-10:

(a) muestra la expresión de la IL-10 mediante el plásmido pAAV-GDNF-IL-10; (b) muestra la expresión del GDNF mediante el plásmido pAAV-GDNF-IL-10.

La Figura 7 muestra los resultados de transferencia Western que muestra la expresión de cada proteína después del tratamiento de las células 293T o HeLa con cada virus adenoasociado recombinante después de la construcción de los virus adenoasociados recombinantes en los que se introdujeron el gen GAD65, el gen IL-10 y el gen GDNF, respectivamente:

(a) muestra la expresión de GAD65 después del tratamiento de las células 293T o HeLa con el virus recombinante adenoasociado AAV-GAD65; (b) muestra la expresión de GAD65 después del tratamiento de las células 293T o HeLa con el virus recombinante adenoasociado AAV-GAD65-modi; (c) muestra la expresión de IL-10 después del tratamiento de las células 293T o HeLa con el virus adenoasociado recombinante AAV-IL-10; y (d) muestra la expresión de GDNF después del tratamiento de las células 293T o HeLa con el virus recombinante adenoasociado AAV-GDNF.

La Figura 8 muestra los niveles de expresión de GABA que se miden mediante ELISA después del tratamiento de las células 293T o HeLa con el virus adenoasociado recombinante AAV-GAD65 o AAV-GAD65-modi:

(a) es un gráfico que muestra el nivel de expresión de GABA después de tratar las células 293T o HeLa con el virus recombinante adenoasociado AAV-GAD65; y (b) es un gráfico que muestra el nivel de expresión de GABA después de tratar las células 293T o HeLa con el virus recombinante adenoasociado AAV-GAD65-modi.

La Figura 9 es un gráfico que muestra los resultados de comparar las eficacias para aliviar el dolor entre la administración individual de los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 o AAV-GDNF y la coadministración de los virus AAV-GAD65 y AAV-GDNF, o los virus AAV-IL-10 y AAV-GDNF.

La Figura 10 es un gráfico que muestra los resultados de comparar las eficacias para aliviar el dolor entre la administración individual de los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 o AAV-GDNF y la coadministración de los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 y AAV-GDNF.

La Figura 11 es un gráfico que muestra los resultados de comparar las eficacias para aliviar el dolor entre la coadministración de los virus AAV-GAD65 y AAV-GDNF, o los virus AAV-IL-10 y AAV-GDNF y la coadministración de todos los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 y AAV-GDNF.

La Figura 12 es un gráfico que muestra los resultados de comparar las eficacias para aliviar el dolor entre la administración individual de los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10 o pAAV-GDNF y la coadministración de los plásmidos pAAV-GAD65 y pAAV-GDNF, o los plásmidos pAAV-IL-10 y pAAV-GDNF.

La Figura 13 es un gráfico que muestra los resultados de comparar las eficacias para aliviar el dolor entre la administración individual de los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, o pAAV-GDNF y la coadministración de todos los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10 y pAAV-GDNF.

5 La Figura 14 es un gráfico que muestra los resultados de comparar las eficacias para aliviar el dolor entre la coadministración de los plásmidos pAAV-GAD65 y pAAV-GDNF, o los plásmidos pAAV-IL-10 y pAAV-GDNF y la coadministración de todos los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10 y pAAV-GDNF.

10 La Figura 15 es un gráfico que muestra los resultados de comparar las eficacias para aliviar el dolor entre la coadministración de los virus AAV-GAD65-modi y AAV-GDNF-IL-10 y la coadministración de todos los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 y AAV-GDNF.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

15 En lo adelante, la presente invención se describirá en detalle.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para aliviar o tratar el dolor que comprende dos o más que se seleccionan del grupo que consiste en un gen que codifica el glutamato descarboxilasa (GAD), un gen que codifica la interleucina 10 (IL-10) y un gen que codifica un factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF).

20 En una modalidad, la combinación de dos o más puede ser GAD e IL-10, GAD y GDNF, IL-10 y GDNF o GAD, IL-10 y GDNF.

25 Dos o más genes que se seleccionan del grupo que consiste en un gen que codifica GAD, un gen que codifica IL-10 y un gen que codifica GDNF pueden estar una forma de contenerse en un portador. En la presente descripción, el portador puede ser un vector viral o un vector no viral como un plásmido, un liposoma, etc. Además, los genes pueden estar en una forma en la que algunos de los genes se contienen en un vector viral y los genes restantes se contienen en un vector no viral.

30 En una modalidad, los genes pueden estar en una forma en la que la GAD se contiene en un vector viral y la IL-10 se contiene en un vector no viral. Además, los genes pueden estar en una forma en la que la GAD se contiene en un vector viral y el GDNF se contiene en un vector no viral. Adicionalmente, los genes pueden estar en una forma en la que la IL-10 se contiene en un vector viral y el GDNF se contiene en un vector no viral. Además, los genes pueden estar en una forma en la que la GAD se contiene en un vector viral y la IL-10 y el GDNF se contienen en un vector no viral. Además, los genes pueden estar en una forma en la que la GAD y la IL-10 se contienen en un vector viral y el GDNF se contiene en un vector no viral. Además, los genes pueden estar en una forma en la que la GAD y el GDNF se contienen en un vector viral y la IL-10 se contiene en un vector no viral. Además, los genes pueden estar en una forma en la que la IL-10 se contiene en un vector viral y la GAD y el GDNF se contienen en un vector no viral. Además, los genes pueden estar en una forma en la que la IL-10 y el GDNF se contienen en un vector viral y la GAD se contiene en un vector no viral. También, los genes pueden estar en una forma en la que el GDNF se contiene en un vector viral, y la GAD y la IL-10 se contienen en un vector no viral.

45 Además, el gen puede estar en una forma contenida operativamente en un vector. Específicamente, el gen puede estar en una forma contenida operativamente en un vector viral o en un vector no viral.

El vector viral puede ser al menos uno que se selecciona del grupo que consiste en adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus del herpes simple, lentivirus, retrovirus, citomegalovirus, baculovirus, poxvirus, etc. Específicamente, el vector viral puede ser un virus adenoasociado.

50 En una modalidad, el gen que codifica la GAD puede contenerse operativamente en un portador 1 (por ejemplo, un primer vector), y el gen que codifica la IL-10 puede contenerse operativamente en un portador 2 (por ejemplo, un segundo vector), y el gen que codifica el GDNF puede contenerse operativamente en un portador 3 (por ejemplo, un tercer vector). Además, un portador puede contener dos o más genes.

55 El vector no viral puede ser al menos uno que se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, un liposoma, un polímero catiónico, una micela, una emulsión y nanopartículas lipídicas sólidas.

60 El término "plásmido", como se usa en la presente descripción, se refiere a un fragmento de ADN circular que existe por separado fuera del cromosoma de las bacterias. Los plásmidos no tienen genes esenciales para la supervivencia de las bacterias, pero contienen genes esenciales para la resistencia a ciertos antibióticos y para el intercambio de genes entre bacterias. Además, los plásmidos pueden crecer independientemente de los cromosomas y contener marcadores seleccionables.

65 El término "liposoma", como se usa en la presente descripción, se refiere a una pequeña vesícula que se produce mediante la formación de una bicapa debido a la porción hidrófila y la porción hidrófoba cuando una molécula que

tiene ambas, una porción hidrófoba y una porción hidrófila en una molécula, como un fosfolípido, se suspende en una solución acuosa. El liposoma se aísla de la membrana externa por una membrana compuesta por una bicapa lipídica, y los liposomas que contienen ADN, ARNm, etc., pueden usarse como mediadores de la información genética.

5 El término "polímero catiónico", como se usa en la presente descripción, se refiere a un lípido catiónico o a un compuesto polimérico que es una sustancia que forma un complejo mediante un enlace iónico con el ADN aniónico y suministra el ADN a una célula.

10 El término "micela", como se usa en la presente descripción, se refiere a un agregado coloidal termodinámicamente estable que se forma a partir de moléculas que consisten en un grupo polar y un grupo hidrófobo no polar, como los tensioactivos y las moléculas de lípidos, a través de la asociación mediante una fuerza de van der Waals o similar en una solución. Además, las micelas que contienen ADN, ARNm y similares pueden usarse como mediadores de información genética.

15 El término "emulsión", como se usa en la presente descripción, significa que, cuando se mezclan dos soluciones de diferentes fases, un líquido forma partículas finas y se dispersa en otro líquido. El ADN, el ARNm y similares pueden contenerse en el centro de la partícula de emulsión para usarse como mediadores de la información genética.

20 Como se usa en la presente descripción, el término "nanopartícula lipídica sólida" se refiere a una preparación de una forma en la que un fármaco se contiene en una micropartícula de tamaño nanométrico que se compone de un lípido sólido en lugar de un lípido líquido.

25 Un portador 1 (por ejemplo, un primer vector) que comprende cualquier gen que se selecciona del grupo que consiste en GAD, IL-10 y GDNF, y un portador 2 (por ejemplo, un segundo vector) que comprende cualquier gen que se selecciona del grupo de genes restantes que no se incluyen en el portador 1 de acuerdo con la presente invención puede tener una relación de mezcla basada en el título del virus por unidad de volumen de 1: 1 a 100 o de 1 a 100: 1. Específicamente, la relación de mezcla basada en el título del virus por unidad de volumen del portador 1 y del portador 2 puede ser de 1: 1 a 10 o de 1 a 10: 1.

30 Un portador 1 (por ejemplo, un primer vector) que comprende un gen que codifica el GAD, un portador 2 (por ejemplo, un segundo vector) que comprende un gen que codifica la IL-10 y un portador 3 (por ejemplo, un tercer vector) que comprende un gen que codifica el GDNF de acuerdo con la presente invención puede tener una relación de mezcla basada en el título del virus por unidad de volumen de 1: 0,1 a 10: 0,1 a 10.

35 Como se usa en la presente descripción, el término "operativamente" significa que un gen que se introduce se une a una secuencia reguladora de tal manera que la expresión puede tener lugar en una célula huésped. La secuencia reguladora es una secuencia de ADN que regula la expresión del gen, y puede incluir otros elementos reguladores como promotores y potenciadores o poliadenilación. Además, la secuencia reguladora proporciona un sitio para la unión de un factor de transcripción que controla la expresión del gen que se introduce, y puede influir en la estructura del complejo con el factor de transcripción para determinar la función del factor de transcripción.

45 El término "GAD", como se usa en la presente descripción, se refiere a una enzima que descarboxila el glutamato para producir GABA (ácido gamma-aminobutírico). La GAD puede ser GAD65 o GAD67. Específicamente, la GAD65 puede derivarse de un ser humano, una rata, un perro, un gato o un caballo, pero no se limita a ellos. El gen que codifica la GAD puede ser la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 1, 4, 32, 34 o 36.

50 Además, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 1 puede ser la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 2 o 3, y puede ser la secuencia de ARNm que se muestra en la Secuencia de Referencia de NCBI: NM_000818.2. Además, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 4 puede ser la secuencia de nucleótidos que se optimizó por codones para ser adecuada para la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 5 o el gen que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 4, que puede ser la secuencia de ARNm que se muestra en la Secuencia de Referencia de NCBI: NM_000817.2.

55 Además, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 32 puede ser la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 33. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 34 puede ser la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 35, y la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 36 puede ser la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 37.

60 Además, el gen que codifica la GAD puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de GAD que puede retener la actividad de GAD y producir GABA. La variante de GAD incluye todas las secuencias que retienen las características de la GAD de producir GABA. Aunque no se limita a ninguna secuencia, la secuencia de nucleótidos que codifica la variante de GAD puede ser, preferentemente, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia de al menos el 60 % o más, el 70 % o más, el 80 % o más, o

el 90 % o más, y a la secuencia de aminoácidos de GAD que se describió anteriormente, y con la máxima preferencia, puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia del 95 % o más.

5 Además, la secuencia de nucleótidos que codifica la variante de GAD puede ser una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de secuencia de al menos el 60 % o más, el 70 % o más, el 80 % o más, o el 90 % o más con la secuencia de nucleótidos de GAD que se describió anteriormente y con la máxima preferencia, puede ser una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de secuencia del 95 % o más.

10 El "% de homología de secuencia" se determina al comparar las regiones de comparación en un estado en el que dos secuencias se alinean óptimamente. Además, algunas de las secuencias de nucleótidos en las regiones de comparación pueden incluir adiciones o deleciones (es decir, espacios) con relación a la secuencia de referencia (sin adición ni deleción) para la alineación óptima de las dos secuencias.

15 El término "IL-10", como se usa en la presente descripción, se refiere a una citocina antiinflamatoria que pertenece a la citocina de tipo II (Renauld, Nat Rev Immunol, 2003). La IL-10 está en una forma de un homodímero que consiste de dos subunidades, cada una que tiene la longitud de 178 aminoácidos. También se conoce como el factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF) en humanos. La IL-10 cumple la función de inhibir la actividad de las células NK (asesinas naturales) en la respuesta inmunitaria y forma un complejo con un receptor de IL-10 para participar en la transducción de señales. La IL-10 puede ser una proteína que se deriva de un ser humano, una rata, un perro, un gato o un caballo, pero no se limita a ellos. El gen que codifica la IL-10 puede ser la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 6, 9, 38, 40 o 42.

25 Específicamente, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 6 puede ser la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 7 u 8, y puede ser la secuencia de ARNm que se muestra en la Secuencia de Referencia de NCBI: NM_012854.2. Además, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 9 puede ser la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 10 o 14, y puede ser la secuencia de ARNm que se muestra en la Secuencia de Referencia de NCBI: NM_000572.2. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 38 puede ser la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 39. Además, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 40 puede ser la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 41, y la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 42 puede ser la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 43.

35 Además, el gen que codifica la IL-10 puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de IL-10 que retiene la actividad de la IL-10. La secuencia de nucleótidos que codifica la variante de IL-10 puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia de al menos el 60 % o más, el 70 % o más, el 80 % o más, el 90 % o más con la secuencia de aminoácidos de la IL-10 que se mostró anteriormente, y con la máxima preferencia, puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia del 95 % o más.

40 La secuencia de nucleótidos que codifica la variante de IL-10 puede ser una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de secuencia de al menos el 60 % o más, el 70 % o más, el 80 % o más, el 90 % o más con la secuencia de nucleótidos de IL-10 que se mostró anteriormente y con la máxima preferencia, puede ser una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de secuencia del 95 % o más.

45 El término "GDNF", como se usa en la presente descripción, se refiere a una proteína que constituye la familia de ligandos GDNF. La familia de ligandos GDNF consiste de GDNF, neurturina (NRTN), artemina (ARTN) y persefina (PSPN). Además, el GDNF es una proteína que promueve la supervivencia de muchos tipos de neuronas y transmite señales a través del receptor GFR α 1. El GDNF puede ser una proteína que se deriva de un ser humano, una rata, un perro, un gato o un caballo, pero no se limita a ellos. El gen que codifica el GDNF puede ser la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 11, 44, 46 o 48.

50 Específicamente, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 11 puede ser la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 12 o 13, y puede ser la secuencia de ARNm que se muestra en la Secuencia de Referencia de NCBI: NM_199231.2. Además, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 44 puede ser la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 45. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 46 puede ser la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 47, y la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 48 puede ser la secuencia de ADN que se representa mediante la SEQ ID NO: 49.

65 Además, el gen que codifica el GDNF puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una variante del GDNF que retiene la actividad del GDNF. La secuencia de nucleótidos que codifica la variante de GDNF puede ser una

secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia de al menos el 60 % o más, el 70 % o más, el 80 % o más, o el 90 % o más con la secuencia de aminoácidos de GDNF que se mostró anteriormente, y con la máxima preferencia, puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia del 95 % o más.

5 Además, la secuencia de nucleótidos que codifica la variante de GDNF puede ser una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de secuencia de al menos el 60 % o más, el 70 % o más, el 80 % o más, el 90 % o más con la secuencia de nucleótidos de GDNF que se mostró anteriormente, y con la máxima preferencia, puede ser una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de secuencia del 95 % o más.

10 El GABA, producto del gen GAD, tiene el efecto de bloquear la transducción de la señal del dolor, pero cantidades excesivas pueden causar síntomas como picazón, mareos, somnolencia, etc., así como también efectos secundarios como aumento de la frecuencia cardíaca o de la frecuencia respiratoria (Longo, Am Fam Physician, 2000).

15 Se sabe que la IL-10 es una citocina que muestra acciones antiinflamatorias, pero pueden producirse efectos secundarios como síntomas de gripe y similares (Friedrich, J Invest Dermatol, 2002).

Adicionalmente, se sabe que la expresión de GDNF exhibe eficacias analgésicas en una variedad de dolores como el dolor neuropático y similares, pero se ha informado en experimentos con monos que la administración en exceso causó daño neuronal del cerebro (Hovland, Toxicol Pathol, 2007).

20 Una composición farmacéutica de la presente invención puede exhibir acciones analgésicas con una pequeña cantidad de genes o portadores que contienen la misma. La composición de la presente invención consiste en un vector que contiene un gen que codifica la GAD, un vector que contiene un gen que codifica una citocina antiinflamatoria en tejidos nerviosos y/o un vector que contiene un gen que codifica el GDNF. Y mediante la coadministración de sustancias que tienen diferentes mecanismos analgésicos, es posible lograr los mismos o mejores efectos de alivio o tratamiento del dolor a una dosis más baja a la de la administración individual.

25 Particularmente, de acuerdo con la presente invención, cuando se coadministran dos o más genes que se seleccionan del grupo que consiste en genes que codifican GAD65, IL-10 y GDNF, tiene lugar un efecto sinérgico de alivio del dolor. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser útil para aliviar o tratar el dolor.

30 De acuerdo con una modalidad de la presente invención, el primer vector, el segundo vector y/o el tercer vector pueden ser un virus adenoasociado. El virus adenoasociado no se limita a un serotipo particular, y preferentemente puede ser cualquiera de AAV1 a AAV9.

35 El dolor puede seleccionarse del grupo que consiste en dolor nociceptivo, dolor psicógeno, dolor inflamatorio, dolor patológico, dolor neuropático, dolor del cáncer, dolor posoperatorio, dolor de la neuralgia del trigémino, dolor idiopático, dolor de la neuropatía diabética o migraña. En un ejemplo específico, el dolor puede ser una radiculopatía lumbosacra (LSR).

40 El dolor inflamatorio se refiere al dolor que se asocia con un daño tisular y la infiltración de células inmunitarias. Además, el dolor patológico significa un estado de enfermedad en el que el dolor se causa mediante el daño a un tejido nervioso o su función anormal. También, el dolor patológico puede ser un dolor disfuncional, como la fibromialgia, el síndrome del intestino irritable o la cefalea tensional.

45 Además, el dolor puede incluir dolor de espalda que puede distinguirse anatómicamente: dolor de cuello, dolor de espalda media, dolor de espalda baja o dolor de coxis. Además, el dolor puede ser al menos uno que se selecciona del grupo que consiste en dolor neuropático, dolor del cáncer, dolor posoperatorio, dolor de la neuralgia del trigémino, dolor idiopático, dolor de la neuropatía diabética, migraña y similares. En un ejemplo específico, el dolor puede ser una radiculopatía lumbosacra.

50 El dolor neuropático puede causarse mediante un daño o enfermedad que afecta el sistema somatosensorial. El dolor neuropático puede ser una sensación anormal que se llama alodinia y disestesia. Además, las características generales del dolor neuropático incluyen la sensación de calor o frío, hormigueo, entumecimiento y picazón. Por el contrario, el dolor nociceptivo a menudo se expresa como un dolor.

55 Además, la migraña se asocia con una serie de síntomas del sistema nervioso autónomo y es un trastorno crónico que causa cefaleas de severidad normal a grave. Se sabe que la migraña se asocia con un aumento de la excitabilidad de la corteza cerebral y con una regulación anormal de las neuronas del dolor en el núcleo del trigémino del tronco encefálico (Noseda, Pain, 2013).

60 Específicamente, una composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para aliviar o tratar el dolor neuropático y el dolor crónico del cáncer.

65

Como se usa en la presente descripción, el término "aliviar o tratar" significa cualquier acción que mejora o altera los síntomas del dolor de una manera beneficiosa mediante la administración de la composición de la presente invención.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un portador fisiológicamente aceptable. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender adicionalmente excipientes y diluyentes adecuados que se usan convencionalmente en la preparación de composiciones farmacéuticas. Además, las composiciones de la presente invención pueden usarse mediante su preparación como formulaciones externas, supositorios o inyecciones mediante métodos generales. Específicamente, la composición farmacéutica puede estar en forma de una inyección. En cuanto a las formulaciones adecuadas que se conocen en la técnica, las que se enumeran en Remington's Pharmaceutical Science (1985) pueden usarse.

Además, la composición farmacéutica puede comprender una sal (cloruro de sodio), lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, etc. como portadores, excipientes y diluyentes. Para la formulación de la composición farmacéutica de la presente invención, pueden usarse diluyentes o excipientes que generalmente se usan, como rellenos, extensores, aglutinantes, humectantes, desintegrantes, tensioactivos, etc.

Las formulaciones para la administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles, solventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, formulaciones liofilizadas y supositorios. Para solventes no acuosos y suspensiones pueden usarse propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal como aceite de oliva, y ésteres inyectables como oleato de etilo, etc. Witepsol, macrogol, Tween 61, aceite de cacao, aceite de laurina, glicerogelatina, etc. pueden usarse para bases para supositorios.

El dolor es como se describió anteriormente con respecto a la composición farmacéutica.

El sujeto puede ser un mamífero, que incluye un ser humano, o una célula y/o tejido que se aísla de un mamífero, que incluye un ser humano. El término "animal no humano" como se usa en la presente descripción pretende incluir todos los animales vertebrados, que incluyen mamíferos y no mamíferos, como primates, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

En cuanto a la vía de administración, la dosis y la frecuencia de administración, la composición farmacéutica puede administrarse a un sujeto de varias maneras y cantidades en dependencia de la condición del paciente y de la presencia o ausencia de efectos secundarios, y el intervalo de métodos de administración, las dosis y las frecuencias de administración óptimas pueden seleccionarse apropiadamente por los expertos en la técnica. Además, la composición farmacéutica puede administrarse en combinación con otro fármaco o una sustancia fisiológicamente activa que se sabe muestra una eficacia terapéutica en un trastorno a tratar. También, la composición farmacéutica puede prepararse en la forma de una formulación combinada.

Específicamente, la composición farmacéutica de la presente invención puede proporcionarse en forma de una inyección. Por ejemplo, pueden incluirse inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección epidural o inyección intratecal, y similares. Específicamente, la composición farmacéutica puede administrarse mediante inyección epidural o inyección intratecal y, más específicamente, puede administrarse mediante inyección epidural transforaminal o inyección intratecal.

Como se usa en la presente descripción, el término "inyección epidural transforaminal" se refiere a un método de inyección de un fármaco en el interior de un foramen intervertebral, que es un espacio donde los nervios emergen de la médula espinal a través del espacio entre los huesos de la columna, y en el espacio fuera de la duramadre que circunda la médula espinal y los nervios espinales. En una modalidad, si la composición farmacéutica de la presente invención se compone de virus, el fármaco puede administrarse en el interior del foramen intervertebral de un sujeto mediante la realización de una terapia de inyección epidural.

Como se usa en la presente descripción, el término "inyección intratecal" se refiere a un método de administración mediante la inyección de un fármaco en un espacio en el interior de la duramadre en el canal espinal. En una modalidad, si la composición farmacéutica de la presente invención se compone de plásmidos, el fármaco puede administrarse en el interior del canal espinal de un sujeto mediante la realización de una terapia de inyección intratecal.

Específicamente, si la composición farmacéutica se compone de vectores virales, puede administrarse en una cantidad de $1,0 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^{14}$ vg en base a un adulto. Además, cuando hay dos tipos de virus a administrar, cada tipo de virus puede administrarse en una cantidad de $5,0 \times 10^5$ a $5,0 \times 10^{13}$ vg. Si hay tres tipos de virus a administrar, cada tipo de virus puede administrarse en una cantidad de $3,0 \times 10^5$ a $3,0 \times 10^{13}$ vg.

Además, si la composición farmacéutica se compone de vectores no virales, puede administrarse en una concentración de 0,1 mg/mL a 10 mg/mL, en base a un adulto. También, si la composición farmacéutica se compone

de vectores plasmídicos, la dosis puede ser de 0,1 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL o más, que incluye todos los valores e intervalos entre ellos.

5 En cuanto a la frecuencia de administración de un vector viral, puede administrarse una vez o más, o de 1 a 10 veces. También, puede administrarse en el intervalo de 1 día a 1 mes, o de 1 mes a 1 año en el caso de administración repetida. Además, si la composición farmacéutica se compone de vectores no virales, puede administrarse 1 o más, o de 1 a 10 veces. También, puede administrarse con un intervalo de 12 a 24 horas o de 1 a 14 días en el caso de administración repetida.

10 La presente invención proporciona una composición farmacéutica para el uso para aliviar o tratar el dolor.

La presente invención proporciona un uso de la composición farmacéutica de la presente invención para la preparación de un agente terapéutico para aliviar o tratar el dolor.

15 Modos para llevar a cabo la invención

En lo adelante, la presente invención se describirá en detalle con referencia a ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

20 Ejemplo 1. Preparación y análisis de las propiedades del virus adenoasociado recombinante

Los virus adenoasociados que se requieren para la presente invención se construyeron y produjeron sobre la base del sistema sin AAV auxiliar (Agilent).

25 Ejemplo 1.1. Construcción del plásmido pAAV-GAD65

Para construir el plásmido pAAV-GAD65 de la Figura 1, la región promotora del CMV de pJDK-rGAD65 (Lee, Gene Ther, 2005) se amplificó mediante PCR y luego el resultante se introdujo en pGEM-T (Promega) para construir pGEM-T-CMV. Las secuencias de cebadores que se usaron para la amplificación del promotor de CMV son las siguientes:

30

F-JDK (SEQ ID NO: 15): 5'-TTCGGCCGTCGAGGAGCTTGGCCCATG-3'
R-JDK (SEQ ID NO: 16): 5'-GACGTCGACCTAGCTAGCGAATTCGGGGCCGCGGAG-3'.

35 En cuanto al gen GAD65, el gen que se representa mediante la SEQ ID NO: 3 se diseñó mediante la optimización de codones para ser adecuado para humanos en base al GAD65 humano (NCBI NM_000818.2) que se representa mediante la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y se remitió a Bioneer para la síntesis de genes. El gen hGAD65 que se introdujo en pGEM-T se trató con NheI y Sall para preparar un fragmento de ADN de 1,7 Kb. Posteriormente, se sometió a ligadura con el fragmento de ADN de 3,7 Kb que se obtuvo al tratar pGEM-T-CMV con NheI y Sall, para completar la construcción del pGEM-T-CMV-hGAD65.

40

SV40pA se amplificó mediante la realización de una PCR mediante el uso de pCI (Invitrogen) como molde y, luego, el resultante se trató con ClaI y Sall para preparar un fragmento de ADN de 222 pb. El fragmento de ADN se sometió a ligadura con el fragmento de ADN de 5,4 Kb que se preparó al cortar pGEM-T-CMV-hGAD65 con ClaI y Sall, para finalmente preparar pGEM-T-CMV-hGAD65-SV40pA. Las secuencias de cebadores que se usaron para la amplificación de SV40pA son las siguientes:

45

F-SV40pA (SEQ ID NO: 17): 5'-CCATCGATCAGACATGATAAGATACATTGATGAG-3'
R-SV40pA (SEQ ID NO: 18): 5'-GACGTCGACGCGCCGCTACCACATTTGTAGAGTTTTACTTG-3'.

50 Para construir un vector de virus adenoasociado, el gen de resistencia a la ampicilina en pAAV-MCS (Agilent) se reemplazó con el gen de resistencia a la kanamicina. El gen de resistencia a la kanamicina se amplificó mediante PCR mediante el uso de pET-28 (a) (Novagen) como molde. El gen de resistencia a la kanamicina de 816 pb que se amplificó se sometió a ligadura con pGEM-T para construir pGEM-T-Kan^r. Las secuencias de cebadores que se usaron para la amplificación del gen de resistencia a la kanamicina son las siguientes:

55

F-Kan (SEQ ID NO: 19): 5'-AGGCGCCATGAGCCATATTCAACGGGAA-3'
R-Kan (SEQ ID NO: 20): 5'-TTCATGATTAGAAAACTCATCGAGCATC-3'.

60 Para introducir el gen de resistencia a la kanamicina, los sitios SpeI y EcoRV se generaron respectivamente mediante mutagénesis aguas arriba y aguas abajo del gen de resistencia a la ampicilina en pAAV-MCS, y luego el resultante se trató nuevamente con SpeI y EcoRV. El resultante se sometió a ligadura con el fragmento de ADN que se obtuvo al cortar el pGEM-T-Kan^r que se construyó previamente con NheI y EcoRV, para construir pAAV-MCS-Kan^r.

65 El pAAV-MCS-Kan^r que se construyó se trató con NotI y BamHI, y luego se sometió a ligadura con el fragmento de ADN de 2,7 Kb que se obtuvo al cortar el pGEM-T-CMV-hGAD65-SV40pA con EagI y PvuI, para construir pssAAV-GAD65.

Para introducir el casete de expresión GAD65 en pVAX1 (Invitrogen), el sitio BamHI se generó mediante mutagénesis aguas abajo del bGHpA. Luego, el resultante se cortó con MluI y NheI para preparar fragmentos de ADN. Las regiones promotoras de LITR y CMV se amplificaron mediante PCR mediante el uso de pssaAV-GAD65 como molde y se clonaron en pGEM-T easy (Promega). Posteriormente, el resultante se cortó con AclI y NheI y se sometió a ligadura con el vector pVAX1 que se preparó previamente para construir pVAX1-LITR-CMV. Las secuencias de cebadores que se usaron para la amplificación de la región promotora de LITR y CMV son las siguientes:

F-ITR (SEQ ID NO: 21): 5'-ATGGCGCGCCCCTGGCCTTTTGCTGGCC-3',
 R-JDK (SEQ ID NO: 16): 5'-GACGTGACCTAGCTAGCGAATTCGGGGCCGCGGAG-3'.

pVAX1-LITR-CMV se cortó nuevamente con NotI y NheI para preparar fragmentos de ADN. Se cortó PSSAAV-GAD65 con EagI y NheI y se sometió a ligadura con los fragmentos de ADN que se prepararon previamente para construir pVAX1-LITR-CMV-hGAD65-SV40pA.

El pVAX1-LITR-CMV-hGAD65-SV40pA se cortó con HpaI y BamHI para preparar fragmentos de ADN. Además, psA-SV40pA-RITR, que se había preparado mediante la amplificación a través de PCR mediante el uso de pssaAV-GAD65 como molde y al clonar en pGEM-T easy, se trató con HpaI y BamHI para preparar fragmentos de ADN. Los dos fragmentos de ADN se ligaron para completar pVAX1-LITR-CMV-hGAD65-SV40pA-RITR (que en lo adelante se abrevia como "pAAV-GAD65"). Las secuencias de cebadores que se usaron para la amplificación de la región SV40pA y RITR son las siguientes:

F-SV40pA (SEQ ID NO: 17): 5'-CCATCGATCAGACATGATAAGATACATTGATGAG-3'
 R-ITR (SEQ ID NO: 22): 5'-ATGGATCCGCTAGTAAATACCGCATCAG-3'.

El diagrama esquemático del plásmido pAAV-GAD65 se muestra en la Figura 1.

Se llevó a cabo el siguiente procedimiento para construir pAAV-GAD65 modificado.

Primero, el vector se cortó con NheI y luego se insertó una secuencia de nucleótidos aleatoria arbitraria entre el promotor de CMV y el gen GAD65 mediante un método de infusión. Las secuencias de nucleótidos que se insertaron son las siguientes:

Secuencia rellena aleatoria (SEQ ID NO: 29):
 5'-GTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCC-3'
 Stuffer_scramble_F (SEQ ID NO: 30):

5'-CTAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCC-

3'

Stuffer_scramble_R (SEQ ID NO: 31):

5'-CTAGGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGAC-

3'.

A continuación, la secuencia de nucleótidos WPRE (Schambach, Gene Ther, 2006), de la que se eliminó la región de la proteína X que puede proporcionar un efecto oncogénico, se amplificó mediante PCR y se insertó en la parte posterior del gen GAD65 mediante el uso de las enzimas de restricción PacI y HpaI. Al mismo tiempo, se eliminó alguna porción de SV40pA para construir un SV40pA modificado. Las secuencias de cebadores que se usaron para la amplificación de WPRE son las siguientes:

WPRE_Pac1_F (SEQ ID NO: 25):
 5'-GGTGGTTTAATTAATAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTG-3'
 WPRE_modi_Hpa1_R (SEQ ID NO: 26): 5'-GGTGGTGTAAACGACAACACCACGGAATTG-3'.

El plásmido finalmente modificado fue pVAX1-LITR-CMV-secuencia rellena aleatoria-hGAD65-WPRE (modi)-SV40pA (modi)-RITR (que en lo adelante se abrevia como "pAAV-GAD65-modi"), y su diagrama esquemático se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 1.2. Construcción del plásmido pAAV-IL-10

El plásmido pAAV-IL-10 se construyó mediante el mismo método que en el Ejemplo 1.1. En cuanto al gen de IL-10 de rata, el gen que se representa mediante la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 se diseñó mediante la

optimización de codones para que sea adecuado para ratas en base a la IL-10 humana (NCBI NM-012854) que se representa mediante la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y se remitió a Bioneer para la síntesis de genes. El gen rIL-10 se amplificó mediante la realización de una PCR mediante el uso del gen IL-10 de rata que se introdujo en pGEM-T easy como molde, y luego el resultante se trató con NheI y Sall para preparar un fragmento de ADN de 0,5 Kb. Además, se trató pGEM-T-CMV con NheI y Sall para preparar un fragmento de ADN de 3,7 Kb. Los dos fragmentos de ADN se ligaron para preparar pGEM-T-CMV-rIL-10. Las secuencias de cebadores que se usaron para la amplificación de rIL-10 son las siguientes:

F-rIL-10 (SEQ ID NO: 23): 5'-CCGCTAGCGCCACCATGCCT-3'
R-rIL-10 (SEQ ID NO: 24): 5'-GACGTGCGACGCCATCGATGGCTTAATTAATCAATTCTTC-3'.

En cuanto al SV40pA, el gen se amplificó mediante la realización de una PCR mediante el uso del pCI como molde y luego se trató con NotI y Sall para preparar un fragmento de ADN de 222 pb. Además, el pGEM-T-CMV-rIL-10 se trató con ClaI y Sall para preparar un fragmento de ADN de 4,2 Kb. Los dos fragmentos de ADN se ligaron para construir pGEM-T-CMV-rIL-10-SV40pA. Las secuencias de cebadores que se usaron para la amplificación de SV40pA son las siguientes:

F-SV40pA (SEQ ID NO: 17): 5'-CCATCGATCAGACATGATAAGATACATTGATGAG-3'
R-SV40pA (SEQ ID NO: 18): 5'-GACGTGCGACGCGCCGCTACCACATTTGTAGAGGTTTACTTG-3'.

El pGEM-T-CMV-rIL-10-SV40pA se trató con EagI para preparar un fragmento de ADN de 1,6 kb. Además, pAAV-MCS-Kan^r se trató con NotI y BamHI para preparar fragmentos de ADN. Posteriormente, los dos fragmentos de ADN se ligaron para construir pAAV-CMV-rIL-10-SV40pA (que en lo adelante se abrevia como "pAAV-IL-10"). El diagrama esquemático del plásmido pAAV-IL-10 se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 1.3. Construcción del plásmido pAAV-GDNF

En cuanto al gen GDNF humano, el gen que se representa mediante la SEQ ID NO: 13 se diseñó mediante la optimización de codones para sea adecuado para humanos en base al GDNF humano (NCBI NM_199231.2) que se representa mediante la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y se remitió a Bioneer para la síntesis de genes. El gen hGDNF que se introdujo en el plásmido pGEM-B1 se trató con NheI y PacI para preparar un fragmento de ADN de aproximadamente 0,6 kb. El plásmido pGEM-T-CMV-rIL-10-SV40pA se trató con NheI y PacI para preparar un fragmento de 2,8 kb en el que se eliminó el gen rIL-10. Los dos fragmentos de ADN se ligaron para construir el plásmido pGEM-T-CMV-hGDNF-SV40pA.

Luego, el plásmido pGEM-T-CMV-hGDNF-SV40pA que se completó se trató con EagI para preparar un fragmento de ADN de 1,5 kb. Además, pAAV-MCS-Kan^r se trató con NotI y BamHI para preparar un fragmento de ADN de 1,8 kb. Los dos fragmentos de ADN se ligaron para construir pAAV-CMV-hGDNF-SV40pA-Kan^r (que en lo adelante se abrevia como "pAAV-GDNF"). El diagrama esquemático del plásmido pAAV-GDNF se muestra en la Figura 3.

Ejemplo 1.4. Construcción del plásmido pAAV-GDNF-IL-10

El promotor CAG (potenciador de citomegalovirus, promotor de β -actina de pollo y señal de β -globina poli A de conejo) se sometió a amplificación por PCR mediante el uso de pAxCawtit2 contenido en el kit de expresión de adenovirus dual (Takara), y se trató con ApaI y XbaI para mejorar la expresión, se retiró de esta manera aproximadamente el 80 % de la región de β -actina de pollo en el promotor CAG para producir un promotor CAG corto (sCAG) (Fagoe, Gene Ther, 2014). En cuanto al gen de la IL-10 humana, el gen que codifica la SEQ ID NO: 14 se diseñó mediante la optimización de codones del gen que codifica la SEQ ID NO: 9 para ser adecuado para humanos, y se remitió a Bioneer para la síntesis de genes. A continuación, se obtuvo el fragmento de ADN poli A para la hormona de crecimiento bovina (bGH) mediante amplificación por PCR. El pVAX1/sCAG-hIL-10-bGHpA se construyó mediante el uso de pVAX1 (Invitrogen) para contener el promotor y poli A y los genes de IL-10 humana.

A continuación, se preparó pVAX1/CMV-hGDNF-SV40pA mediante el mismo método que en el Ejemplo 1.1., mediante el uso del gen GDNF humano del Ejemplo 1.3. Posteriormente, el casete génico de SV40pA-hGDNF-CMV se amplificó mediante la realización de una PCR mediante el uso de pVAX1/CMV-hGDNF-SV40pA como molde, y se preparó un fragmento de ADN de 1,5 kb. Las secuencias de cebadores que se usaron para la amplificación del casete génico son las siguientes:

SV40-CMV-sCAG-bGHpA-Infu-F (SEQ ID NO: 27):
5'-CCTGCGGCCGGTCTCGACTACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGC-3'
SV40-CMV-sCAG-bGHpA-Infu-R (SEQ ID NO: 28):
5'-AATAATCAATGTCGACTCGAGGAGCTTGGCCATT-3'

A continuación, se trató pVAX1/sCAG-hIL-10-bGHpA con Sall para preparar un fragmento de ADN de aproximadamente 3,9 kb, y el fragmento de ADN de 1,5 kb que se describió anteriormente se insertó en el fragmento de ADN de 3,9 kb mediante el uso de un kit de clonación In-Fusion HD (Clontech) para construir pVAX1/SV40pA-

hGDNF-CMV-sCAG-hIL-10-bGHpA (que en lo adelante se abrevia como "pAAV-GDNF-IL-10"). El plásmido pAAV-GDNF-IL-10 se muestra esquemáticamente en la Figura 4.

5 Ejemplo Experimental 1. Confirmación de la expresión de los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, pAAV-GDNF y pAAV-GDNF-IL-10

10 Los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, pAAV-GDNF o pAAV-GDNF-IL-10 que se prepararon en los Ejemplos 1.1. a 1.4. se transfectaron respectivamente en células de la línea celular embrionaria de riñón humano 293T mediante el uso de jetPRIME (Polyplus). Las células transfectadas se cultivaron en una incubadora a 37 °C durante 48 horas. Posteriormente, se recolectaron el medio de cultivo celular o las células que se cultivaron. Las células se disolvieron con un solvente y las muestras que se prepararon se trataron con cada uno de los anticuerpos contra GAD65 (Merck Millipore), IL-10 (Santa Cruz) y GDNF (R&D systems) y se sometieron a transferencia Western.

15 Específicamente, en el caso de pAAV-GAD65, las células de la línea celular embrionaria de riñón humano 293T se trataron con 2 µg de plásmido pAAV-GAD65 y se cultivaron durante 48 horas. Posteriormente, las células que se cultivaron se disolvieron y la expresión de GAD65 en las células se confirmó a través de transferencia Western.

20 En el caso de los plásmidos pAAV-IL-10 y pAAV-GDNF, células de la línea celular embrionaria de riñón humano 293T se trataron con 1 µg de plásmido pAAV-IL-10 o pAAV-GDNF y se cultivaron durante 48 horas. Posteriormente, se recolectó el medio de cultivo y se confirmó la expresión de IL-10 o GDNF en el medio a través de transferencia Western.

25 En el caso del plásmido pAAV-GDNF-IL-10, las células de la línea celular embrionaria de riñón humano 293T se trataron con 1 µg del plásmido pAAV-GDNF-IL-10 y se cultivaron durante 48 horas. Posteriormente, las células que se cultivaron se disolvieron y la expresión intracelular de IL-10 y de GDNF se confirmó a través de transferencia Western.

30 Como resultado, se confirmó que se expresaba el plásmido pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, pAAV-GDNF o pAAV-GDNF-IL-10 que se transfectó (Figs. 5 y 6).

30 Ejemplo 2. Preparación del virus adenoasociado recombinante

35 El virus AAV-IL-10 que se usó en el experimento se produjo y purificó en Vector core de UNC. El método de producción es el siguiente. El pVax-rIL-10, pHelper y pRC5 se transfectaron en células de la línea celular embrionaria de riñón humano 293T. Posteriormente, el resultante se sometió a purificación mediante cromatografía en columna para asegurar el virus AAV5-IL-10. El título del virus que se produjo se midió mediante el uso de qPCR.

40 Los virus AAV-GAD65 y AAV-GDNF se produjeron y purificaron mediante KRcrogen. El método de producción es el siguiente. Los transgenes del AAV (plásmidos pAAV-GAD65 y pAAV-GDNF) se transfectaron respectivamente en las células de la línea celular embrionaria de riñón humano 293T mediante el uso del método de fosfato de calcio junto con pHelper y pRC. En el caso de GAD65, se usó pRC5 que se introdujo con el gen de la cápside del serotipo 5. En el caso de GDNF, se usó pRC1 que se introdujo con el gen de la cápside del serotipo 1 del AAV. Las células que se transfectaron se cultivaron en una incubadora a 37 °C y las células se recolectaron después de 48 horas.

45 Posteriormente, solo las bandas que contenían virus se aislaron y purificaron a través del método de centrifugación de ultra alta velocidad de acuerdo con el gradiente de concentración de cesio, para asegurar los virus AAV5-GAD65 y AAV1-GDNF. Los títulos de los virus que se produjeron se midieron mediante el uso de qPCR.

50 El virus AAV-GDNF-IL-10 se produjo y purificó mediante Cdmogen. El método de producción es el siguiente. El transgén de AAV (plásmido pAAV-GDNF-IL-10) se transfectó en células de la línea celular embrionaria de riñón humano 293T mediante el uso del método de fosfato de calcio junto con pHelper y pRC5. Las células que se transfectaron se cultivaron en una incubadora a 37 °C y las células se recolectaron después de 48 horas.

55 Posteriormente, solo las bandas que contenían virus se aislaron y purificaron a través de centrifugación a ultra alta velocidad de acuerdo con el gradiente de concentración de cesio, para asegurar el virus AAV5-GDNF-IL-10. El título del virus que se produjo se midió mediante el uso de qPCR.

60 El virus AAV-GAD65-modi se produjo y purificó mediante Cdmogen. El método de producción es el siguiente. El transgén de AAV (plásmido pAAV-hGAD65-modi) se transfectó en células de la línea celular embrionaria de riñón humano 293T mediante el uso del método de fosfato de calcio junto con pHelper y pRC5. Las células que se transfectaron se cultivaron en una incubadora a 37 °C y las células se recolectaron después de 48 horas.

65 Posteriormente, solo las bandas que contenían virus se aislaron y purificaron mediante centrifugación de ultra alta velocidad de acuerdo con el gradiente de concentración de cesio para asegurar el virus AAV5-GAD65-modi. El título del virus que se produjo se midió mediante el uso de qPCR.

Ejemplo Experimental 2. Análisis de las propiedades del virus adenoasociado recombinante

Con el fin de examinar la expresión de proteína del virus adenoasociado recombinante que se suministró a una célula, la línea celular embrionaria de riñón humano 293T o células HeLa se trataron con los virus AAV-GAD65, AAV-GAD65-modi, AAV-IL-10 o AAV-GDNF que se obtuvieron anteriormente, y la expresión de proteína se examinó mediante transferencia Western. Específicamente, se sembraron células 293T o HeLa a 5×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos. Y al día siguiente, las células se trataron respectivamente con 3 tipos de virus a 10.000 vg/pocillo y luego se cultivaron en una incubadora a 37 °C. Después de 48 horas, las células se recolectaron y se disolvieron con un solvente y el medio de cultivo se concentró mediante el uso del amicon (Merck Millipore). Luego, las muestras que se prepararon se trataron respectivamente con los anticuerpos contra GAD65 (Cell signaling), IL-10 (Santa Cruz) y GDNF (R&D systems) y se sometieron a transferencia Western.

Como resultado, se confirmó que cada proteína diana se expresó en el lisado celular de la línea celular embrionaria de riñón humano 293T o la línea celular HeLa que se trató con el virus AAV-GAD65, AAV-GAD65-modi, AAV-IL-10 o AAV-GDNF (Figura 7). Por lo tanto, se confirmó que no había anomalía en las estructuras y propiedades de los virus adenoasociados recombinantes que se usaron en el experimento.

También, para confirmar que GABA se produce por el virus AAV-GAD65 o AAV-GAD65-modi, el medio de cultivo de las células que se trataron con el virus AAV-GAD65 o AAV-GAD65-modi se recolectó y se sometió a análisis GABA ELISA (LDN). Para cada grupo experimental, se prepararon por separado dos muestras idénticas para realizar el análisis, y el gráfico de barras muestra el valor de cada muestra.

Como resultado, se confirmó que GABA se secretó al medio de cultivo por el GAD65 que se introdujo en las células por el virus AAV-GAD65 o el AAV-GAD65-modi (Figura 8).

Ejemplo Experimental 3. Comparación de las eficacias analgésicas entre la administración individual de los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 o AAV-GDNF y la coadministración de los virus AAV-GAD65 y AAV-GDNF, o los virus AAV-IL-10 y AAV-GDNF

Ejemplo Experimental 3.1. Preparación de muestra de administración

Los virus que se prepararon en el Ejemplo 2 se usaron para la prueba. 30 minutos antes del experimento de administración animal, los reactivos que se almacenaron a -80 °C se descongelaron a temperatura ambiente y se prepararon mediante la mezcla mediante un agitador vorticial. Los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10, AAV-GDNF y AAV-GFP se diluyeron en PBS para obtener los títulos que se muestran en la Tabla 1. El virus AAV-GFP se administró en la misma cantidad que otros virus adenoasociados recombinantes. La GFP es una proteína que no tiene eficacia analgésica. Los virus que se requirieron se mezclaron de acuerdo con los contenidos que se indican en la Tabla 1, y se administraron en una cantidad de $9,0 \times 10^8$ vg/5 µl por animal (vg: genoma del virus).

[Tabla 1]

Muestras	Tipos de virus y contenidos			
	AAV-GAD65	AAV-IL-10	AAV-GDNF	AAV-GFP
AAV-GFP	-	-	-	$9,0 \times 10^8$ vg/5 µl
AAV-GAD65	$9,0 \times 10^8$	-	-	-
	vg/5 µl			
AAV-IL-10	-	$9,0 \times 10^8$ vg/5 µl	-	-
AAV-GDNF	-	-	$9,0 \times 10^8$ vg/5 µl	-
AAV-GAD65 + AAV-GDNF	$4,5 \times 10^8$ vg/5 µl	-	$4,5 \times 10^8$ vg/5 µl	-
AAV-IL-10 + AAV-GDNF	-	$4,5 \times 10^8$ vg/2,5 µl	$4,5 \times 10^8$ vg/2,5 µl	-

Ejemplo Experimental 3.2. Construcción de ratas con dolor neuropático inducido y administración de muestras

Se sometieron ratas SD machos de 150 a 200 g a anestesia por inhalación. Y luego se hizo una incisión en la parte superior de la pantorrilla y se ataron ambos extremos del nervio peroneo común y del nervio tibial y se hicieron nudos a intervalos de 0,5 a 1 cm mediante sutura 7-0. Las regiones entre los nudos de los dos haces nerviosos se cortaron con una tijera y se suturó el sitio de la incisión. Posteriormente, las ratas se recuperaron para despertarlas de la anestesia y devolverlas a la jaula. Dos semanas después, se realizó una prueba de filamento Von Frey para examinar la inducción del dolor, y luego se administraron respectivamente las muestras que se prepararon en el Ejemplo 2.1 (Decosterd, Pain, 2000).

Las muestras se administraron mediante el método de inyección epidural transforaminal en una locación adyacente al ganglio de la raíz dorsal (GRD). La rata con dolor inducido se sometió a anestesia por inhalación, y las vértebras se expusieron mediante una incisión lineal en el lomo de la rata a los niveles de las vértebras lumbares L3 a L5. Al lateral del espacio que se expuso, se hizo visible el proceso transversal L4, una de las proyecciones espinales. La rata se acostó de lado de manera que su lateral fue visible desde arriba y el foramen intervertebral L4 fue visible.

Posteriormente, se insertó una aguja unida al catéter en la muestra preparada y se conectó una jeringa Hamilton al extremo opuesto del catéter y se tiró hasta la línea de marcado de 5 µl para inyectar la muestra en el catéter. Se retiró la jeringa Hamilton del catéter y luego se aseguró el catéter al sujetar la punta a 1 cm de la punta de la aguja mediante el uso de Halsted-Mosquito. Luego, mientras se sujetaba y tiraba de la vértebra L4 hacia arriba con unas pinzas, la punta de la aguja que se aseguró mediante Halstead Mosquito se tomó alrededor del foramen intervertebral L4 con la otra mano. La punta de la aguja se insertó en la región doblada en el interior del foramen intervertebral cuyo espacio se aseguró. Luego, se soltó la aguja que estaba sujeta.

Después de confirmar que la aguja estaba fija, se conectó una jeringa de 1 mL al catéter que se conectó al sitio opuesto de la aguja. Mediante presionar gentilmente el pistón de la jeringa, la muestra se inyectó lentamente alrededor del ganglio de la raíz dorsal de la rata. Posteriormente, se suturó el sitio de la incisión. 4 semanas después de la administración de la muestra, se observaron respuestas al dolor mediante el uso de la prueba de filamento von Frey. Ejemplo Experimental 3.3. Observación del dolor mediante el uso de la prueba de filamento Von Frey

El dolor se observó mediante el uso de la prueba de filamento Von Frey. El método es calcular el valor umbral de acuerdo con un patrón predeterminado de respuesta al dolor con un total de ocho filamentos de 0,4, 0,6, 1, 2, 4, 6, 8 y 15 g.

Las regiones que generan el dolor se buscaron mediante el cambio de la posición desde la porción inicial del dedo más exterior hasta el talón de la suela donde se genera el dolor. Ya que las ratas se quitaron repentinamente las suelas y encogieron o lamieron sus suelas con la boca cuando se generó dolor, pudieron encontrarse las regiones que generan dolor. Si habían reacciones tres veces o más cuando el área circundante se pinchaba cinco veces con el filamento de cada etapa, se consideraba una respuesta de dolor. Y se procedió a la prueba mediante el reemplazo del filamento con el de la siguiente etapa. De esta manera, se registró el patrón de cada etapa.

Los patrones de dolor se registraron en base a la tabla de patrones que se estableció por S.R. Chaplan, y los valores de umbral se calcularon mediante el uso de los patrones de dolor (Chaplan, J Neurosci Methods, 1994). En cuanto al análisis del comportamiento, los grupos de animales se cegaron en un momento específico y al menos 3 investigadores observaron, y los resultados de los patrones que se registraron se procesaron estadísticamente para analizar los resultados del dolor.

Como resultado, se encontró que el efecto de alivio del dolor fue más alto cuando se combinaron y coadministraron los virus AAV-GAD65 y AAV-GDNF, o AAV-IL-10 y AAV-GDNF, en comparación con la administración individual de los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 o AAV-GDNF (Figura 9).

Ejemplo Experimental 4. Comparación de las eficacias analgésicas entre la administración individual de los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 o AAV-GDNF y la coadministración de los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 y AAV-GDNF

Los virus que se prepararon en el Ejemplo 2 se usaron para la prueba. 30 minutos antes del experimento de administración animal, los reactivos que se almacenaron a -80 °C se descongelaron a temperatura ambiente y se prepararon mediante la mezcla mediante un agitador vorticial. Los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10, AAV-GDNF y AAV-GFP se diluyeron en PBS para obtener los títulos que se muestran en la Tabla 2. El virus AAV-GFP se administró en la misma cantidad que otros virus adenoasociados recombinantes. La GFP es una proteína cuya eficacia analgésica no ha sido informada. Los virus se mezclaron de acuerdo con los contenidos que se muestran en la Tabla 2, y se administraron en una cantidad de $9,0 \times 10^8$ vg/5 µl por animal.

[Tabla 2]

Muestras	Tipos de virus y contenidos			
	AAV-GAD65	AAV-IL-10	AAV-GDNF	AAV-GFP
AAV-GFP	-	-	-	$9,0 \times 10^8$ vg/5 µl
AAV-GAD65	$9,0 \times 10^8$ vg/5 µl	-	-	-

(continuación)

Muestras	Tipos de virus y contenidos			
	AAV-GAD65	AAV-IL-10	AAV-GDNF	AAV-GFP
AAV-IL-10	-	$9,0 \times 10^8$ vg/5 μ l	-	-
AAV-GDNF	-	-	$9,0 \times 10^8$ vg/5 μ l	-
AAV-GAD65 + AAV-IL-10 + AAV-GDNF	$3,0 \times 10^8$ vg/5 μ l	$3,0 \times 10^8$ vg/5 μ l	$3,0 \times 10^8$ vg/5 μ l	-

Al modelo animal con dolor que se produjo mediante el mismo método que en el Ejemplo Experimental 3.2., se administraron muestras que se prepararon de acuerdo con los contenidos de virus que se muestran en la Tabla 2. Posteriormente, la prueba de filamento Von Frey se realizó mediante el mismo método que en el Ejemplo Experimental 3.3. para observar las respuestas al dolor.

Como resultado, se encontró que el efecto de alivio del dolor fue más alto cuando se coadministraron todos los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 y AAV-GDNF en comparación con la administración individual de los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 o AAV-GDNF (Figura 10).

Ejemplo Experimental 5. Comparación de las eficacias analgésicas entre la coadministración de los virus AAV-GAD65 y AAV-GDNF o AAV-IL-10 y AAV-GDNF y la coadministración de los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 y AAV-GDNF

Los virus adenoasociados que se prepararon en el Ejemplo 2 se usaron para la prueba. 30 minutos antes del experimento de administración animal, los reactivos que se almacenaron a -80 °C se descongelaron a temperatura ambiente y se prepararon mediante la mezcla mediante un agitador vorticial. Los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10, AAV-GDNF y AAV-GFP se diluyeron en PBS para obtener los títulos que se muestran en la Tabla 3. El AAV-GFP se administró en la misma cantidad que otros virus adenoasociados recombinantes. La GFP es una proteína que no tiene eficacia analgésica. Los virus que se requirieron se mezclaron de acuerdo con los contenidos que se muestran en la Tabla 3 y se administraron en una cantidad de $9,0 \times 10^8$ vg/5 μ l por animal.

[Tabla 3]

Muestras	Tipos de virus y contenidos			
	AAV-GAD65	AAV-IL-10	AAV-GDNF	AAV-GFP
AAV-GFP	-	-	-	$9,0 \times 10^8$ vg/5 μ l
AAV-GAD65 + AAV-GDNF	$4,5 \times 10^8$ vg/5 μ l	-	$4,5 \times 10^8$ vg/5 μ l	-
AAV-IL-10 + AAV-GDNF	-	$4,5 \times 10^8$ vg/5 μ l	$4,5 \times 10^8$ vg/5 μ l	-
AAV-GAD65 + AAV-IL-10 + AAV-GDNF	$3,0 \times 10^8$ vg/5 μ l	$3,0 \times 10^8$ vg/5 μ l	$3,0 \times 10^8$ vg/5 μ l	-

Al modelo animal con dolor que se produjo mediante el mismo método que en el Ejemplo Experimental 3.2., se administraron muestras que se prepararon de acuerdo con los contenidos de virus que se muestran en la Tabla 3. Posteriormente, la prueba de filamento Von Frey se realizó mediante el mismo método que en el Ejemplo Experimental 3.3. para observar las respuestas al dolor.

Como resultado, se encontró que el efecto de alivio del dolor fue más alto cuando se coadministraron todos los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 y AAV-GDNF en comparación con la coadministración de los virus AAV-GAD65 y AAV-GDNF, o AAV-IL-10 y AAV-GDNF (Figura 11).

Ejemplo Experimental 6. Comparación de las eficacias analgésicas entre la administración individual de los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, o pAAV-GDNF y la coadministración de los plásmidos pAAV-GAD65 y pAAV-GDNF, o pAAV-IL-10 y pAAV-GDNF

Ejemplo Experimental 6.1. Preparación de muestras de administración

Los plásmidos que se prepararon en el Ejemplo 1 se usaron para la prueba. 30 minutos antes del experimento de administración animal, los reactivos que se almacenaron a -80 °C se descongelaron a temperatura ambiente y se prepararon mediante la mezcla mediante un agitador vorticial. Los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, pAAV-GDNF y pVAX1 se diluyeron en el tampón Tris-EDTA para obtener las concentraciones que se muestran en la Tabla 4. El plásmido pVAX1 se administró en la misma cantidad que los otros plásmidos. No se ha informado que el plásmido pVAX1 tiene una eficacia analgésica. Los plásmidos que se requirieron se mezclaron de acuerdo con los contenidos que se muestran en la Tabla 4 y se administraron en una cantidad de 30 μ g/50 μ l por animal.

[Tabla 4]

Muestras	Tipos de plasma y contenidos			
	pAAV-GAD65	pAAV-IL-10	pAAV-GDNF	pVAX1
pVAX1	-	-	-	30 µg/50 µl
pAAV-GAD65	30 µg/50 µl	-	-	-
pAAV-IL-10	-	30 µg/50 µl	-	-
pAAV-GDNF	-	-	30 µg/50 µl	-
pAAV-GAD65 + pAAV-GDNF	15 µg/50 µl	-	15 µg/50 µl	-
pAAV-IL-10 + pAAV-GDNF	-	15 µg/50 µl	15 µg/50 µl	-

Ejemplo Experimental 6.2. Construcción del modelo animal con dolor neuropático y administración de muestra.

Se sometieron ratas SD machos de 150 a 200 g a anestesia por inhalación. Y luego se hizo una incisión en la parte superior de la pantorrilla y se ataron ambos extremos del nervio peroneo común y del nervio tibial y se hicieron nudos a intervalos de 0,5 a 1 cm mediante sutura 7-0. Las regiones entre los nudos de los dos haces nerviosos se cortaron con una tijera y se suturó el sitio de la incisión. Posteriormente, las ratas se recuperaron para despertarlas de la anestesia y devolverlas a la jaula. Dos semanas después, se realizó la prueba de filamento Von Frey para examinar la inducción del dolor, y luego se administraron las muestras que se prepararon en el Ejemplo 6.1 (Decosterd, Pain, 2000).

Las muestras se administraron mediante el método de inyección intratecal. La rata con dolor inducido se sometió a anestesia por inhalación, y el proceso espinoso se expuso mediante una incisión lineal en el lomo de la rata en la región de la vértebra lumbar L5. Se colocó un tubo de 50 mL debajo de la rata para ampliar el espacio entre L5 y L6, y se insertó una aguja de tamaño 27 G × 13 mm. Posteriormente, se conectó a la aguja una jeringa de 1 mL que se llenó con 50 µl de la muestra. La muestra se inyectó lentamente mediante la presión ligera del pistón de la jeringa. Posteriormente, se suturó la incisión y se terminó esta etapa. Un día después de la administración de la sustancia, se observaron las respuestas al dolor mediante el uso de la prueba de filamento von Frey.

Ejemplo Experimental 6.3. Observación del dolor mediante el uso de la prueba de filamento Von Frey

La prueba de filamento Von Frey se llevó a cabo mediante el mismo método que en el Ejemplo Experimental 3.3. Como resultado, se encontró que el efecto de alivio del dolor fue más alto cuando los plásmidos pAAV-GAD65 y pAAV-GDNF, o pAAV-IL-10 y pAAV-GDNF se coadministraron en comparación con la administración individual de los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10 o pAAV-GDNF (Figura 12).

Ejemplo Experimental 7. Comparación de las eficacias analgésicas entre la administración individual de los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, o pAAV-GDNF y la coadministración de los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10 y pAAV-GDNF

Los plásmidos que se prepararon en el Ejemplo 1 se usaron para la prueba. 30 minutos antes del experimento de administración animal, los reactivos que se almacenaron a -80 °C se descongelaron a temperatura ambiente y se prepararon mediante la mezcla mediante un agitador vortical. Los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, pAAV-GDNF y pVAX1 se diluyeron en el tampón Tris-EDTA para obtener las concentraciones que se muestran en la Tabla 5. El plásmido pVAX1 se administró en la misma cantidad que los otros plásmidos. No se ha informado que el plásmido pVAX1 tiene una eficacia analgésica. Los plásmidos que se requirieron se mezclaron de acuerdo con los contenidos que se muestran en la Tabla 5 y se administraron en una cantidad de 30 µg/50 µl por animal.

[Tabla 5]

Muestras	Tipos de plasma y contenidos			
	pAAV-GAD65	pAAV-IL-10	pAAV-GDNF	pVAX1
pAAV-VAX1	-	-	-	30 µg/50 µl
pAAV-GAD65	30 µg/50 µl	-	-	-

(continuación)

Muestras	Tipos de plasma y contenidos			
	pAAV-GAD65	pAAV-IL-10	pAAV-GDNF	pVAX1
pAAV-IL-10	-	30 µg/50 µl	-	-
pAAV-GDNF	-	-	30 µg/50 µl	-
pAAV-GAD65 + pAAV-IL-10 + pAAV-GDNF	10 µg/50 µl	10 µg/50 µl	10 µg/50 µl	-

Al modelo animal con dolor que se produjo mediante el mismo método que en el Ejemplo Experimental 6.2., se administraron muestras que se prepararon de acuerdo con los contenidos de virus que se muestran en la Tabla 5. Posteriormente, la prueba de filamento Von Frey se realizó mediante el mismo método que en el Ejemplo Experimental 3.3. para observar las respuestas al dolor.

Como resultado, se encontró que el efecto de alivio del dolor fue más alto cuando se coadministraron todos los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10 y pAAV-GDNF en comparación con la administración individual de los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10 o pAAV-GDNF (Figura 13).

Ejemplo Experimental 8. Comparación de las eficacias analgésicas entre la coadministración de plásmidos pAAV-GAD65 y pAAV-GDNF, o pAAV-IL-10 y pAAV-GDNF y la coadministración de los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10 y pAAV-GDNF

Los plásmidos que se prepararon en el Ejemplo 1 se usaron para la prueba. 30 minutos antes del experimento de administración animal, los reactivos que se almacenaron a -80 °C se descongelaron a temperatura ambiente y se prepararon mediante la mezcla mediante un agitador vorticial. Los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10, pAAV-GDNF y pVAX1 se diluyeron en el tampón Tris-EDTA para obtener las concentraciones que se muestran en la Tabla 6. El plásmido pVAX1 se administró en la misma concentración y cantidad que los otros plásmidos. No se ha informado que el plásmido pVAX1 tiene una eficacia analgésica. Los plásmidos que se requirieron se mezclaron de acuerdo con los contenidos que se muestran en la Tabla 6 y se administraron en una cantidad de 30 µg/50 µl por animal.

[Tabla 6]

Muestras	Tipos de plasma y contenidos			
	pAAV-GAD65	pAAV-IL-10	pAAV-GDNF	pVAX1
pVAX1	-	-	-	30 µg/50 µl
pAAV-GAD65 + pAAV-GDNF	15 µg/50 µl	-	15 µg/50 µl	-
pAAV-IL-10 + pAAV-GDNF	-	15 µg/50 µl	15 µg/50 µl	-
pAAV-GAD65 + pAAV-IL-10 + pAAV-GDNF	10 µg/50 µl	10 µg/50 µl	10 µg/50 µl	-

Al modelo animal con dolor que se produjo mediante el mismo método que en el Ejemplo Experimental 6.2., se administraron muestras que se prepararon de acuerdo con los contenidos de plasma que se muestran en la Tabla 6. Posteriormente, la prueba de filamento Von Frey se realizó mediante el mismo método que en el Ejemplo Experimental 6.3. para observar las respuestas al dolor.

Como resultado, se encontró que el efecto de alivio del dolor fue más alto cuando se coadministraron todos los plásmidos pAAV-GAD65, pAAV-IL-10 y pAAV-GDNF en comparación con la coadministración de los plásmidos pAAV-GAD65 y pAAV-GDNF o pAAV-IL-10 y pAAV-GDNF (Figura 14).

Ejemplo Experimental 9. Comparación de las eficacias analgésicas de la coadministración de los virus AAV-GAD65-modi y AAV-GDNF-IL-10 y la coadministración de los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 y AAV-GDNF

Los virus adenoasociados que se prepararon en el Ejemplo 2 se usaron para la prueba. 30 minutos antes del experimento de administración animal, los reactivos que se almacenaron a -80 °C se descongelaron a temperatura ambiente y se prepararon mediante la mezcla mediante un agitador vorticial. Los virus AAV-GAD65-modi, AAV-GDNF-IL-10, AAV-GAD65, AAV-IL-10 y AAV-GDNF se diluyeron en PBS para obtener los títulos que se muestran en la Tabla 7. Los virus que se requirieron se mezclaron de acuerdo con los contenidos que se muestran en la Tabla 7 y se administraron en una cantidad de $1,0 \times 10^9$ vg/5 µl o $1,5 \times 10^9$ vg/5 µl por animal.

ES 2 905 227 T3

[Tabla 7]

Muestras	Tipos de virus y contenidos				
	AAV-GAD65-modi	AAV-GDNF-IL-10	AAV-GAD65	AAV-IL-10	AAV-GDNF
5 Control	-	-	-	-	-
10 AAV-GAD65-modi + AAV-GDNF-IL-10	5,0 × 10 ⁸ vg/5 µl	5,0 × 10 ⁸ vg/5 µl	-	-	-
10 AAV-GAD65 + AAV-IL-10 + AAV-GDNF	-	-	5,0 × 10 ⁸ vg/5 µl	5,0 × 10 ⁸ vg/5 µl	5,0 × 10 ⁸ vg/5 µl

Al modelo animal con dolor que se produjo mediante el mismo método que en el Ejemplo Experimental 3.2., se administraron muestras que se prepararon de acuerdo con los contenidos de virus que se muestran en la Tabla 7. Posteriormente, la prueba de filamento Von Frey se realizó mediante el mismo método que en el Ejemplo Experimental 3.3. para observar las respuestas al dolor.

Como resultado, se encontró que el efecto de alivio del dolor fue más alto cuando se coadministraron los virus AAV-GAD65-modi y AAV-GDNF-IL-10 en comparación con la coadministración de todos los virus AAV-GAD65, AAV-IL-10 y AAV-GDNF (Figura 15).

<110> KOLON LIFE SCIENCE, INC.

<120> COMPOSICIÓN PARA ALIVIAR O TRATAR EL DOLOR

<130> PCB706093KLS/PCT

<150> KR 2016/0143519

<151> 2016-10-31

<160> 49

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 905 227 T3

	Met	Ala	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Phe	Trp	Ser	Phe	Gly	Ser	Glu	Asp	Gly
	1				5					10					15	
5	Ser	Gly	Asp	Ser	Glu	Asn	Pro	Gly	Thr	Ala	Arg	Ala	Trp	Cys	Gln	Val
				20					25					30		
	Ala	Gln	Lys	Phe	Thr	Gly	Gly	Ile	Gly	Asn	Lys	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu
			35					40					45			
10	Tyr	Gly	Asp	Ala	Glu	Lys	Pro	Ala	Glu	Ser	Gly	Gly	Ser	Gln	Pro	Pro
		50					55					60				
	Arg	Ala	Ala	Ala	Arg	Lys	Ala	Ala	Cys	Ala	Cys	Asp	Gln	Lys	Pro	Cys
	65					70					75					80
15	Ser	Cys	Ser	Lys	Val	Asp	Val	Asn	Tyr	Ala	Phe	Leu	His	Ala	Thr	Asp
					85					90						95
	Leu	Leu	Pro	Ala	Cys	Asp	Gly	Glu	Arg	Pro	Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Gln
				100					105					110		
20	Asp	Val	Met	Asn	Ile	Leu	Leu	Gln	Tyr	Val	Val	Lys	Ser	Phe	Asp	Arg
			115					120					125			
	Ser	Thr	Lys	Val	Ile	Asp	Phe	His	Tyr	Pro	Asn	Glu	Leu	Leu	Gln	Glu
		130					135					140				
25	Tyr	Asn	Trp	Glu	Leu	Ala	Asp	Gln	Pro	Gln	Asn	Leu	Glu	Glu	Ile	Leu
	145					150					155					160
	Met	His	Cys	Gln	Thr	Thr	Leu	Lys	Tyr	Ala	Ile	Lys	Thr	Gly	His	Pro
					165					170					175	
30	Arg	Tyr	Phe	Asn	Gln	Leu	Ser	Thr	Gly	Leu	Asp	Met	Val	Gly	Leu	Ala
				180					185					190		
	Ala	Asp	Trp	Leu	Thr	Ser	Thr	Ala	Asn	Thr	Asn	Met	Phe	Thr	Tyr	Glu
			195					200					205			
35	Ile	Ala	Pro	Val	Phe	Val	Leu	Leu	Glu	Tyr	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Met
		210					215					220				
40	Arg	Glu	Ile	Ile	Gly	Trp	Pro	Gly	Gly	Ser	Gly	Asp	Gly	Ile	Phe	Ser
	225					230					235					240

ES 2 905 227 T3

	gcggccgccc gcacttcccg cctctggctc gcccgaggac gcgctggcac gcctcccacc	60
	ccctcactct gactccagct ggcgtgcatg gtctgcctcg catcctcacg actcagctcc	120
5	ctccctctct cgtgtttttt tctccgccc cccctcatt catccccact gggctccctt	180
	tccctcaaat gctctggggc tctccgccc tctctgagtc cgggctccga ggacccttag	240
	gtagtcccgg tctcttttaa agctccccgg cttccaaagg gttgccacgt ccctaaacc	300
10	tgtctccagc tcgcatacac acacgcacag acacgcacgt tttctgttcc tgcgtgacac	360
	ccgccctcgc cgctcggccc cgcgggtccc cgcgcgggtgc cctcctcccg ccacacgggc	420
	acgcacgcgc gcgcagggcc aagcccgagg cagctcgcgc gcagctcgca ctgcgaggcg	480
15	acctgctcca gtctccaaag ccgatggcat ctccgggctc tggcttttgg tctttcgggt	540
	cggaagatgg ctctggggat tccgagaatc ccggcacagc gcgagcctgg tgccaagtgg	600
20	ctcagaagtt cacgggccc atcggaaaca aactgtgcgc cctgctctac ggagacgccg	660
	agaagccggc ggagagcggc gggagccaac ccccggggc cgcgccccgg aaggccgct	720
	gcgcctcgca ccagaagccc tgcagctgct ccaaagtgga tgtcaactac gcgtttctcc	780
25	atgcaacaga cctgctgccg gcgtgtgatg gagaaggcc cactttggcg tttctgcaag	840
	atgttatgaa cattttactt cagtatgtgg tgaaaagttt cgatagatca accaaagtga	900
	ttgatttcca ttatcctaata gagcttctcc aagaatataa ttgggaattg gcagaccaac	960
30	cacaaaattt ggaggaaatt ttgatgcatt gccaaacaac tctaaaatat gcaattaa	1020
	cagggcatcc tagatacttc aatcaacttt ctactggttt ggatatggtt ggattagcag	1080
	cagactggct gacatcaaca gcaataacta acatgttcac ctatgaaatt gctccagtat	1140
35	ttgtgctttt ggaatatgtc acactaaaga aaatgagaga aatcattggc tggccagggg	1200
	gctctggcga tgggatattt tctcccggtg gcgccatata taacatgtat gccatgatga	1260
40	tcgcacgctt taagatgttc ccagaagtca aggagaaagg aatggctgct cttcccaggc	1320
	tcattgcctt cacgtctgaa catagtcat tttctctcaa gaaggagct gcagccttag	1380
	ggattggaac agacagcgtg attctgatta aatgtgatga gagaggaaa atgattccat	1440
45	ctgatcttga aagaaggatt cttgaagcca aacagaaagg gtttgttcct ttctctgta	1500
	gtgccacagc tggaaccacc gtgtacggag catttgacc cctcttagct gtcgctgaca	1560

ES 2 905 227 T3

	tttgcaaaaa gtataagatc tggatgcatg tggatgcagc ttgggggtggg ggattactga	1620
	tgtcccgaaa acacaagtgg aaactgagtg gcgtggagag ggccaactct gtgacgtgga	1680
5	atccacacaa gatgatggga gtccctttgc agtgetctgc tctcctggtt agagaagagg	1740
	gattgatgca gaattgcaac caaatgcatg ctcctacct ctttcagcaa gataaacatt	1800
	atgacctgtc ctatgacact ggagacaagg ccttacagtg cggacgccac gttgatgttt	1860
10	ttaaactatg gctgatgtgg agggcaaagg ggactaccgg gtttgaagcg catgttgata	1920
	aatgtttgga gttggcagag tatttataca acatcataaa aaaccgagaa ggatatgaga	1980
	tggtgtttga tgggaagcct cagcacacaa atgtctgctt ctggtacatt cctccaagct	2040
15	tgcgtactct ggaagacaat gaagagagaa tgagtgcct ctcgaagggtg gctccagtga	2100
	ttaaagccag aatgatggag tatggaacca caatggtcag ctaccaaccc ttgggagaca	2160
	aggccaattt cttccgcatg gtcactcaa acccagcggc aactcaccaa gacattgact	2220
20	tcctgattga agaaatagaa cgccttggac aagatttata ataaccttgc tcaccaagct	2280
	gttccacttc tctagagaac atgccctcag ctaagccccc tactgagaaa cttcctttga	2340
25	gaattgtgcg acttcacaaa atgcaaggtg aacaccactt tgtctctgag aacagacgtt	2400
	accaattatg gagtgtcacc agctgccaaa atcgtagggtg ttggctctgc tggtcactgg	2460
	agtagttgct actcttcaga atatggacaa agaaggcaca ggtgtaaata tagtagcagg	2520
30	atgaggaacc tcaaactggg tatcattttg cacgtgctct tctgttctca aatgctaaat	2580
	gcaaacactg tgtattttatt agttaggtgt gccaaactac cgttcccaaa ttggtgtttc	2640
35	tgaatgacat caacattccc ccaacattac tccattacta aagacagaaa aaaataaaaa	2700
	cataaaaatat acaaacatgt ggcaacctgt tcttctacc aaatataaac ttgtgtatga	2760
	tccaagtatt ttatctgtgt tgtctctcta aaccxaaata aatgtgtaa tgtggacaca	2820
40	tctc	2824
	<210> 3	
	<211> 1758	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> GAD65 hhumano optimizado	
50	<400> 3	
	atggcatctc cgggctccgg cttttggtcc ttcgggtcgg aagatggctc aggggattcc	60
	gagaatcccg gcacagcgcg ggcctggtgt caagtggctc agaagttcac gggcggcatc	120
55	ggaaacaaac tgtgtgccct gctctacggc gacgccgaga agcccgcaga gagcggcggg	180
	agccaacccc cgcgggcccg cgcgccgaag gccgcctgcg cctgtgacca gaagccctgc	240

ES 2 905 227 T3

tcatgcagca aggtagatgt caactacgcg tttctccatg ccacagatct gctgccggct 300
 tgcgacgggtg aaaggccac tttggccttt ctgcaggatg ttatgaacat tctgttgcag 360
 5 tacgtgggtga aaagtttcga ccggtcaacc aaagtgatcg actttcacta tcctaatagaa 420
 cttctccagg agtacaattg ggagctggct gaccagccac agaacctgga ggaaatcttg 480
 atgcattgcc aaactactct aaaatatgca attaaaacag gccatcctag atacttcaac 540
 10 cagctttcta ccggtttgga tatggtgggg ctggcagccg actggctgac atccaccgca 600
 aataccaaca tgttcaccta tgagatcgct cctgtcttcg tgcttttggga atacgtcacc 660
 ctaaagaaga tgcgtgaaat cattggctgg ccaggaggct ctggtgatgg tatattttct 720
 15 cccggcggcg cgatctctaa catgtatgcc atgatgatcg cacgctttaa gatgttccca 780
 gaagtcaagg agaaaggaat ggctgctctt cccaggctca ttgccttcac gagtgaacac 840
 agtcactttt ccctcaagaa gggggctgcc gccttaggga tcggaacaga cagcgtgatt 900
 20 ctgataaagt gcgacgagag agggaaaatg attccatctg atcttgagag aaggattctt 960
 gaagccaac agaaagggtt tgtcccttct ctctgagtg ccacagctgg aaccaccgtg 1020
 25 tacggcgcac ttgacccctt cttagctgtc gcgatatat gtaagaagta taagatctgg 1080
 atgcacgtgg atgctgcttg ggggtggggga ttactgatgt ccaggaaaca caagtggaaa 1140
 ctgtctggcg tggagcgcgc caacagcgtg acgtggaatc cacacaaaat gatgggagtc 1200
 30 cctttgcagt gctctgctct cctggttcga gaagaggac tgatgcagaa ttgcaaccaa 1260
 atgcattgct cctacctctt tcagcaggat aacattatg acctgtctta cgacactggt 1320
 gacaaggccc tgcagtgtgg gcgccacggt gatgtattca agctatggct gatgtggagg 1380
 35 gcaaagggga ctaccggttt tgaagcccat gttgacaaat gtctggagtt ggcagagtat 1440
 ttatacaata tcataaaaaa ccgagaagga tatgagatgg tgtttgatgg caagcctcag 1500
 cacacaaatg tctgcttctg gtacatccct cccagcctac gtactctgga ggacaacgaa 1560
 40 gagagaatga gtcgcctctc gaaggtggct ccagtgatta aagccagaat gatggagtat 1620
 ggaaccacaa tggtcagcta ccaacccttg ggggacaagg taaatttctt ccgcatggtc 1680
 45 atctcaaacc cagcggcaac tcaccaagac attgatttcc tgattgaaga gatcgagcgg 1740
 ctcgccagg atctgtga 1758

50 <210> 4
 <211> 594
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 4

Met Ala Ser Ser Thr Pro Ser Ser Ser Ala Thr Ser Ser Asn Ala Gly
 1 5 10 15

Ala Asp Pro Asn Thr Thr Asn Leu Arg Pro Thr Thr Tyr Asp Thr Trp

60

ES 2 905 227 T3

gagatctgct tccggctaag aacggtgagg agcaaaccgt gcaattcctc ctggaagtgg 360
 tggacatact cctcaactat gtccgcaaga catttgatcg ctccaccaag gtgctggact 420
 5 ttcacacccc acaccagttg ctggaaggca tggagggcct caacttgag ctctctgacc 480
 accccgagtc cctggagcag atcctggttg actgcagaga caccttgaag tatggggttc 540
 gcacaggtca tcctcgattt ttcaaccagc tctccactgg attggatatt attggcctag 600
 10 ctggagaatg gctgacatca acggccaata ccaacatggt tacatatgaa attgcaccag 660
 tgtttgcct catggaacaa ataacactta agaagatgag agagatagtt ggatggtcaa 720
 gtaaagatgg tgatgggata ttttctcctg ggggcgcat atccaacatg tacagcatca 780
 15 tggctgctcg ctacaagtac ttcccgaag ttaagacaaa gggcatggcg gctgtgccta 840
 aactggtcct cttcacctca gaacagagtc actattccat aaagaaagct ggggctgcac 900
 20 ttggctttgg aactgacaat gtgattttga taaagtcaa tgaaaggggg aaaataattc 960
 cagctgattt tgaggcaaaa attcctgaag ccaaacagaa gggatatggt cccttttatg 1020
 tcaatgcaac tgctggcacg actgtttatg gagcttttga tccgatacaa gagattgcag 1080
 25 atatagtga gaaatataac ctttggttgc atgtcgatgc tgcctgggga ggtgggctgc 1140
 tcatgtccag gaagcaccgc cataaactca acggcataga aagggccaac tcagtcacct 1200
 ggaaccctca caagatgatg ggcgtgctgt tgcagtgtc tgccattctc gtcaaggaaa 1260
 30 agggataact ccaaggatgc aaccagatgt gtgcaggata cctcttccag ccagacaagc 1320
 agtatgatgt ctctacgac accggggaca aggcaattca gtgtggccgc cacgtggata 1380
 35 tcttcaagtt ctggctgatg tggaaagcaa agggcacagt gggattttaa aaccagatca 1440
 acaaatgcct ggaactggct gaatacctct atgccaagat taaaaacaga gaagaatttg 1500
 agatggtttt caatggcgag cctgagcaca caaacgtctg tttttggtat attccacaaa 1560
 40 gcctcagggg tgtgccagac agccctcaac gacgggaaaa gctacacaag gtggctccaa 1620
 aatcaaagc cctgatgatg gagtcaggta cgaccatggt tggctaccag ccccaagggg 1680
 acaaggccaa cttcttccgg atggtcatct ccaaccagc cgctaccag tctgacattg 1740
 45 acttctcat tgaggagata gaaagactgg gccaggatct gtaa 1784

<210> 6
 <211> 178
 <212> PRT
 50 <213> rattus norvegicus
 <400> 6

55 Met Pro Gly Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Leu Leu Leu Ala Gly Val
 1 5 10 15
 Lys Thr Ser Lys Gly His Ser Ile Arg Gly Asp Asn Asn Cys Thr His
 20 25 30

ES 2 905 227 T3

Phe Pro Val Ser Gln Thr His Met Leu Arg Glu Leu Arg Ala Ala Phe
 35 40 45
 Ser Gln Val Lys Thr Phe Phe Gln Lys Lys Asp Gln Leu Asp Asn Ile
 5 50 55 60
 Leu Leu Thr Asp Ser Leu Leu Gln Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys
 65 70 75 80
 Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Lys Phe Tyr Leu Val Glu Val Met Pro
 10 85 90 95
 Gln Ala Glu Asn His Gly Pro Glu Ile Lys Glu His Leu Asn Ser Leu
 100 105 110
 Gly Glu Lys Leu Lys Thr Leu Trp Ile Gln Leu Arg Arg Cys His Arg
 15 115 120 125
 Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn
 130 135 140
 Asp Phe Asn Lys Leu Gln Asp Lys Gly Val Tyr Lys Ala Met Asn Glu
 20 145 150 155 160
 Phe Asp Ile Phe Ile Asn Cys Ile Glu Ala Tyr Val Thr Leu Lys Met
 165 170 175
 25
 Lys Asn

<210> 7
 <211> 682
 <212> ADN
 <213> rattus norvegicus
 <400> 7

35 catgcctggc tcagcactgc tatgttgctt gctcttactg gctggagtga agaccagcaa 60
 aggccattcc atccggggtg acaataactg caccacttc ccagtcagcc agaccacat 120
 gctccgagag ctgagggctg ccttcagtca agtgaagact ttctttcaaa agaaggacca 180
 40 gctggacaac atactgctga cagattcctt actgcaggac ttaagggtt acttgggttg 240
 ccaagccttg tcagaaatga tcaagtttta cctggtagaa gtgatgcccc aggcagagaa 300
 ccatggccca gaaatcaagg agcatttgaa ttccctggga gagaagctga agaccctctg 360
 45 gatacagctg cgacgctgtc atcgatttct cccctgtgag aataaaagca aggcagtgga 420
 gcaggtgaag aatgatttta ataagctcca agacaaagg gtctacaagg ccatgaatga 480
 50 gtttgacatc tcatcaact gcatagaagc ctacgtgaca ctcaaatga aaaattgaac 540
 caccggcat ctactggact gcaggacata aatagagctt ctaaactga tccagagatc 600
 ttagctaacg ggagcaactc cttggaaaac ctcgtttgta cctctctcca aaatattat 660
 55 tacctctgat acctcagttc cc 682

<210> 8
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> IL-10 de rata optimizado
 65 <400> 8

ES 2 905 227 T3

atgcctggct cagccctgct atgttgctt ctctgctgg cgggagtcaa gacaagcaag 60
 ggccattcca tccggggaga taataactgc acccacttcc cagtctctca aaccacatg 120
 5 ttgcgagagc tgagggctgc cttcagtcag gtgaagacgt tcttccagaa gaaggaccag 180
 ctggacaaca ttctgctgac tgacagcctg ctgcaggatt tcaagggtta tttggggtg 240
 caagccctgt ctgaaatgat caagttttac ctggtagaag tgatgccccca ggcagagaat 300
 10 catggccccg agatcaagga gcacctcaac tcctggggg agaagctgaa gaccctgtgg 360
 attcagctga ggcgctgcca cagatttctc ccctgtgaaa acaagagcaa ggcagtggag 420
 caggtgaaga acgattttaa taagctccag gacaagggcg tctacaaggc catgaacgag 480
 15 ttcgacatct ttatcaactg catagaagct tacgttacac tcaagatgaa gaattga 537

<210> 9
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

25 Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val
 1 5 10 15
 Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His
 20 25 30
 30 Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe
 35 40 45
 Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu
 50 55 60
 35 Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys
 65 70 75 80
 Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro
 85 90 95
 40 Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu
 100 105 110
 Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg
 115 120 125
 45 Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn
 130 135 140
 Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu
 145 150 155 160
 Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile
 165 170 175
 55 Arg Asn

<210> 10
 <211> 1600
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 10

65

ES 2 905 227 T3

aaaccacaag acagacttgc aaaagaaggc atgcacagct cagcactgct ctggtgcctg 60
 gtcctcctga ctgggggtgag ggccagccca ggccagggca cccagtctga gaacagctgc 120
 5 acccacttcc caggcaacct gcctaacatg cttcgagatc tccgagatgc cttcagcaga 180
 gtgaagactt tctttcaaat gaagatcag ctggacaact tgttggttaa ggagtccttg 240
 ctggaggact ttaagggta cctgggttgc caagccttgt ctgagatgat ccagttttac 300
 10 ctggaggagg tgatgcccc aagctgagaac caagaccag acatcaaggc gcatgtgaac 360
 tccctggggg agaacctgaa gaccctcagg ctgaggctac ggcgctgtca tcgatttctt 420
 ccctgtgaaa acaagagcaa ggccgtggag caggtgaaga atgcctttaa taagctccaa 480
 15 gagaaaggca tctacaaagc catgagttag tttgacatct tcatcaacta catagaagcc 540
 tacatgacaa tgaagatagc aaactgagac atcaggggtg cgactctata gactctagga 600
 cataaattag aggtctccaa aatcggatct ggggctctgg gatagctgac ccagcccctt 660
 20 gagaaacctt attgtacctc tcttatagaa tattttattac ctctgatacc tcaacccccca 720
 tttctattta tttactgagc ttctctgtga acgatttaga aagaagccca atattataat 780
 25 ttttttcaat atttattatt ttcacctgtt ttaagctgt ttccataggg tgacacacta 840
 tggatattga gtgttttaag ataaattata agttacataa gggaggaaaa aaaatgttct 900
 ttggggagcc aacagaagct tccattccaa gcctgaccac gctttctagc tgttgagctg 960
 30 ttttccctga cctccctcta atttatcttg tctctgggct tggggcttcc taactgctac 1020
 aaatactctt aggaagagaa accagggagc ccctttgatg attaattcac cttccagtgt 1080
 35 ctcgagggga ttcccctaac ctcatcccc aaccacttca ttcttgaaag ctgtggccag 1140
 cttgttattt ataacaacct aaatttgggt ctaggccggg cgcggtggct cacgcctgta 1200
 atcccagcac tttgggaggc tgaggcgggt ggatcacttg aggtcaggag ttcctaacca 1260
 40 gcctggtcaa catggtgaaa ccccgtctct actaaaaata caaaaattag ccgggcatgg 1320
 tggcgcgcac ctgtaatccc agctacttgg gaggtgagg caagagaatt gcttgaacc 1380
 aggagatgga agttgcagtg agctgatatc atgccctgt actccagcct gggtgacaga 1440
 45 gcaagactct gtctcaaaaa ataaaaataa aaataaattt ggttctaata gaactcagtt 1500
 ttaactagaa tttattcaat tcctctggga atgttacatt gtttgtctgt cttcatagca 1560
 50 gattttaatt ttgaataaat aaatgtatct tattcacatc 1600

<210> 11
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55
 <400> 11

60

65

ES 2 905 227 T3

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr
 1 5 10 15
 Ala Ser Ala Phe Pro Leu Pro Ala Ala Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro
 5 20 25 30
 Asp Gln Phe Asp Asp Val Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg
 35 40 45
 Leu Lys Arg Ser Pro Asp Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu
 10 50 55 60
 Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys
 65 70 75 80
 Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala
 15 85 90 95
 Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu
 100 105 110
 Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr
 115 120 125
 Thr Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val
 130 135 140
 Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp
 145 150 155 160
 Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys
 165 170 175
 His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
 180 185

35 <210> 12
 <211> 558
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 12
 atgaagttat gggatgtcgt ggctgtctgc ctggtgctgc tccacaccgc gtccgccttc 60
 ccgctgcccg ccgcaaatat gccagaggat taccctgatc agttc gatga tgcctggat 120
 45 tttattcaag ccaccattaa aagactgaaa aggtcaccag ataaacaaat ggcagtgcctt 180
 cctagaagag agcggaatcg gcaggctgca gctgccaacc cagagaattc cagaggaaaa 240
 ggtcggagag gccagagggg caaaaaccgg ggttgtgtct taactgcaat acatttaaat 300
 50 gtcactgact tgggtctggg ctatgaaacc aaggaggaac tgatttttag gtactgcagc 360
 ggctcttgcg atgcagctga gacaacgtac gacaaaatat tgaaaaactt atccagaaat 420
 agaaggtgg tgagtgacaa agtagggcag gcatgttgca gaccatcgc ctttgatgat 480
 55 gacctgtcgt ttttagatga taacctgggt taccatattc taagaaagca ttccgctaaa 540
 aggtgtggat gtatctga 558

60 <210> 13
 <211> 558
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> GDNF humano optimizado

ES 2 905 227 T3

	<400> 13	
5	atgaaacttt gggacgtggt ggctgtctgc ctggtgctcc tccacaccgc cagtgcgttt	60
	ccgctgcccg ccgctaacat gccagaggat taccctgatc agttc gatga tgttatggac	120
	ttcattcaag ccacaatcaa ggggtgaaa cgatcaccag ataacagat ggcagtgctt	180
10	cctcgccgcg agcgtaatcg gcaggctgca gcagccaatc ccgagaattc ccgaggaaaa	240
	gggcgcaggg gtcagagggg caagaaccgg ggggtgtgtcc tgactgcaat acatttaaac	300
	gtgactgact tgggtctggg ctatgagacc aaggaagaac tcattttcag gtactgcagc	360
15	ggctcttgcg atgccgcgga aacaacgtac gacaaaatct tgaagaacct ctccagaaac	420
	agaaggtcgg tgagtgacaa ggttagacag gcctgttgca gaccatcgc ctttgacgac	480
20	gatctgagct ttctggatga caatctggtt taccacatcc tacggaagca ttctgctaaa	540
	agatgtggat gtatttga	558
	<210> 14	
25	<211> 537	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> IL-10 humana optimizada	
30	<400> 14	
	atgcacagct cagcactgct gtgctgcctg gtccctgctga caggggtgag ggcaagccca	60
35	ggccagggaa cccaatctga gaacagctgc acccaacttc ctggcaatct gcctaacatg	120
	ctgcgcgacc tccgagatgc cttcagcaga gtgaagactt ttttccagat gaaggatcag	180
	ctggacaacc tgctgctgaa ggagtccctc ctggaggact ttaagggcta cctgggatgc	240
40	caggccctgt ctgagatgat ccaattctac ctggaagaag ttatgccccca ggctgagaac	300
	caggaccag acattaagc ccatgtcaac tccctggggg aaaatctgaa gaccctcagg	360
45	ctgcggctac ggcgctgtca ccgtttctg ccctgtgaga ataagagcaa ggctgtggag	420
	cagggtgaaga acgccttcaa taagctccag gagaagggtg tctacaaagc gatgagtga	480
	tttgatatct tcattaatta tatagaagct tatatgacaa tgaaaatcag aaactga	537
50	<210> 15	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador directo para amplificar el promotor del CMV (F-JDK)	
	<400> 15	
	ttcggccgctc gaggagcttg gccattg 28	
60	<210> 16	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	

ES 2 905 227 T3

<223> Cebador inverso para amplificar el promotor del CMV (R-JDK)

<400> 16
gacgtcgacc tagctagcga attcggggcc gcggag 36

5

<210> 17
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Cebador directo para amplificar el promotor SV40pA (F-SV40pA)

<400> 17
ccatcgatca gacatgataa gatacattga tgag 34

15

<210> 18
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar el promotor SV40pA (R-SV40pA)

<400> 18
gacgtcgacg cggccgctac cacattgta gaggtttac ttg 43

25

<210> 19
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Cebador directo para amplificar el gen de resistencia a la kanamicina (F-Kan)

35

<400> 19
aggcgccatg agccatattc aacgggaa 28

40

<210> 20
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar el gen de resistencia a la kanamicina (R-Kan)

<400> 20
ttcatgatta gaaaaactca tcgagcatc 29

50

<210> 21
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55

<220>
<223> Cebador directo para amplificar LITR y CMV (F-ITR)

<400> 21
atggcgcgcc cctggccttt tgctggcc 28

60

<210> 22
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65

<220>

ES 2 905 227 T3

<223> Cebador inverso para amplificar SV40pA y RITR (R-ITR)

<400> 22
atggatccgc tagtaaatac cgcatcag 28

5

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Cebador directo para amplificar rIL-10 (F-rIL-10)

<400> 23
ccgctagcgc cacatgcct 20

15

<210> 24
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Cebador inverso para amplificar rIL-10 (R-rIL-10)

<400> 24
gacgtcgacg ccatcgatgg ctaataat caattctc 39

25

<210> 25
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Cebador directo para WPRE_Pac1_F

35

<400> 25
ggtggttaa taaaataca cctctggatt aaaaatttg 40

40

<210> 26
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45

<220>
<223> Cebador inverso para WPRE_modi_Hpa1_R

<400> 26
ggtggtgta acgacaacac cacggaattg 30

50

<210> 27
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55

<220>
<223> Cebador directo para SV40-CMV-sCAG-bGHpA-Infu-F

<400> 27
cctgcggccg gtcgactacc acattttag aggtttact tgc 43

60

<210> 28
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65

<220>

ES 2 905 227 T3

<223> Cebador inverso para SV40-CMV-sCAG-bGHpA-Infu-R

<400> 28
aataatcaat gtcgactcga ggagcttggc ccatt 35

5

<210> 29
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> secuencia de nucleótidos de la secuencia rellena aleatoria

<400> 29
gtcgacggta tcgataagct tgatatcgaa ttctgcagc cc 42

15

<210> 30
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Cebador directo para Stuffer_scramble_F

<400> 30
ctagtcgac ggtatcgata agcttgatat cgaattcctg cagccc 46

25

<210> 31
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Cebador inverso para Stuffer_scramble_R

<400> 31
ctaggggctg caggaattcg atatcaagct tatcgatacc gtcgac 46

35

<210> 32
<211> 585
<212> PRT
<213> Canis lupus

40

<400> 32

45

Met	Ala	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Phe	Trp	Ser	Phe	Gly	Ser	Glu	Asp	Gly
1				5					10					15	

50

Ser	Gly	Asp	Pro	Glu	Asn	Pro	Ser	Thr	Ala	Arg	Ala	Trp	Cys	Gln	Val
			20					25					30		

55

Ala	Gln	Lys	Phe	Thr	Gly	Gly	Ile	Gly	Asn	Lys	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu
		35					40					45			

60

Tyr	Gly	Asp	Ala	Glu	Lys	Pro	Ala	Glu	Ser	Gly	Gly	Ser	Glu	Pro	Pro
	50					55					60				

Arg	Ala	Thr	Ser	Arg	Lys	Ala	Ala	Cys	Ala	Cys	Asn	Gln	Lys	Pro	Cys
65					70					75					80

ES 2 905 227 T3

	Ser	Cys	Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Asn	Tyr	Ala	Phe	Leu	His	Ala	Thr	Asp
					85					90					95	
5	Leu	Leu	Pro	Ala	Cys	Asp	Gly	Glu	Arg	Pro	Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Gln
				100					105					110		
	Asp	Val	Met	Asp	Ile	Leu	Leu	Gln	Tyr	Val	Val	Lys	Ser	Phe	Asp	Arg
			115					120					125			
10	Ser	Thr	Lys	Val	Ile	Asp	Phe	His	Tyr	Pro	Asn	Glu	Leu	Leu	Gln	Glu
		130					135					140				
	Tyr	Asn	Trp	Glu	Leu	Ala	Asp	Gln	Pro	Gln	Asn	Leu	Glu	Glu	Ile	Leu
	145					150					155					160
15	Met	His	Cys	Gln	Thr	Thr	Leu	Lys	Tyr	Ala	Ile	Lys	Thr	Gly	His	Pro
				165						170					175	
	Arg	Tyr	Phe	Asn	Gln	Leu	Ser	Thr	Gly	Leu	Asp	Met	Val	Gly	Leu	Ala
				180					185					190		
20	Ala	Asp	Trp	Leu	Thr	Ser	Thr	Ala	Asn	Thr	Asn	Met	Phe	Thr	Tyr	Glu
			195					200					205			
	Ile	Ala	Pro	Val	Phe	Val	Leu	Leu	Glu	Tyr	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Met
	210						215					220				
25	Arg	Glu	Ile	Ile	Gly	Trp	Pro	Gly	Gly	Ser	Gly	Asp	Gly	Ile	Phe	Ser
	225					230					235					240
	Pro	Gly	Gly	Ala	Ile	Ser	Asn	Met	Tyr	Ala	Met	Leu	Ile	Ala	Arg	Phe
				245						250					255	
30	Lys	Met	Phe	Pro	Glu	Val	Lys	Glu	Lys	Gly	Met	Ala	Ala	Val	Pro	Arg
				260					265					270		
	Leu	Ile	Ala	Phe	Thr	Ser	Glu	His	Ser	His	Phe	Ser	Leu	Lys	Lys	Gly
			275					280					285			
35	Ala	Ala	Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Thr	Asp	Ser	Val	Ile	Leu	Ile	Lys	Cys
			290				295					300				
	Asp	Glu	Arg	Gly	Lys	Met	Val	Pro	Ser	Asp	Leu	Glu	Arg	Arg	Ile	Leu
	305					310					315					320
40	Glu	Ala	Lys	Gln	Lys	Gly	Phe	Val	Pro	Phe	Leu	Val	Ser	Ala	Thr	Ala
				325						330					335	
	Gly	Thr	Thr	Val	Tyr	Gly	Ala	Phe	Asp	Pro	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Asp
				340					345					350		
45	Ile	Cys	Lys	Lys	Tyr	Lys	Ile	Trp	Met	His	Val	Asp	Ala	Ala	Trp	Gly
			355					360					365			
	Gly	Gly	Leu	Leu	Met	Ser	Arg	Lys	His	Lys	Trp	Lys	Leu	Ser	Gly	Val
		370					375					380				
50	Glu	Arg	Ala	Asn	Ser	Val	Thr	Trp	Asn	Pro	His	Lys	Met	Met	Gly	Val
	385					390					395					400
	Pro	Leu	Gln	Cys	Ser	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Glu	Glu	Gly	Leu	Met	Gln
				405						410					415	
55																
60																

ES 2 905 227 T3

Ser Cys Asn Gln Met His Ala Ser Tyr Leu Phe Gln Gln Asp Lys His
 420 425 430
 Tyr Asp Leu Ser Tyr Asp Thr Gly Asp Lys Ala Leu Gln Cys Gly Arg
 5 435 440 445
 His Val Asp Val Phe Lys Leu Trp Leu Met Trp Arg Ala Lys Gly Thr
 450 455 460
 Thr Gly Phe Glu Ala His Ile Asp Lys Cys Leu Glu Leu Ala Glu Tyr
 10 465 470 475 480
 Leu Tyr Ser Ile Ile Lys Asn Arg Glu Gly Tyr Glu Met Val Phe Asp
 485 490 495
 Gly Lys Pro Gln His Thr Asn Val Cys Phe Trp Tyr Val Pro Pro Ser
 15 500 505 510
 Leu Arg Val Leu Glu Asp Asn Glu Glu Arg Met Asn Arg Leu Ser Lys
 515 520 525
 Val Ala Pro Val Ile Lys Ala Arg Met Met Glu Tyr Gly Thr Thr Met
 20 530 535 540
 Val Ser Tyr Gln Pro Leu Gly Asp Lys Val Asn Phe Phe Arg Met Val
 545 550 555 560
 Ile Ser Asn Pro Ala Ala Thr His Gln Asp Ile Asp Phe Leu Ile Glu
 25 565 570 575
 Glu Ile Glu Arg Leu Gly Gln Asp Leu
 30 580 585

<210> 33
 <211> 1758
 <212> ADN
 <213> Canis lupus

35 <400> 33
 atggcatctc caggctctgg cttctggtcc ttcgggtctg aagatggctc cggggatccc 60
 40 gagaacccca gcacagcgag agcctggtgt caggtggccc agaagttcac gggcggcatc 120
 ggaaacaagc tgtgcccct gctctacgga gatgccgaga agcccgcgga gagtggcggg 180
 agcgagcccc cgcgcgccac ctccaggaag gccgcctgcg cttgtaatca gaagccttgc 240
 45 agctgcccc aagcggaggt caactatgcy tttctacacg caacagacct gctgccagcc 300
 tgtgatggag aaaggccac gttggcgttt ctgcaagatg ttatggacat tttgcttcag 360
 50 tatgttgtga aaagtttcga tagatcaacc aaagtgattg atttccatta ccctaattgag 420
 ctccttcaag agtataactg ggaattggca gaccaaccac aaaatttga ggaaattttg 480
 atgcattgcc aaacgactct aaaatatgca attaaaacag ggcatcccag atatttcaat 540
 55 cagctttcca ctggactgga tatggttggg ttagcagcag actggctgac atcaacagca 600
 aacacaaaca tgttcaccta tgaaattgct ccagtatttg tgctcttggg atatgtcaca 660

ES 2 905 227 T3

ctaaagaaaa tgagagaaat cattggctgg ccgggaggct ctggcgatgg gatattttct 720
 cctggtggcg ctatttctaa catgtatgcc atgtgatcg cacgctttaa gatgttccca 780
 5 gaagtcaagg agaaaggaat ggctgcggtt cccaggctca ttgccttcac atctgagcat 840
 agtcactttt ctctcaagaa gggagctgca gctttgggga ttggaacaga cagcgtgatt 900
 ctgattaaat gtgatgagag ggggaaaatg gtcccatctg atcttgaaag aaggatcctt 960
 10 gaagcceaac aaaaggatt tgttcctttc cttgtgagcg ccacagctgg gaccaccgtg 1020
 tatggagcat tcgacccctt cttagcagtt gctgacattt gtaaaaagta caagatctgg 1080
 atgcatgtgg atgctgcttg ggggtgggga ttactgatgt cccggaagca caaatggaag 1140
 15 ctgagcggcg tggagagggc caactctgtg acatggaacc cacacaagat gatgggcgtc 1200
 cctttacagt gtcctcctct cctggtaga gaagagggat tgatgcagag ttgcaaccag 1260
 atgcatgctt cctacctctt ccagcaagat aaacactatg acctgtccta tgatactggg 1320
 20 gataaggcct tacagtgtgg acgccacggt gatgttttta aattatggct aatgtggagg 1380
 gcaaagggca ccaactgggtt tgaagcacat attgataagt gcctggagct ggctgagtat 1440
 25 ttatacagta tcataaaaaa ccgagaagga tacgaaatgg tgtttgatgg aaagcctcag 1500
 cacacaaatg tctgcttctg gtacgtgcct ccaagtttgc gtgtcctgga agacaatgaa 1560
 gagagaatga accgcctctc aaaggtggcc ccagtgatta aagcccgaat gatggagtat 1620
 30 gggaccacaa tggtcagcta tcagcccttg ggagacaagg tcaatttctt ccgcatggtt 1680
 atctcaaatc ccgcagcaac tcaccaagac atcgacttcc tgattgaaga aatagaacgc 1740
 35 cttggacaag atttataa 1758

<210> 34
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> Felis catus

40
 <400> 34

Met Ala Thr Pro Gly Ser Gly Phe Trp Ser Phe Gly Ser Glu Asp Gly
 1 5 10 15
 45 Ser Gly Asp Pro Glu Asn Pro Gly Thr Ala Arg Ala Trp Cys Gln Val
 20 25 30
 Ala Gln Lys Phe Thr Gly Gly Ile Gly Asn Lys Leu Cys Ala Leu Leu
 35 40 45
 50 Tyr Gly Asp Ser Glu Lys Pro Ala Glu Ser Gly Gly Ser Gln Pro Ala
 50 55 60
 55 Arg Ala Thr Ser Arg Lys Ala Thr Cys Ala Cys Asn Gln Lys Pro Cys
 65 70 75 80
 Ser Cys Pro Lys Ala Asp Val Asn Tyr Ala Phe Leu His Ala Thr Asp
 85 90 95

ES 2 905 227 T3

	Leu	Leu	Pro	Ala	Cys	Asp	Gly	Glu	Arg	Pro	Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Gln
				100					105					110		
5	Asp	Val	Met	Gly	Ile	Leu	Leu	Gln	Tyr	Val	Val	Lys	Ser	Phe	Asp	Arg
			115					120					125			
	Ser	Thr	Lys	Val	Ile	Asp	Phe	His	Tyr	Pro	Asn	Glu	Leu	Leu	Gln	Glu
		130				135						140				
10	Tyr	Asn	Trp	Glu	Leu	Ala	Asp	Gln	Pro	Gln	Asn	Leu	Glu	Glu	Ile	Leu
	145					150					155					160
	Met	His	Cys	Gln	Thr	Thr	Leu	Lys	Tyr	Ala	Ile	Lys	Thr	Gly	His	Pro
					165					170					175	
15	Arg	Tyr	Phe	Asn	Gln	Leu	Ser	Thr	Gly	Leu	Asp	Met	Val	Gly	Leu	Ala
				180					185					190		
	Ala	Asp	Trp	Leu	Thr	Ser	Thr	Ala	Asn	Thr	Asn	Met	Phe	Thr	Tyr	Glu
			195					200					205			
20	Ile	Ala	Pro	Val	Phe	Val	Leu	Leu	Glu	Tyr	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Met
		210					215					220				
	Arg	Glu	Ile	Ile	Gly	Trp	Pro	Gly	Gly	Ser	Gly	Asp	Gly	Ile	Phe	Ser
	225					230					235					240
25	Pro	Gly	Gly	Ala	Ile	Ser	Asn	Met	Tyr	Ala	Met	Leu	Ile	Ala	Arg	Phe
					245					250					255	
	Lys	Met	Phe	Pro	Glu	Val	Lys	Glu	Lys	Gly	Met	Ala	Ala	Val	Pro	Arg
				260					265					270		
30	Leu	Ile	Ala	Phe	Thr	Ser	Glu	His	Ser	His	Phe	Ser	Leu	Lys	Lys	Gly
			275					280					285			
	Ala	Ala	Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Thr	Asp	Ser	Val	Ile	Leu	Ile	Lys	Cys
			290				295					300				
35	Asp	Glu	Arg	Gly	Lys	Met	Ile	Pro	Ser	Asp	Leu	Glu	Arg	Arg	Ile	Leu
	305					310					315					320
	Glu	Ala	Lys	Gln	Lys	Gly	Phe	Val	Pro	Phe	Leu	Val	Ser	Ala	Thr	Ala
					325					330					335	
40	Gly	Thr	Thr	Val	Tyr	Gly	Ala	Phe	Asp	Pro	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Asp
				340					345					350		
	Ile	Cys	Lys	Lys	Tyr	Lys	Ile	Trp	Met	His	Val	Asp	Ala	Ala	Trp	Gly
45			355					360					365			
	Gly	Gly	Leu	Leu	Met	Ser	Arg	Lys	His	Lys	Trp	Lys	Leu	Ser	Gly	Val
		370					375					380				
	Glu	Arg	Ala	Asn	Ser	Val	Thr	Trp	Asn	Pro	His	Lys	Met	Met	Gly	Val
50	385					390					395					400
	Pro	Leu	Gln	Cys	Ser	Ala	Leu	Leu	Val	Arg	Glu	Glu	Gly	Leu	Met	Gln
					405					410					415	
55	Ser	Cys	Asn	Gln	Met	His	Ala	Ser	Tyr	Leu	Phe	Gln	Gln	Asp	Lys	His
				420					425					430		

ES 2 905 227 T3

Tyr Asp Leu Ser Tyr Asp Thr Gly Asp Lys Ala Leu Gln Cys Gly Arg
 435 440 445
 5 His Val Asp Val Phe Lys Leu Trp Leu Met Trp Arg Ala Lys Gly Thr
 450 455 460
 Thr Gly Phe Glu Ala His Ile Asp Lys Cys Leu Glu Leu Ala Glu Tyr
 465 470 475 480
 10 Leu Tyr Asn Ile Ile Lys Asn Arg Glu Gly Tyr Glu Met Val Phe Asp
 485 490 495
 Gly Lys Pro Gln His Thr Asn Val Cys Phe Trp Tyr Val Pro Pro Ser
 500 505 510
 15 Leu Arg Val Leu Glu Asp Asn Glu Glu Arg Met Ser Arg Leu Ser Lys
 515 520 525
 Val Ala Pro Val Ile Lys Ala Arg Met Met Glu Tyr Gly Thr Thr Met
 530 535 540
 20 Val Ser Tyr Gln Pro Leu Gly Asp Lys Val Asn Phe Phe Arg Met Val
 545 550 555 560
 Ile Ser Asn Pro Ala Ala Thr His Gln Asp Ile Asp Phe Leu Ile Glu
 565 570 575
 25 Glu Ile Glu Arg Leu Gly Gln Asp Leu
 580 585

<210> 35
 <211> 1758
 <212> ADN
 <213> Felis catus

<400> 35

35 atggcaactc caggctcagc cttttggtcc ttcgggtctg aagatggctc cggggatccc 60
 gagaaccccg gcacagcgag agcctggtgt caggtggccc agaagttcac gggcggcatc 120
 40 ggaacaacgc tgtgcgccct gctctacggg gattcagaga agccggcaga gaggggaggg 180
 agccagcccg cgcggggccac ctcccggaag gccacctgtg cctgtaacca gaagccttgc 240
 agctgcccc aagcggatgt caactatgcg tttctacacg caacagacct gctgccagcc 300
 45 tgtgatggag aaaggccac tttggcgttt ctgcaagatg taatgggcat tttgcttcag 360
 tatgtggtga aaagtttcga cagatcaacc aaagtgattg atttccatta ccctaagtag 420
 ctctgcaag agtataactg ggaattggca gaccaaccac aaaatttggg ggaattttg 480
 50 atgcattgcc aaacgactct aaaatatgca ataaaaacag ggcatcccag gtacttcaat 540
 caactttcca cgggactgga tatggttggg ttagcagcag actggctgac atcaacagca 600
 aacactaata tgttcaccta tgaaattgct ccagtatttg tgctcttggg atatgtcaca 660
 55 ctgaaaaaaaa tgagagaaat cattggctgg cctgggggct cggcgatgg gatattttct 720
 cctggtggcg ctatatctaa catgtatgcc atgctgattg cagcctttaa gatgttccca 780

ES 2 905 227 T3

gaagtcaagg agaaaggaat ggctgctggt cccaggctca ttgccttcac atccgagcat 840
 agtcattttt ctctcaagaa gggagctgca gctctgggga ttggaacaga cagcgtgatt 900
 5 ctgattaat gcgatgagag agggaaaatg atcccatctg atcttgaaag aaggatcctt 960
 gaagcceaac agaaggatt tgttcctttc cttgtgagtg ccacagctgg gaccactgtg 1020
 tatggagcat ttgacccctt cttggcggtc gctgacattt gcaaaaagta caagatctgg 1080
 10 atgcatgtgg atgcagcttg gggggtgggga ttactgatgt cccggaaaca caagtggaaa 1140
 ctgagcggcg tggagagggc caactctgtg acatggaacc cacacaagat gatgggcgtc 1200
 cccttacagt gctctgctct cctggttaga gaagaggggt tgatgcagag ttgcaaccag 1260
 15 atgcatgctt cctacctttt ccagcaagat aaacactacg acctgtccta cgactctgga 1320
 gacaaggcct tacagtgtgg acgccatgtc gatgttttta aattatggct aatgtggagg 1380
 20 gcaaagggca ccaactgggtt tgaagcacat attgataagt gcttggagct ggcagaatat 1440
 ttatacaata tcataaaaaa ccgagaagga tatgaaatgg tgtttgatgg aaagcctcag 1500
 cacacaaatg tctgcttctg gtacgtgcct ccaagtttgc gagtcctgga agacaatgaa 1560
 25 gagagaatga gccgcctctc aaaggtggcc ccagtgatta aagccagaat gatggagtat 1620
 gggaccacaa tggtcagcta tcagcccttg ggagacaagg tcaatttctt ccgcatggtc 1680
 atctcaaatc ccgcagcaac tcaccaagac attgacttcc tgattgaaga aatagaacgc 1740
 30 cttggacaag atttataa 1758

<210> 36
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> Equus caballus

<400> 36

40 Met Ala Ser Pro Gly Ser Gly Phe Trp Ser Phe Gly Ser Glu Asp Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Asp Pro Glu Asn Pro Gly Thr Ala Arg Ala Trp Cys Gln Val
 20 25 30
 45 Ala Gln Lys Phe Thr Gly Gly Ile Gly Asn Lys Leu Cys Ala Leu Leu
 35 40 45
 Tyr Gly Asp Ala Glu Lys Ala Ala Glu Ser Gly Gly Ser Glu Pro Pro
 50 55 60
 Arg Ala Thr Ser Arg Lys Ala Ala Cys Ser Cys Asn Gln Lys Pro Cys
 65 70 75 80
 Ser Cys Ser Lys Ala Asp Val Asn Tyr Ala Phe Leu His Ala Thr Asp
 55 85 90 95
 Leu Leu Pro Ala Cys Asp Gly Glu Arg Pro Thr Leu Ala Phe Leu Gln
 100 105 110
 60 Asp Val Met Asp Ile Leu Leu Gln Tyr Val Val Lys Ser Phe Asp Arg

ES 2 905 227 T3

	450		455		460														
	Thr	Gly	Phe	Glu	Ala	His	Ile	Asp	Lys	Cys	Leu	Glu	Leu	Ala	Glu	Tyr			
	465					470					475					480			
5	Leu	Tyr	Asn	Ile	Ile	Lys	Asn	Arg	Glu	Gly	Tyr	Glu	Met	Val	Phe	Asp			
					485					490					495				
	Gly	Lys	Pro	Gln	His	Thr	Asn	Val	Cys	Phe	Trp	Tyr	Val	Pro	Pro	Ser			
10				500					505					510					
	Leu	Arg	Val	Leu	Glu	Asp	Asn	Glu	Glu	Arg	Met	Ser	Arg	Leu	Ser	Lys			
			515					520					525						
	Val	Ala	Pro	Val	Ile	Lys	Ala	Arg	Met	Met	Glu	Tyr	Gly	Thr	Thr	Met			
15		530					535					540							
	Val	Ser	Tyr	Gln	Pro	Leu	Gly	Asp	Lys	Val	Asn	Phe	Phe	Arg	Met	Val			
	545					550					555					560			
	Ile	Ser	Asn	Pro	Ala	Ala	Thr	His	Gln	Asp	Ile	Asp	Phe	Leu	Ile	Glu			
20					565					570					575				
	Glu	Ile	Glu	Arg	Leu	Gly	Gln	Asp	Leu										
				580					585										

25 <210> 37
 <211> 1758
 <212> ADN
 <213> Equus caballus

30 <400> 37

	atggcatctc	ccggctccgg	cttttggtcc	tttgggtctg	aagatggctc	cggggatccc	60
	gagaaccctg	gcacagcgag	agcctggtgt	caggtggccc	agaagttcac	cggcggcatc	120
35	ggaaacaagc	tatgcgccct	gctctacgga	gacgccgaga	aggcggcgga	gagcggcggg	180
	agcgagcccc	cgcgggccac	ctcccggaag	gccgcctgct	cctgcaacca	gaagccctgc	240
	agctgctcca	aagccgatgt	caactatgog	tttctacacg	caacagactt	gctgccagct	300
40	tgtgacggag	aaagaccac	tttggcgttt	ctgcaagatg	ttatggacat	tttgcttcag	360
	tatgtggtga	aaagtttcga	tagatcaacc	aaagtgattg	acttccatta	ccctaagag	420
	ctccttcaag	agtataattg	ggaattggca	gaccaaccac	aaaatctgga	ggaaattht	480
45	atgcattgcc	aaacaacttt	aaaatatgca	attaaaacag	ggcatcctag	atatttcaat	540
	caactttcca	ctggactgga	tatggttggg	ttagcagcag	actggctgac	atcaacagca	600
50	aacaccaaca	tgttcaceta	tgaaattgct	ccagtattcg	tgcttttggg	atatgtcaca	660
	ttaaagaaaa	tgagagaaat	cattggctgg	ccaggaggct	ctggcgatgg	aatatthtct	720
	cctggtggcg	ccatatctaa	catgtatgcc	atgctgattg	cacgctttaa	gatgttccca	780
55	gaagtcaagg	agaaggaat	ggccgctggt	cccaggctca	ttgccttcac	gtctgagcat	840
	agtcattttt	ctctcaagaa	gggagctgca	gccttgggga	ttggaacaga	cagcgttaatt	900

60

ES 2 905 227 T3

ctgattagat gtgatgagag ggggaaaatg atcccatcgg atcttgaaag aagaatcctt 960
 gaagccaaac aaaaaggatt tgtccctttt cttgtgagtg ccacggctgg gaccaccgtg 1020
 5 tatggagcat tcgatcccct cttagctgtc gctgacattt gcaaaaagta caagatctgg 1080
 atgcatgtgg atgcagcttg gggcggggga ttactgatgt cccggaaca caagtggaaa 1140
 ctgagtggcg tggagagggc caactctgtg acatggaatc cacacaagat gatgggtgtc 1200
 10 cctttgcagt gctctgctct cctgggttaga gaagagggat tgatgcagag ttgcaaccag 1260
 atgcatgcct cctacctctt tcagcaagat aaactatg acctgtccta tgacactgga 1320
 gacaaggcct tgcagtgcgg acgccacgtg gatgttttta agttatggct catgtggagg 1380
 15 gcaaagggaa caactgggtt tgaagcacat attgataagt gtttggagtt ggcggagtat 1440
 ttatacaata tcataaaaaa ccgagaagga tatgaaatgg tgtttgacgg aaagcctcag 1500
 cacaccaatg tctgcttctg gtatgtacct ccgagtctgc gtgttctaga agacaatgaa 1560
 20 gagagaatga gccgcctctc aaaggtggcc ccggtgatta aagccagaat gatggagtat 1620
 gggaccacaa tggtcagcta ccagcccttg ggagacaagg tcaatttctt ccgcatggtc 1680
 25 atctcaaadc ccgagcaac tcaccaagac attgacttcc tgattgaaga aatagaacgc 1740
 cttggacaag atttataa 1758

<210> 38
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Canis lupus

<400> 38

35 Met His Gly Ser Ala Leu Leu Cys Cys Cys Leu Val Leu Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Gly Ala Ser Arg His Gln Ser Thr Leu Leu Glu Asp Asp Cys Thr
 20 25 30
 40 His Phe Pro Ala Ser Leu Pro His Met Leu Arg Glu Leu Arg Ala Ala
 35 40 45
 45 Phe Gly Arg Val Lys Ile Phe Phe Gln Met Lys Asp Lys Leu Asp Asn
 50 55 60
 Ile Leu Leu Thr Gly Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Ser Tyr Leu Gly
 65 70 75 80
 50 Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met
 85 90 95
 Pro Arg Ala Glu Asn His Asp Pro Asp Ile Lys Asn His Val Asn Ser
 100 105 110
 55 Leu Gly Glu Lys Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg
 115 120 125
 Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln
 130 135 140
 60

ES 2 905 227 T3

Val Lys Ser Ala Phe Ser Lys Leu Gln Glu Lys Gly Val Tyr Lys Ala
 145 150 155 160
 Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Thr Tyr Met Thr
 5 165 170 175
 Met Arg Met Lys Ile
 180
 <210> 39
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Canis lupus
 <400> 39
 atgcatggct cagcactgct ctggtgctgc ctggctcctcc tggccggggt gggagccagc 60
 cgacaccaga gcaccctact tgaggacgac tgcaccact tcccagccag cctgccccac 120
 20 atgctccgag agctccgagc tgccttcggg aggtgaaga tcttcttca aatgaaggac 180
 aagctggaca acatactgct gaccgggtcc ctgctggagg actttaagag ttacctgggt 240
 tgccaagccc tgcgggat gatccagttt tacttgagg aggtgatgcc ccgggctgag 300
 25 aaccacgacc cagacatcaa gaaccacgtg aactccctgg gagagaagct caagaccctc 360
 aggctgagac tgaggctgcg acgctgtcac cgatttcttc cctgtgagaa taagagcaag 420
 gcggtggagc aggtgaagag cgcatttagt aagctccagg agaaaggtgt ctacaaagcc 480
 30 atgagtgagt ttgacatctt catcaactac atagaaacct acatgacaat gaggatgaaa 540
 atctga 546
 <210> 40
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Felis catus
 <400> 40
 Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Phe Leu Val Phe Leu Ala Gly Val
 1 5 10 15
 45 Gly Ala Ser Arg His Gln Ser Thr Leu Ser Glu Asp Asn Cys Thr His
 20 25 30
 Phe Ser Val Ser Leu Pro His Met Leu Arg Glu Leu Arg Ala Ala Phe
 35 40 45
 50 Gly Lys Val Lys Thr Phe Phe Gln Thr Lys Asp Glu Leu His Ser Ile
 50 55 60
 Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys
 65 70 75 80
 55 Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro
 85 90 95
 Gln Ala Glu Asn Glu Asp Pro Asp Ile Lys Gln His Val Asn Ser Leu
 60

ES 2 905 227 T3

				100						105					110				
				Gly	Glu	Lys	Leu	Lys	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Cys	His	Arg
						115					120				125				
5				Phe	Leu	Pro	Cys	Glu	Asn	Lys	Ser	Lys	Val	Val	Glu	Gln	Val	Lys	Ser
					130					135					140				
				Thr	Phe	Ser	Lys	Leu	Gln	Glu	Lys	Gly	Val	Tyr	Lys	Ala	Met	Gly	Glu
10					145				150					155				160	
				Phe	Asp	Ile	Phe	Ile	Asn	Tyr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Met	Thr	Met	Lys	Met
							165					170						175	
				Lys	Ile														
15																			
				<210>	41														
				<211>	537														
				<212>	ADN														
				<213>	Felis catus														
20				<400>	41														
				atgcacagct	cagcacttct	gtgtttcctg	gtcttcctgg	ccgggtagg	agccagccga										60
25				caccagagca	ccctgtctga	ggacaactgc	accacttct	cagtcagcct	gccccacatg										120
				ctccgagagc	tccgagctgc	cttcggcaag	gtgaagactt	tctttcaaac	caaggacgag										180
				ctgcacagca	tattgttgac	caggtccttg	ctggaggact	ttaagggtta	cctgggttgc										240
30				caagccttgt	ccgagatgat	ccagttttat	ttggaggagg	tgatgccccca	ggctgagaac										300
				gaggaccag	acatcaaaca	gcacgtgaac	tcctggggag	aaaagctgaa	gacctccgg										360
				ctgagactgc	ggcgctgtca	tcgatttctg	ccctgtgaaa	acaagagcaa	ggtggtggag										420
35				caggtgaaga	gtacctttag	taagctccaa	gagaaaggtg	tctacaaagc	catgggtgag										480
				tttgacatct	tcatcaacta	catagaagct	tacatgacaa	tgaagatgaa	aatctga										537
40				<210>	42														
				<211>	178														
				<212>	PRT														
				<213>	Equus caballus														
45				<400>	42														
				Met	His	Ser	Ser	Ala	Leu	Leu	Cys	Tyr	Leu	Val	Phe	Leu	Ala	Gly	Val
				1				5					10					15	
50				Gly	Ala	Ser	Arg	Asp	Arg	Gly	Thr	Gln	Ser	Glu	Asn	Ser	Cys	Thr	His
							20					25					30		
				Phe	Pro	Thr	Ser	Leu	Pro	His	Met	Leu	His	Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	Phe
						35					40					45			
55				Ser	Arg	Val	Lys	Thr	Phe	Phe	Gln	Met	Lys	Asp	Gln	Leu	Asp	Asn	Met
					50					55					60				
				Leu	Leu	Asn	Gly	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Phe	Lys	Gly	Tyr	Leu	Gly	Cys
60					65				70					75					80

ES 2 905 227 T3

Leu Lys Arg Ser Pro Glu Lys Gln Met Ala Val Pro Ala Arg Arg Glu
 50 55 60
 Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala Gly Pro Glu His Ser Arg Gly Lys
 5 65 70 75 80
 Gly Arg Arg Gly Pro Arg Gly Arg Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala
 85 90 95
 Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu
 10 100 105 110
 Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr
 115 120 125
 Met Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Ala
 15 130 135 140
 Ser Asp Lys Ala Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Tyr Asp Asp
 145 150 155 160
 Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys
 20 165 170 175
 His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
 25 180 185

<210> 45
 <211> 558
 <212> ADN
 <213> Canis lupus

<400> 45

atgaagttat gggatgtcgt ggctgtctgc ctgggtgctgc tccacaccgc gtccgccctc 60
 35 ccgctgcccc ccgcaaacgt gccggaggac tattctgatc agtttgatga cgtcatggat 120
 tttattcagg ccaccatcag aaggctgaaa aggtcaccgc agaaacaaat ggccgtgcca 180
 gcgagacgag agcggaatcg tcaggccgcg gccgccggcc cggaacattc cagggggaag 240
 40 gggcgccgag gcccgagggg cagaaaccgg ggttgtgtct tgactgcat acatttaaac 300
 gtcactgacc tgggcttggg ctacgaaacc aaggaggaac tgatttttag gtactgcagc 360
 ggctcctgcg acggggccga gaccatgtac gacaaaatat taaaaaactt atccaaaagt 420
 45 agaaggctgg cgagtgacaa agcagggcag gcttgctgca gaccatcgc ctacgatgac 480
 gacctgtcgt ttttagatga caacctggtt taccatattc taagaaagca ttccgctaaa 540
 50 aggtgtggat gtatctga 558

<210> 46
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Felis catus

<400> 46

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr
 1 5 10 15

60

ES 2 905 227 T3

Ala Ser Ala Phe Pro Leu Pro Ala Gly Lys Arg Pro Pro Glu Ala Pro
 20 25 30

Ala Glu Asp Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser
 35 40 45

Ser Asp Ser Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val
 50 55 60

Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Arg Arg Leu Lys Arg Ser Pro Glu
 65 70 75 80

Lys Gln Met Ala Leu Pro Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala
 85 90 95

Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg
 100 105 110

Gly Arg Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr
 115 120 125

Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr
 130 135 140

Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Met Tyr Asp Lys Ile Leu
 145 150 155 160

Lys Asn Leu Ser Lys Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln
 165 170 175

Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Tyr Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp
 180 185 190

Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys
 195 200 205

Gly Cys Ile
 210

<210> 47
 <211> 636
 <212> ADN
 <213> Felis catus

<400> 47

atgaagttat gggatgtcgt ggctgtctgc ctggtgctgc tccacaccgc gtccgccttc 60

ccgctgcccg ccggtaaag gcctcccag gcgcccgcg aagaccgctc cctcggccgc 120

cgccgcgccc ccttcgcgct gagcagtac tcaaatatgc cagaggatta tcctgatcag 180

tttgacgacg tcatggattt tattcaagct accatcagaa gactgaaaag gtcacccgag 240

aaacaaatgg ccttgccgcc tagaagagag cggaatcggc aggcggcggc cgccaacccg 300

gagaattcca gagggaaag tcggcgaggc cagaggggca gaaatcgggg ttgtgtctta 360

actgcgatac atttgaactg caccgacctg ggtttgggct acgaaaccaa ggaggaactg 420

atthttagggt actgcagcgg ctctctgtgat gcagctgaga caatgtacga caaaatatta 480

aaaaacttat ccaaaaacag aaggctggtg agtgacaaag tcgggcaggc atgttgcaga 540

cccacgcct atgacgacga cctgtcgttt ttagatgaca acctggttta ccatattcta 600

agaaagcatt ccgctaaaag gtgtggatgt atctga 636

<210> 48
 <211> 185

ES 2 905 227 T3

<212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 48

5 Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr
1 5 10 15

10 Ala Ser Ala Phe Pro Leu Pro Ala Ala Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro
20 25 30

15 Asp Gln Phe Asp Asp Val Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg
35 40 45

20 Leu Lys Arg Ser Pro Asp Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu
50 55 60

25 Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Arg Lys
65 70 75 80

30 Gly Gln Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala
85 90 95

35 Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu
100 105 110

40 Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Glu Ala Ala Glu Thr
115 120 125

45 Met Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Lys Asn Arg Arg Leu Val
130 135 140

50 Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp
145 150 155 160

55 Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys
165 170 175

60 His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
180 185

<210> 49

<211> 558

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 49

45 atgaagttat gggatgtcgt ggctgtctgc ctggtgctgc tccacaccgc gtccgccttc 60

ccgctgcccg ccgcaaatat gccagaggat taccctgata agtttgatga tgtcatggat 120

50 tttattcaag ccaccattaa aagactgaaa aggtcaccag ataaacaaat ggcaagtgtt 180

cctagaagag agcggatcgc gcaggctgca gctgccaacc cggagaattc cagaaggaaa 240

ggtcagcgcg gccagagggg caaaaaccgg ggttgtgtct taaccgcgat acatttaaat 300

55 gtcactgact tgggtttggg ctacgaaacc aaggaggaac tgatttttag gtactgcagt 360

ggctcctgcg aggcagccga gacaatgtac gacaaaatat taaaaaactt atccaaaat 420

60 agaaggtcgg tgagtgacaa agtagggcag gcatgttgca gaccatcgc cttcagatgc 480

gacctgtcat ttttagatga taacttggtt taccatattc taagaaagca ttccgctaaa 540

aggtgtggat gtatctga 558

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para el uso en el alivio o tratamiento del dolor que comprende dos o más que se seleccionan del grupo que consiste en un gen que codifica la glutamato descarboxilasa (GAD), un gen que codifica la interleucina 10 (IL-10) y un gen que codifica un factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF).
2. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gen está en una forma contenida operativamente en un vector.
- 10 3. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el vector es al menos un vector viral que se selecciona del grupo que consiste en adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes simple, lentivirus, retrovirus y poxvirus; o en donde el vector es al menos un vector no viral que se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, un liposoma, un polímero catiónico, una micela, una emulsión y nanopartículas lipídicas sólidas.
- 15 4. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la GAD es GAD65 o GAD67.
- 20 5. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gen que codifica GAD es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 34 o la SEQ ID NO: 36.
- 25 6. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gen que codifica GAD es la secuencia de nucleótidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 35 o la SEQ ID NO: 37.
- 30 7. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gen que codifica IL-10 es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 40 o la SEQ ID NO: 42.
- 35 8. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gen que codifica IL-10 es la secuencia de nucleótidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 41 o la SEQ ID NO: 43.
- 40 9. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gen que codifica GDNF es la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 44, la SEQ ID NO: 46 o la SEQ ID NO: 48.
- 45 10. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gen que codifica GDNF es la secuencia de nucleótidos que se representa mediante la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 45, la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 49.
- 50 11. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dolor es dolor nociceptivo, dolor psicógeno, dolor inflamatorio, dolor patológico, dolor neuropático, dolor del cáncer, dolor posoperatorio, dolor de la neuralgia del trigémino, dolor idiopático, dolor de la neuropatía diabética o migraña.
12. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica comprende adicionalmente un portador fisiológicamente aceptable; o en donde la composición farmacéutica es una inyección.
13. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica se formula para la administración mediante inyección epidural o inyección intratecal.

Figura 1

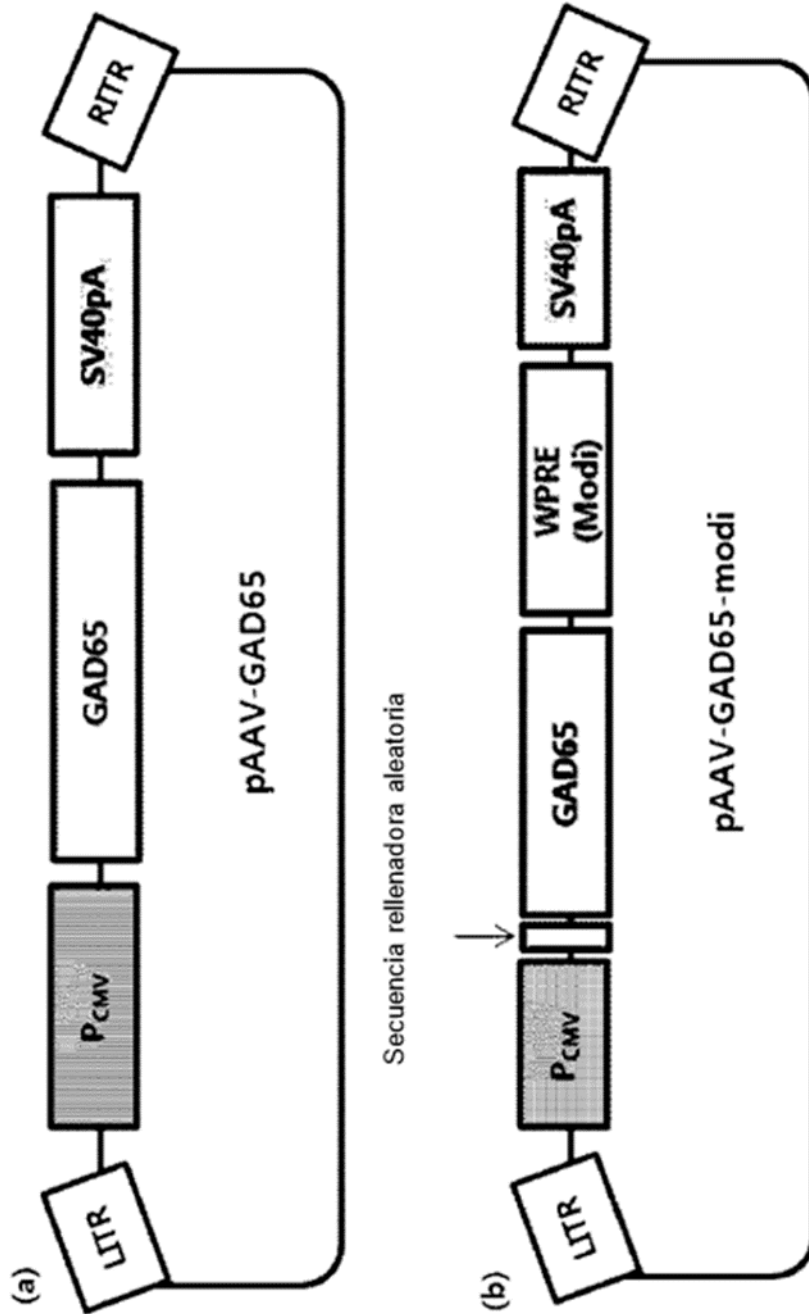


Figura 2

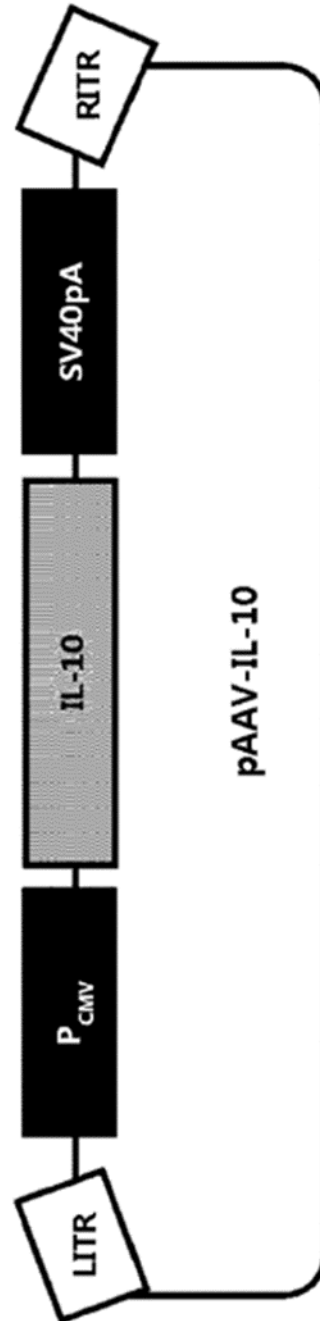


Figura 3

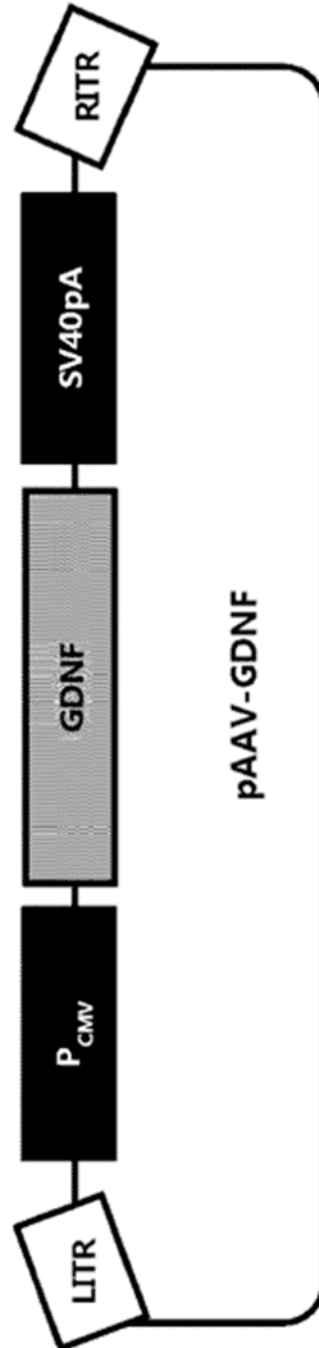


Figura 4

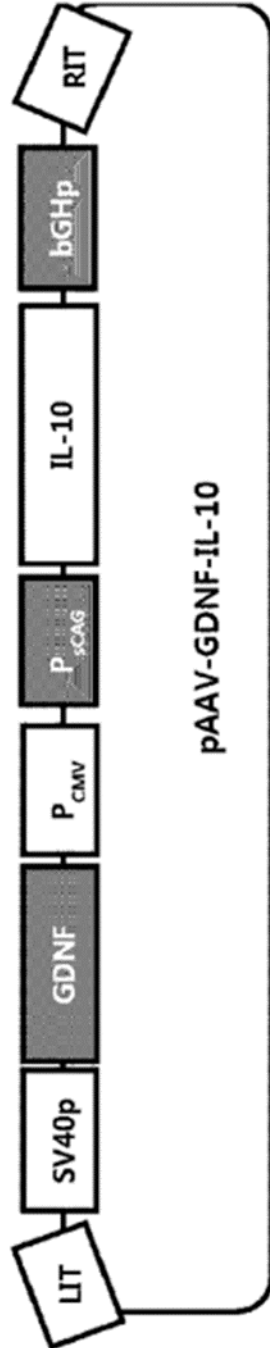


Figura 5

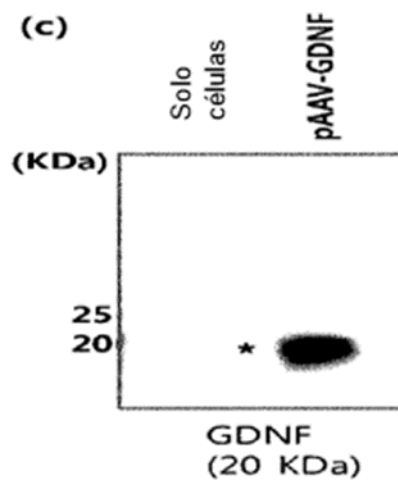
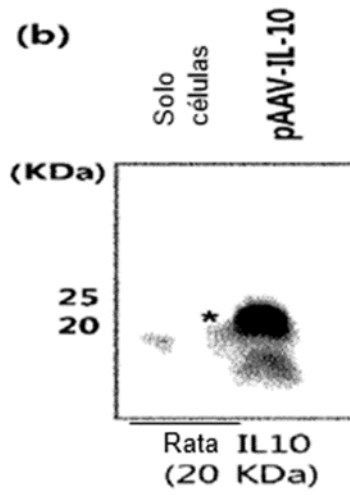
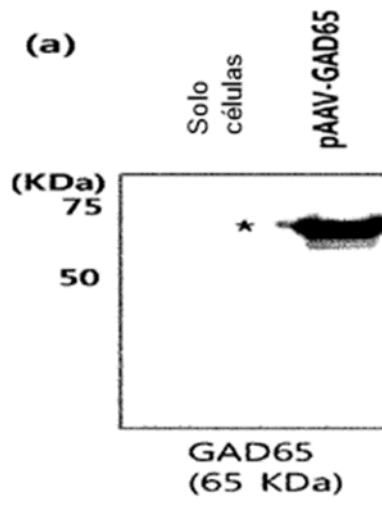
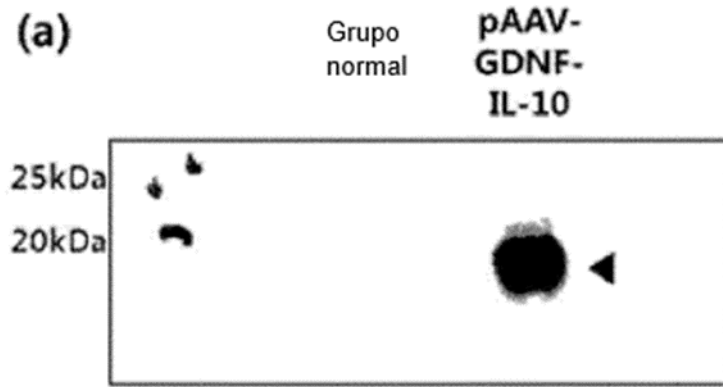
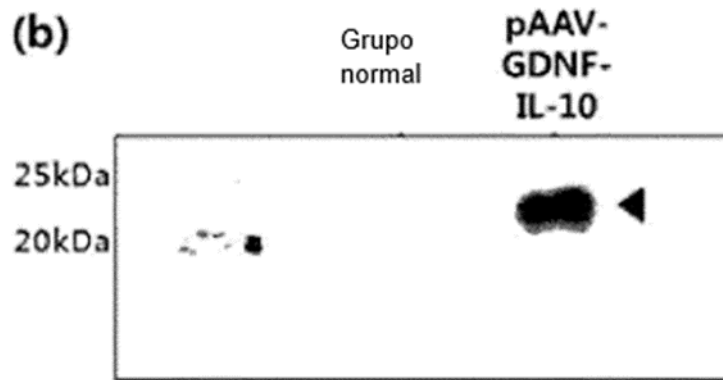


Figura 6



hIL-10



hGDNF

Figura 7

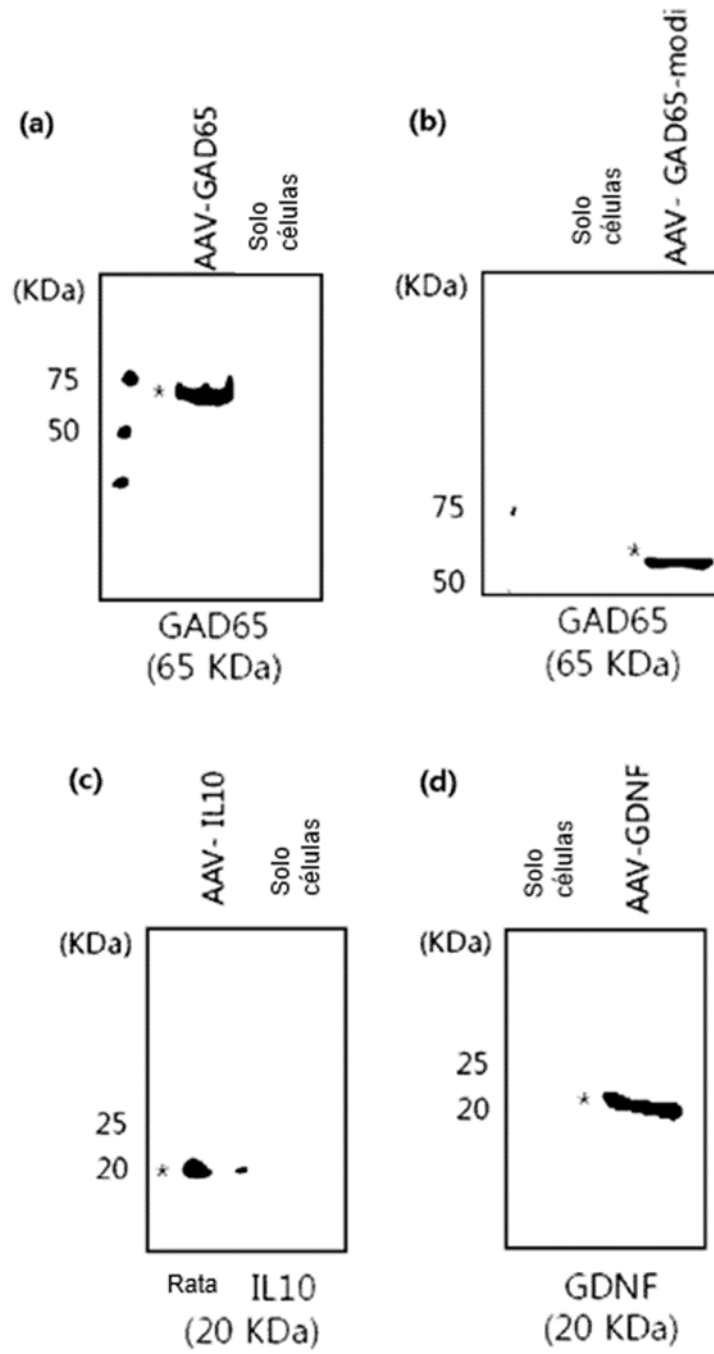


Figura 8

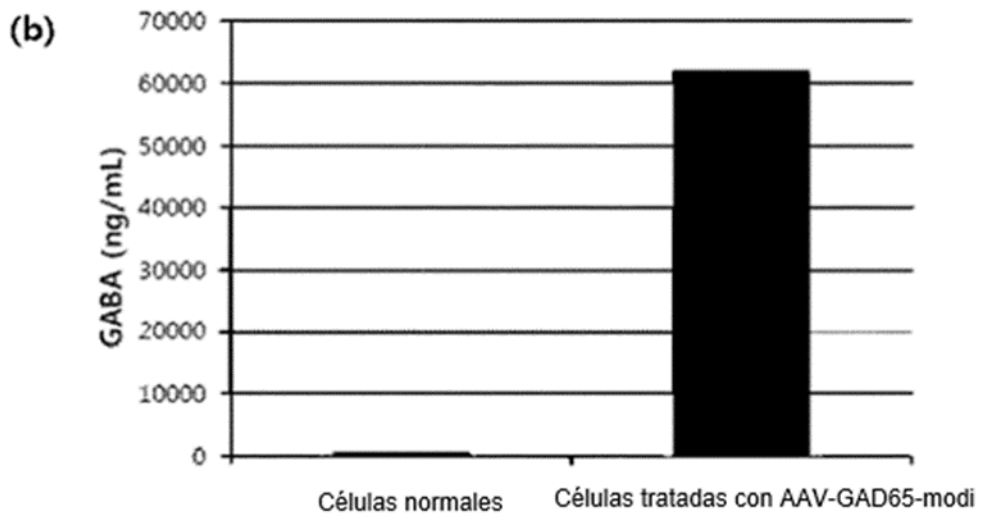
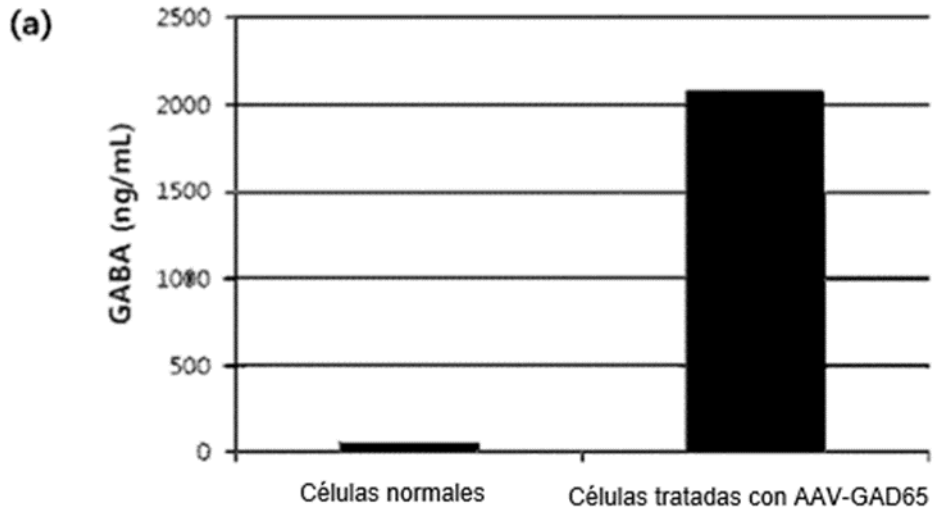


Figura 9

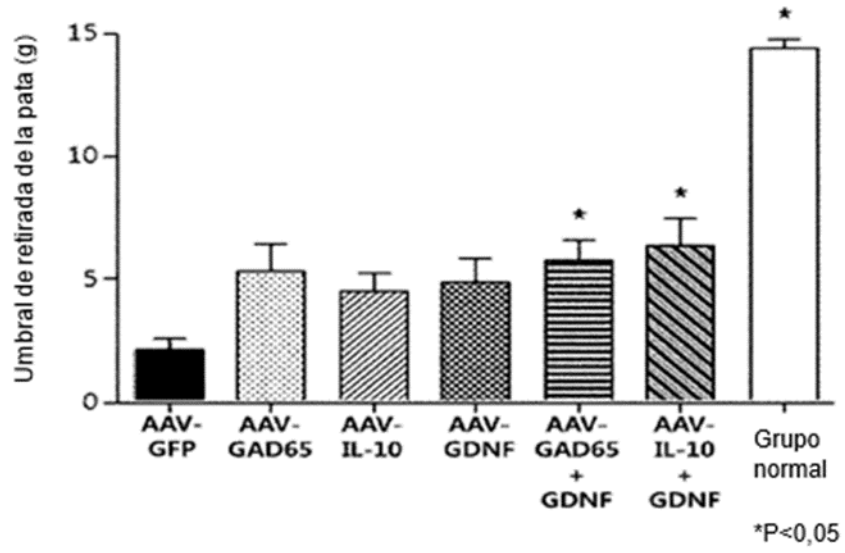


Figura 10

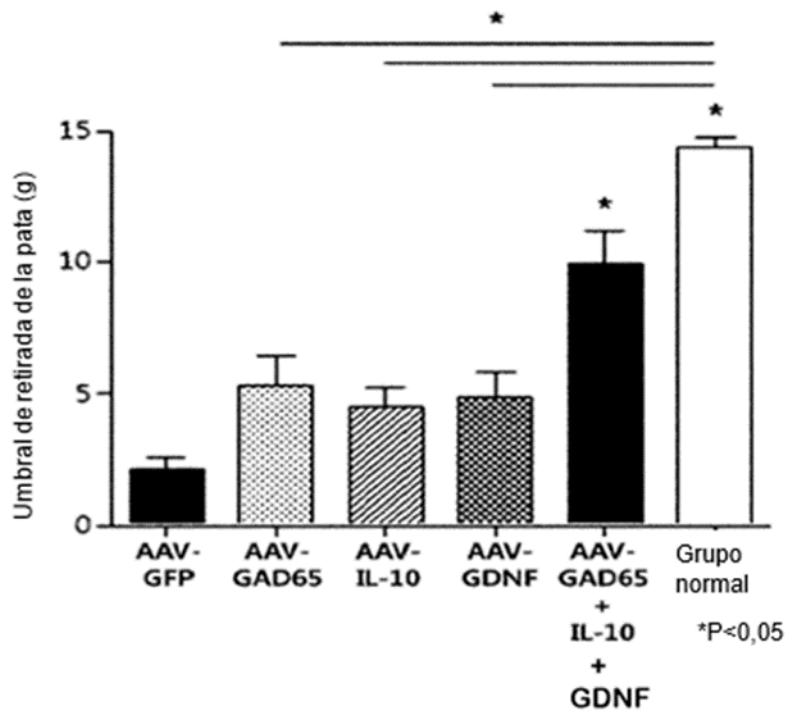


Figura 11

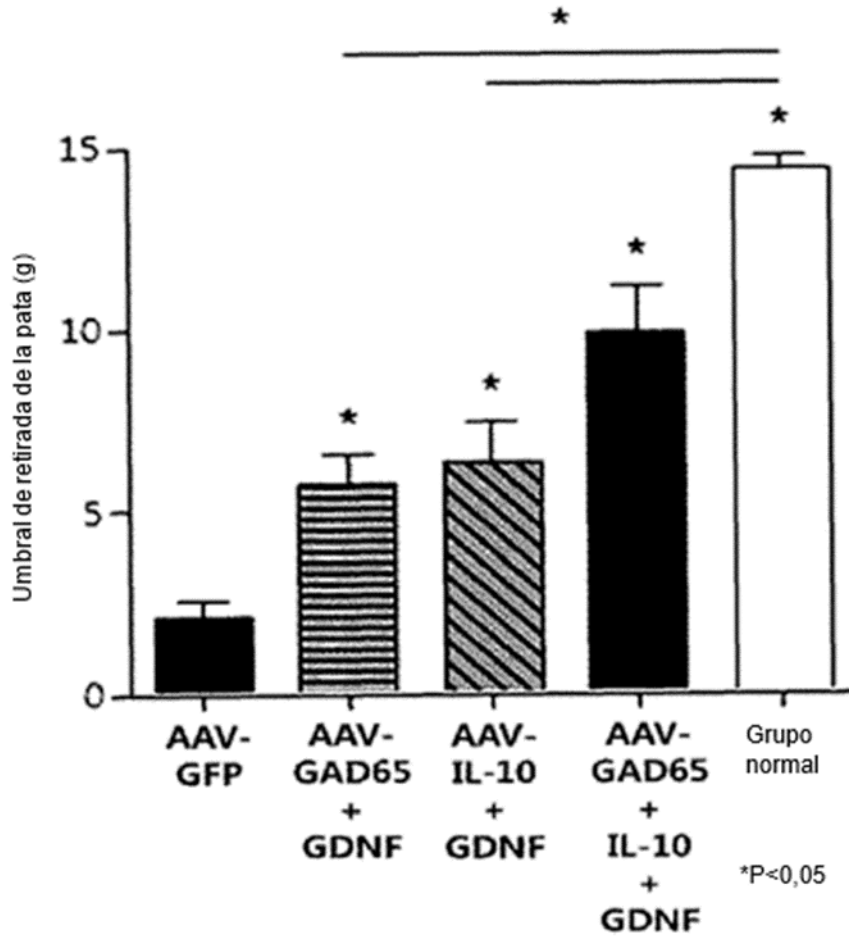


Figura 12

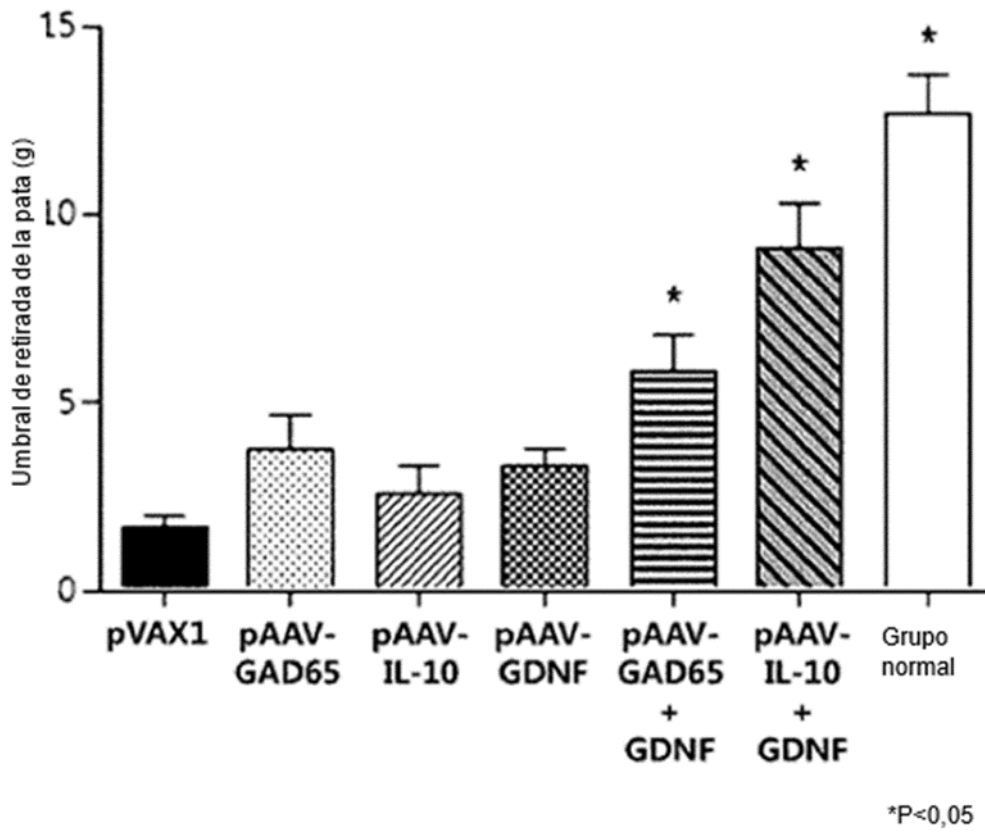


Figura 13

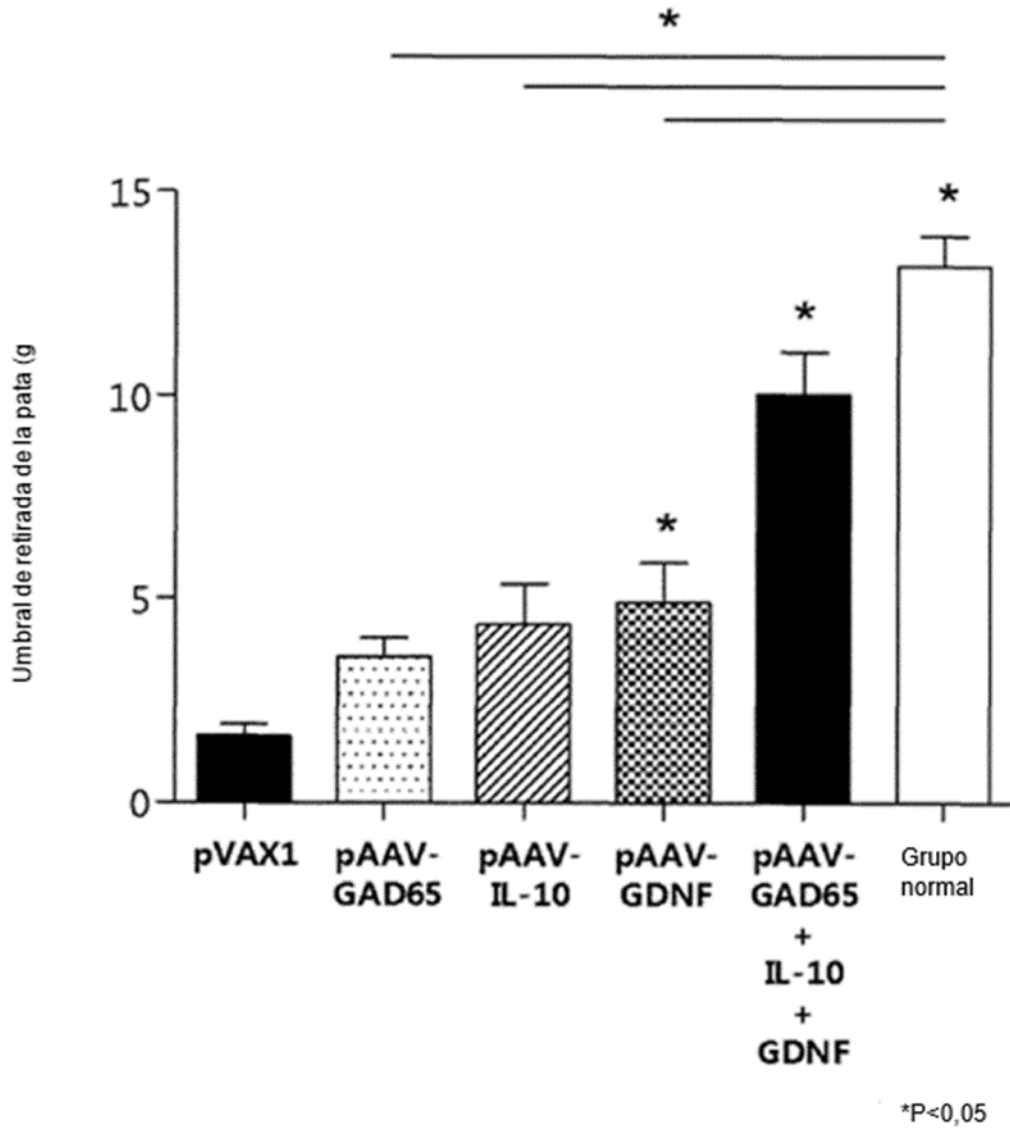


Figura 14

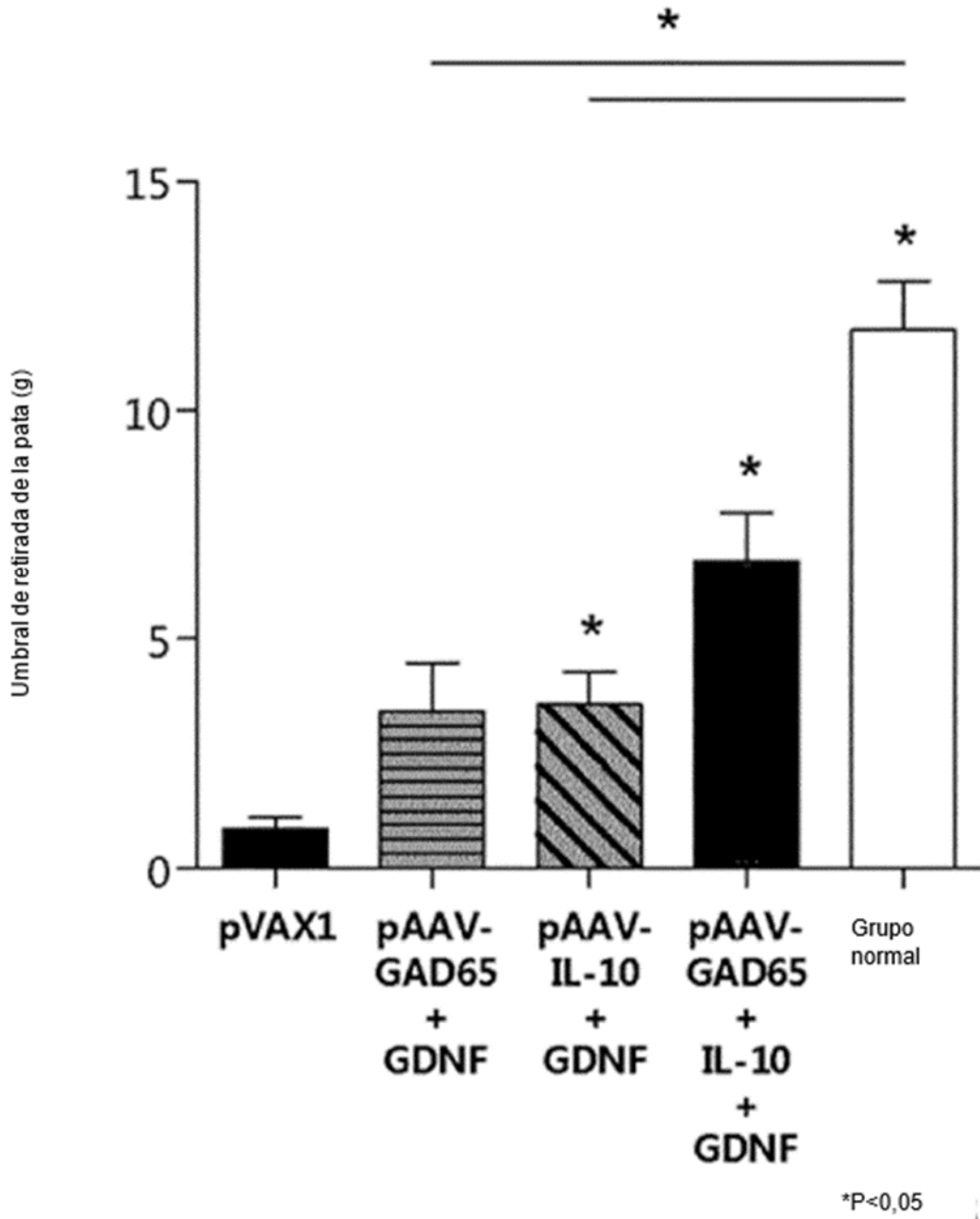


Figura 15

