

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 047**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2018** **PCT/EP2018/084036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2019** **WO19110825**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2018** **E 18825584 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024** **EP 3720467**

54 Título: **Métodos para tratar el dolor neuropático**

30 Prioridad:

08.12.2017 GB 201720505

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

27.09.2024

73 Titular/es:

VOLUTION IMMUNO PHARMACEUTICALS SA
(100.0%)

Place Des Eaux Vives, 6 Case Postale 3461
1211 Genève 3, CH

72 Inventor/es:

CHAZOT, PAUL LOUIS;
NUNN, MILES ANDREW y
OBARA, ILONA GENOWEFA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 980 047 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

Métodos para tratar el dolor neuropático

5 SINOPSIS

Se proporcionan métodos para tratar el dolor neuropático. Más particularmente, la invención proporciona un método para tratar la hipersensibilidad mecánica relacionada con el dolor neuropático (alodinia e hiperalgesia) y el dolor neuropático periférico.

10 DOLOR NEUROPÁTICO

El dolor neuropático es un dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial. El sistema somatosensorial permite la percepción del tacto, la presión, el dolor, la temperatura, la posición, el movimiento y la vibración [1]. El dolor neuropático está asociado con una sensibilización periférica y central (aumento de la respuesta de las neuronas) que puede conducir al desarrollo de alodinia (dolor provocado por estímulos que normalmente no son dolorosos, como un ligero toque) e hiperalgesia (aumento de la sensibilidad a estímulos dolorosos), o puede estar asociado con sensaciones anormales denominadas disestesia. Puede ser continuo y/o parecerse a puñaladas o descargas eléctricas. Las características más comunes incluyen ardor o frío, sensaciones de "pinchazos", entumecimiento y picazón, dolor insoportable y dificultad para percibir correctamente la temperatura. Se estima que el dolor neuropático afecta aproximadamente al 7-10% de la población general [1]. Puede perjudicar de forma significativa la calidad de vida, ya que las personas que lo padecen también suelen presentar otros problemas relacionados, como trastornos del sueño, depresión, ansiedad, pérdida de funciones y deterioro cognitivo. El dolor neuropático se describe detalladamente en una revisión de Colloca, L. et al. [1].

El dolor neuropático es mecánicamente distinto a otros dolores crónicos, como el dolor inflamatorio que se produce, por ejemplo, en la artritis reumatoide, en la que la causa principal es la inflamación [1]. Según el sitio web de la 'Brain and Spine Foundation', "entre las causas más comunes del dolor neuropático se incluyen la presión nerviosa o el daño nervioso tras una intervención quirúrgica o un traumatismo, las infecciones víricas, el cáncer, las malformaciones vasculares, el alcoholismo, las enfermedades neurológicas como la esclerosis múltiple y las enfermedades metabólicas como la diabetes. También puede ser un efecto secundario de determinados medicamentos, como la quimioterapia. A veces no se identifica causa alguna, lo que puede resultar angustioso para la persona que sufre el dolor. El dolor neuropático crónico es frecuente y puede estar relacionado con una enfermedad subyacente, como el cáncer o la neuropatía diabética, o con tratamientos como la quimioterapia [2]. El dolor neuropático crónico puede afectar o seguir la zona lumbar, las extremidades inferiores, el cuello y las extremidades superiores".

El dolor neuropático puede subtipificarse según la ubicación de su patología. El dolor neuropático periférico suele estar causado por una patología de los nervios periféricos y a menudo afecta a una o más extremidades distales, por ejemplo los pies, las pantorrillas, las manos y los antebrazos. El dolor neuropático central, por el contrario, está causado por una lesión o enfermedad de la médula espinal y/o el cerebro [1].

Los analgésicos sin receta habituales, como los antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, paracetamol, ibuprofeno y aspirina), no suelen ser eficaces contra el dolor neuropático. Hay otros tratamientos disponibles, pero la gran variación en la respuesta de los pacientes al tipo y la dosis del agente farmacológico o no farmacológico implica que a menudo es un proceso de "ensayo y error" determinar qué tratamiento será mejor para un individuo en particular. Los tratamientos existentes incluyen los siguientes: antiepilépticos (por ejemplo, gabapentina y pregabalina), antidepresivos (por ejemplo, amitriptilina, duloxetina), opioides (por ejemplo, codeína, dihidrocodeína y morfina, oxicodona, fentanilo, buprenorfina), crema de capsicum, parches de lidocaína, inyecciones/bloqueos nerviosos (normalmente una combinación de un agente anestésico local, opioides y esteroides), estimulación nerviosa eléctrica transcutánea (TENS), estimulación nerviosa eléctrica percutánea (PENS) y acupuntura [2]. La pregabalina (un análogo de GABA), la gabapentina (mecanismo desconocido), la duloxetina (un inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina) y diversos antidepresivos tricíclicos se recomiendan como tratamientos de primera línea para el dolor neuropático periférico y central [1,3]. El objetivo de los tratamientos existentes es hacer que el dolor sea lo más llevadero posible, minimizando al mismo tiempo los efectos secundarios negativos del tratamiento. Todos los tratamientos actuales enumerados causan una gama variable de efectos secundarios graves en el sistema nervioso central (SNC), como sedación, cambios psicológicos, dolor de cabeza, náuseas, problemas visuales, inquietud, falta de atención y pesadillas. El uso de opioides sólo es eficaz a corto plazo, pero provoca tolerancia y dependencia, y pierde eficacia a largo plazo. Por consiguiente, se necesitan nuevos tratamientos eficaces que preserven el SNC y reduzcan los efectos secundarios.

El documento WO 99/27104 A1 describe moléculas de unión a la histamina y la serotonina. El documento WO2009/141621 describe proteínas de unión a la histamina. Sanna et al. (2015), 'Pain', 156(12):2492-2504, explican que la activación del receptor de histamina H4 mitiga el dolor neuropático mediante la regulación diferencial de la fosforilación de P38 MAPK, ERK y JNK. Rosa et al. (2013), 'British Journal of Pharmacology', 170(1):38-45, describen el papel de la histamina en la inflamación neurogénica. Yu et al. (2016), 'Journal of Neuroinflammation', 13:163, describen una ventana de tiempo crítica para el efecto analgésico de la histamina central en el modelo de ligadura ciática parcial del dolor neuropático. Yu et al. (2013), 'Neuroscience Bulletin', 29:261-269, describen los efectos de la histamina en el dolor neuropático espontáneo inducido por la axotomía periférica. Sanna et al. (2016), 'British Journal of Pharmacology',

174(1):28-40, describen que el alivio inducido por un agonista del receptor de histamina H4 respecto a la neuropatía periférica dolorosa está mediado por la inhibición de la neuroinflamación espinal y el estrés oxidativo. Chaumette et al. (2017), 'European Journal of Pain', 22(1):127-141, describen los efectos de S38093, un antagonista/agonista inverso de los receptores de histamina H3, en modelos de dolor neuropático en ratas.

5

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona una proteína de unión a histamina (HBP) para su uso en un método para tratar el dolor neuropático.

10 También se proporciona una molécula de ácido nucleico purificada que codifica una HBP para su uso en un método para tratar el dolor neuropático.

También se proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico purificada como la descrita en el presente documento para su uso en un método para tratar el dolor neuropático.

15

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende una HBP, un ácido nucleico purificado o un vector como los descritos en el presente documento, junto con un portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método para tratar el dolor neuropático.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Las referencias del presente documento a un método de tratamiento que utiliza una HBP, un polinucleótido o un vector deben considerarse como referencias a la HBP, el polinucleótido o el vector para su uso en el método de tratamiento. De manera similar, las referencias a los usos de una HBP, un polinucleótido o un vector en la fabricación de un medicamento para el tratamiento deben considerarse como referencias a la HBP, el polinucleótido o el vector para su uso en el método de tratamiento.

25

La invención proporciona una proteína de unión a histamina para su uso en un método para tratar el dolor neuropático.

30 Se sabe que la amina vasoactiva histamina es un mediador de la inflamación y un regulador de ciertos procesos fisiológicos en animales, incluidos los seres humanos. La histamina está presente en los gránulos secretorios de mastocitos y basófilos y se forma por descarboxilación de la histidina. También está presente en el cornezuelo del centeno y en las plantas y puede sintetizarse sintéticamente a partir de la histidina o del ácido cítrico. La histamina lleva a cabo sus acciones por un efecto sobre los receptores histamínicos específicos, que son de cuatro tipos principales (H1, H2, H3 y H4) y se distinguen mediante fármacos antagonistas y agonistas selectivos [4].

35

Las principales acciones de la histamina en humanos son la estimulación de la secreción gástrica, la contracción de la mayor parte del músculo liso, la estimulación cardíaca, la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad vascular y la vigilia mediante la acción sobre el SNC. Además de su papel regulador en las reacciones inmunes y los procesos inflamatorios, la histamina también modula la producción de muchas citocinas en el cuerpo (incluidas las que regulan la inflamación) y puede interferir en la expresión de los receptores de citocinas. Además, la histamina favorece la cicatrización de las heridas. Se cree que las principales funciones fisiopatológicas de la histamina son la de estimulante de la secreción de ácido gástrico y la de mediador de reacciones de hipersensibilidad de tipo I, como la urticaria y la fiebre del heno. La histamina o sus receptores también pueden estar involucrados directa o indirectamente en diversas enfermedades autoinmunes, por ejemplo la artritis, y en el crecimiento tumoral [4]. Recientemente, se ha sugerido un papel de la histamina en el sistema nervioso sensorial y se ha informado de que los antihistamínicos (dirigidos a los receptores H3 y H4) modifican el dolor neuropático en modelos animales, si bien los resultados son contradictorios, ya que, aparentemente, tanto los agonistas como los antagonistas son eficaces [5]. Creemos que esto se debe en parte a la acción sobre el SNC de los antihistamínicos utilizados. El uso de una proteína de unión a histamina, en particular una proteína de unión a histamina que preserva el SNC, supone una estrategia novedosa para tratar el dolor neuropático, tal y como se describe en el presente documento. Los hallazgos de la presente invención enfatizan la importancia del sistema periférico de histamina en la modulación del dolor neuropático, en particular en la modulación de la hipersensibilidad mecánica (alodinia) y las neuropatías periféricas.

55 La presente invención proporciona una proteína de unión a histamina (HBP) que se usa en un método para tratar el dolor neuropático. En algunas realizaciones, la HBP se obtiene o puede obtenerse de un artrópodo. En algunas realizaciones, la proteína de unión a histamina utilizada en la invención se obtiene o puede obtenerse de parásitos que se alimentan de sangre o de animales productores de veneno, como arañas y serpientes venenosas. Sin embargo, también puede usarse cualquier otra proteína de unión a histamina que sea adecuada. Preferiblemente, las HBP utilizadas en la presente invención se obtienen o pueden obtenerse de ectoparásitos que se alimentan de sangre. Más preferiblemente, se obtienen o pueden obtenerse de garrapatas, por ejemplo de las garrapatas 'Rhipicephalus appendiculatus', 'Dermacentor reticulatus' u 'Ornithodoros moubata', y más preferiblemente de la saliva de garrapata. Se sabe que los ectoparásitos que se alimentan de sangre, como las garrapatas, producen numerosas proteínas bioactivas que inmunomodulan la respuesta del huésped a la alimentación del parásito y, por lo tanto, favorecen la alimentación de sangre del parásito.

65

Los tratamientos existentes para el dolor neuropático descritos anteriormente son principalmente compuestos de moléculas pequeñas, mientras que las HBP descritas en el presente documento son proteínas. Estas HBPs presentan diversos beneficios con respecto a los inhibidores de moléculas pequeñas, ya que actúan a través de los receptores de histamina H1, H3 y H4. Como resultado de ello, las HBP tienen el doble efecto de actuar como analgésicos y antiinflamatorios, lo que generalmente no se observa con los tratamientos existentes, que actúan principalmente como analgésicos.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a histamina es una proteína de garrapata como la descrita en el documento WO 97/44451. En algunas realizaciones, la proteína de unión a histamina se selecciona de entre FS-HBP2, FS-HBP1, MS-HBP1 y D.RET6, o una variante de las mismas. Estas HBP se describen detalladamente en el documento WO 97/44451. En algunas realizaciones, la proteína de unión a histamina (HBP) es FS-HBP2 y comprende o consta de la secuencia presentada en SEQ ID NO:2 (o los aminoácidos 20-190 de SEQ ID NO:2). En algunas realizaciones, la HBP es FS-HBP1 y comprende o consta de la secuencia presentada en SEQ ID NO:4 (o los aminoácidos 19-190 de SEQ ID NO:4). En algunas realizaciones, la HBP es MS-HBP1 y comprende o consta de la secuencia presentada en SEQ ID NO:6 (o los aminoácidos 19-200 de SEQ ID NO: 6). En algunas realizaciones, la HBP es D.RET6 y comprende o consta de la secuencia presentada en SEQ ID NO: 8 (o los aminoácidos 29-209 de SEQ ID NO: 8).

FS-HBP2 es bien conocida en la técnica anterior en este campo [6, 7, 8, 9] y también se conoce como EV131. Anteriormente se descubrió que EV131 es eficaz para tratar diversas enfermedades y afecciones, lo que incluye la conjuntivitis y el prurito. Sin embargo, ninguno de estos indica un papel en el tratamiento del dolor neuropático. El experimento descrito en los ejemplos describe la primera evidencia del efecto analgésico de EV131 sobre la hipersensibilidad mecánica relacionada con el dolor neuropático y su acción preservadora del SNC, enfatizando así la importancia de las proteínas de unión a histamina en la modulación de las neuropatías periféricas.

En algunas realizaciones, la HBP es una HBP preservadora del SNC. En algunas realizaciones, la HBP no cruza la barrera hematoencefálica.

USO TERAPÉUTICO

Tal y como se describe en el presente documento, las HBP de la invención se usan en un método para tratar el dolor neuropático. De manera ventajosa, la invención proporciona un método para tratar el dolor neuropático en el que la histamina desempeña un papel. Por ejemplo, la invención proporciona un método para tratar el dolor neuropático, de manera que el método incluye evitar que la histamina se una a uno o más de sus receptores, por ejemplo evitar que la histamina se una a uno o más de entre los receptores H1, H2, H3 y H4. Preferiblemente, se evita que la histamina se una a cualquiera de los receptores H1, H2, H3 y H4. Preferiblemente, se evita que la histamina se una a cualquiera de sus receptores en la periferia. Los cuatro receptores se encuentran en el SNC y el sistema nervioso periférico (SNP).

En algunas realizaciones, el dolor neuropático está asociado con alodinia (dolor provocado por estímulos normalmente no dolorosos, como un toque ligero), que se observa como hipersensibilidad a estímulos mecánicos. Los ejemplos de hipersensibilidad mecánica incluyen alodinia (característica clínica de muchas afecciones dolorosas), por ejemplo en neuropatías (por ejemplo, diabetes, posquimioterapia), síndrome de dolor regional complejo, neuralgia posherpética, fibromialgia y migrañas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la HBP se usa para tratar la hipersensibilidad mecánica relacionada con el dolor neuropático (también denominada en el presente documento 'hipersensibilidad a los estímulos mecánicos'). En algunas realizaciones, la hipersensibilidad mecánica relacionada con el dolor neuropático es alodinia. En algunas realizaciones, la hipersensibilidad mecánica relacionada con el dolor neuropático es hiperalgia. En algunas realizaciones, la hipersensibilidad mecánica relacionada con el dolor neuropático es alodinia e hiperalgia. En algunas realizaciones, el dolor neuropático está asociado con hipersensibilidad a estímulos térmicos. En algunas realizaciones, el dolor neuropático no está asociado con hipersensibilidad a estímulos térmicos. En algunas realizaciones, la HBP se usa para tratar la hipersensibilidad mecánica relacionada con el dolor neuropático sin afectar a la hipersensibilidad térmica relacionada con el dolor neuropático.

En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado mejoras en las sensaciones de uno o más de los siguientes: tacto (incluido el tacto ligero), ardor o frío, 'hormigueo', entumecimiento, picazón, dolor insoportable y dificultad para percibir correctamente la temperatura. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado mejoras en las sensaciones de uno o más de los siguientes: tacto (incluido el tacto ligero), 'hormigueo', entumecimiento, picazón y dolor insoportable.

En algunas realizaciones, el tratamiento elimina el dolor neuropático. En algunas realizaciones, el tratamiento reduce los síntomas del dolor neuropático (alodinia y/o hiperalgia). En algunas realizaciones, el tratamiento hace que el dolor neuropático sea más llevadero, incluso aunque no lo elimine (es decir, mejora las mediciones de 'calidad de vida' [QoL]).

En la técnica de este campo están disponibles diversas pruebas estándar para evaluar si se ha tratado el dolor neuropático usando un agente particular. Estas resultarán muy conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, la evaluación de la sensibilidad al dolor en humanos se ha estandarizado mediante pruebas sensoriales cuantitativas (pinchazos, algómetro de presión, filamentos de von Frey, tacto, pellizcos, una ligera presión con un dedo) [10].

En algunas realizaciones, la administración de una HBP como se describe en el presente documento reduce los síntomas del dolor neuropático, o elimina el dolor neuropático, de acuerdo con la evaluación de las pruebas sensoriales (por ejemplo, usando una o más pruebas estándar como las descritas en el presente documento, pinchazos, filamentos de von Frey, toquécitos, etc.).

5

Preferiblemente, el uso de la HBP de la invención en un paciente particular no tiene ningún efecto secundario o no tiene uno o más de los efectos secundarios negativos que a menudo se asocian con el uso de otros tratamientos existentes para el dolor neuropático. Estos efectos secundarios incluyen somnolencia, aumento de peso, náuseas, vómitos, dolor abdominal, estreñimiento, hipertensión, sedación, mareos, pérdida de memoria, edema periférico, eritema local, picazón, erupción cutánea, dolor y efectos anticolinérgicos. Preferiblemente, el uso de la HBP de la invención no produce ninguno de estos efectos secundarios. De manera significativa, no se observaron efectos secundarios graves en ninguno de los estudios mencionados cuando se probó la EV131 para el tratamiento del asma (documento WO2009/141621). En algunas realizaciones, el uso de la HBP de la invención no produce ningún efecto secundario grave.

15

En algunas realizaciones, el dolor neuropático es periférico. En algunas realizaciones, el dolor neuropático es central. En algunas realizaciones, el dolor neuropático es periférico pero no central. En algunas realizaciones, el dolor neuropático es una mezcla de periférico y central (por ejemplo, la enfermedad de Parkinson).

20

Preferiblemente, el dolor neuropático es periférico. En algunas realizaciones, el paciente tiene una neuropatía periférica (por ejemplo, una neuropatía diabética). En algunas realizaciones, el paciente tiene neuropatía periférica sensorial. En algunas realizaciones, el dolor neuropático periférico está causado por nervios periféricos dañados, irritados o enfermos. Por ejemplo, en algunas realizaciones el paciente tiene un dolor neuropático inducido por una lesión del nervio periférico. En algunas realizaciones, el dolor afecta a una o más extremidades distales de entre una o más de las siguientes: pies, pantorrillas, manos y antebrazos. En algunas realizaciones, los ganglios sensoriales se ven afectados y el dolor afecta a uno o más de los siguientes: el tronco, los muslos y la parte superior de los brazos. En algunas realizaciones, el dolor neuropático periférico implica a las pequeñas fibras C no mielinizadas y/o las fibras A mielinizadas, concretamente las fibras A β y A δ . El envejecimiento de la población mundial, el creciente sedentarismo, la mayor incidencia de la diabetes mellitus y las enfermedades neurodegenerativas y el uso cada vez mayor de la quimioterapia afectan a las fibras sensoriales (fibras A β , A δ y C), por lo que, probablemente, el dolor neuropático periférico será más común en el futuro. En algunas realizaciones, el paciente tiene más de 50 años, por ejemplo más de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 años. En algunas realizaciones, el paciente tiene diabetes mellitus o (poli)neuropatía diabética. En algunas realizaciones, el paciente está en tratamiento con quimioterapia o se ha sometido previamente a un tratamiento con quimioterapia. En algunas realizaciones, el dolor neuropático periférico está causado por una lesión del nervio ciático, por ejemplo por una lesión por constricción crónica del nervio ciático. En algunas realizaciones, el paciente tiene problemas de nervios periféricos, como una neuropatía causada por una estenosis espinal. En algunas realizaciones, el paciente tiene un trastorno periférico seleccionado de entre uno o más de los siguientes: neuralgia del trigémino, neuralgia posherpética, dolor por lesión del nervio periférico, dolor posamputación, polineuropatía dolorosa y radiculopatía dolorosa. En algunas realizaciones, el paciente tiene un trastorno periférico asociado con una lesión de la médula espinal y/o una cirugía fallida de cadera o espalda.

40

En algunas realizaciones, el trastorno de dolor neuropático periférico tiene una distribución generalizada. En algunas realizaciones, la distribución del dolor es simétrica. En algunas realizaciones, el paciente tiene una neuropatía periférica generalizada asociada con una enfermedad, afección o tratamiento seleccionado de entre los siguientes: diabetes mellitus, prediabetes, disfunción metabólica, una enfermedad infecciosa (por ejemplo, una infección por VIH o lepra), quimioterapia, un trastorno inmunológico (por ejemplo, síndrome de Guillain-Barré), un trastorno inflamatorio o una neuropatía o canalopatía hereditaria (por ejemplo, eritromelalgia hereditaria).

45

En algunas realizaciones, el trastorno de dolor neuropático periférico tiene una distribución focal. En algunas realizaciones, están afectados uno o más nervios periféricos o raíces nerviosas. En algunas realizaciones, el paciente tiene un trastorno periférico focal seleccionado de entre los siguientes: neuralgia posherpética, neuropatía postraumática, neuropatía posquirúrgica, polirradiculopatía cervical y lumbar, dolor asociado con una infección por VIH, lepra, diabetes mellitus, síndrome de dolor regional complejo tipo 2 y neuralgia del trigémino.

50

En algunas realizaciones, el dolor neuropático periférico se experimenta en el territorio del nervio trigémino facial o intraoral. En algunas realizaciones, el dolor neuropático periférico tiene una distribución unilateral en uno o más dermatomas espinales o en el territorio del nervio trigémino (normalmente la división oftálmica). En algunas realizaciones, el dolor neuropático periférico se experimenta en el territorio de inervación del nervio lesionado, que normalmente es distal al sitio de cirugía, traumatismo o compresión. En algunas realizaciones, el dolor neuropático periférico se experimenta en una parte faltante del cuerpo o en un miembro residual. En algunas realizaciones, el dolor neuropático periférico se experimenta en el territorio de inervación de la raíz nerviosa afectada.

55

60

El dolor neuropático central está causado por una lesión o enfermedad de la médula espinal y/o del cerebro [1]. En algunas realizaciones, el paciente tiene dolor neuropático central causado por una lesión o enfermedad de la médula espinal. En algunas realizaciones, el paciente tiene dolor neuropático central causado por una lesión o enfermedad del cerebro. En algunas realizaciones, el paciente tiene dolor neuropático central causado por una lesión o enfermedad de

65

la médula espinal y el cerebro. En algunas realizaciones, el paciente tiene una enfermedad cerebrovascular que afecta a las vías somatosensoriales centrales (dolor post-ictus) o una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, la enfermedad de Parkinson). En algunas realizaciones, el paciente tiene una lesión o enfermedad de la médula espinal, por ejemplo seleccionada de entre las siguientes: lesión de la médula espinal, siringomielia y enfermedades desmielinizantes, como esclerosis múltiple, mielitis transversa y neuromielitis óptica. Estas causan dolor neuropático central.

En algunas realizaciones, el dolor neuropático es crónico. En algunas realizaciones, el dolor neuropático es agudo.

En algunas realizaciones, el paciente tiene un dolor neuropático que está causado por uno o más de los siguientes factores: presión nerviosa o daño nervioso después de una cirugía o un traumatismo, una infección vírica, cáncer, una malformación vascular, alcoholismo, una enfermedad neurológica como esclerosis múltiple, una enfermedad metabólica como diabetes, un efecto secundario de un medicamento o quimioterapia.

VARIANTES Y FRAGMENTOS DE LAS HBP

La invención también comprende variantes de las HBP descritas en el presente documento y variantes de otras HBP conocidas o de origen natural para su uso en un método para tratar el dolor neuropático. Las variantes incluyen variantes biológicas naturales (por ejemplo, variantes alélicas o variaciones geográficas dentro de las especies de las que se obtienen las HBP). Las variantes también incluyen variantes que no se producen de forma natural, como las variantes sintéticas. La presente invención también incluye proteínas que pertenecen a la misma familia de proteínas que las HBP descritas en el presente documento. En la invención también se incluyen fragmentos de las proteínas de unión a histamina, fragmentos de las variantes y fragmentos de las proteínas que pertenecen a la misma familia que las HBP descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, una variante tiene (es decir, comprende o consta de) una secuencia de proteína que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia) con una secuencia de HBP conocida, por ejemplo una secuencia de HBP como la que se describe en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la HBP utilizada en la invención es una variante que tiene (es decir, comprende o consta de) una secuencia de proteína que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad de secuencia) con SEQ ID NO:2. Otros ejemplos de variantes incluyen variantes de proteínas maduras (por ejemplo, SEQ ID NO 2, 4, 6 u 8), que carecen de las secuencias señal (por ejemplo, tal y como se muestra en las Figuras 6-9 y se menciona en el documento WO 97/44451, por ejemplo los aminoácidos 20-190, 19-190, 19-200 y 29-209 de SEQ ID NO 2, 4, 6 y 8, respectivamente). Preferiblemente, la identidad de secuencia entre secuencias de polinucleótidos se determina mediante un algoritmo de alineación por pares usando el algoritmo de alineación global de Needleman-Wunsch [11], usando parámetros predeterminados (por ejemplo, con penalización por apertura de espacio = 10,0 y con penalización por extensión de espacio = 0,5, usando la matriz de puntuación EDNAFULL). De manera conveniente, este algoritmo está implementado en la herramienta de aguja del paquete EMBOSS [12]. De esta manera, la identidad de secuencia se calcula a lo largo de toda la longitud de la secuencia de polipéptido de referencia. La herramienta de aguja del paquete EMBOSS también puede usarse para determinar la identidad de secuencia entre secuencias de polipéptidos.

En algunas realizaciones, una variante comprende una secuencia de proteínas como la descrita en el presente documento (por ejemplo, SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 o los aminoácidos 20-190, 19-190, 19-200 y 29-209 de SEQ ID NO 2, 4, 6 y 8, respectivamente) o comprende la secuencia de proteínas de otra HBP de origen natural que contiene sustituciones, adiciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos únicas o múltiples respecto a la secuencia de proteínas dada y/o sustituciones de aminoácidos modificados químicamente. En algunas realizaciones, la variante comprende no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 19 o 20 de dichas sustituciones, adiciones, inserciones o deleciones.

Preferiblemente, la variante conserva la función biológica de unión a la histamina. La capacidad de la HBP para unirse a la histamina puede medirse directamente mediante la detección de complejos de HBP-histamina. En algunas realizaciones, la variante evita que la histamina se una a uno o más de los receptores H1, H2, H3 y H4, por ejemplo a cualquiera de los receptores H1, H2, H3 y H4. En algunas realizaciones, la variante evita que la histamina se una a cualquiera de sus receptores en la periferia. La capacidad de la HBP para evitar que la histamina se una a uno o más de sus receptores se puede medir indirectamente, por ejemplo mediante un ensayo que mide un cambio en una célula causado por la reducción de los niveles de histamina debido a la actividad de la HBP. Por ejemplo, puede medirse evaluando la inhibición de la producción de IL-6 inducida por histamina por parte de células HUVEC. Preferiblemente, la HBP puede inhibir la mencionada producción de IL-6 en al menos un 80%. Preferiblemente, la variante es capaz de reducir la hipersensibilidad mecánica relacionada con el dolor neuropático en un ratón macho adulto C57BL/6J (B6) en el que el dolor se ha inducido mediante una lesión por constricción crónica del nervio ciático, por ejemplo de manera que al ratón se le administra la variante en una dosis de 10 mg/kg i.p. (intraperitoneal) utilizando un régimen de 4 inyecciones cada 24 horas durante 4 días. Preferiblemente, la variante puede reducir la hipersensibilidad mecánica relacionada con el dolor neuropático en el ratón macho adulto C57BL/6J (B6) en la misma medida o en mayor medida que la EV131, por ejemplo cuando se administra en las mismas condiciones y en las mismas dosis.

En algunas realizaciones, el fragmento es un fragmento activo de una HBP, por ejemplo un fragmento activo de EV131 (por ejemplo, un fragmento activo de la proteína con la secuencia enumerada en SEQ ID NO:2) o un fragmento activo de una variante de una secuencia de HBP conocida (por ejemplo, un fragmento activo de una variante de SEQ ID NO:2), de manera que la expresión 'fragmento activo' denota una proteína truncada que conserva la función biológica de unión a la histamina. Anteriormente se han descrito diversos ejemplos de métodos para determinar la capacidad de unirse a la histamina. En algunas realizaciones, el fragmento evita que la histamina se una a uno o más de los receptores H1, H2, H3 y H4, por ejemplo a cualquiera de los receptores H1, H2, H3 y H4. En algunas realizaciones, el fragmento evita que la histamina se una a cualquiera de sus receptores en la periferia. Anteriormente se han descrito diversos ejemplos de métodos para determinar la capacidad de evitar que la histamina se una a sus receptores. Preferiblemente, el fragmento es capaz de reducir la hipersensibilidad mecánica relacionada con el dolor neuropático en un ratón macho adulto C57BL/6J (B6) en el que el dolor se ha inducido mediante una lesión por constricción crónica del nervio ciático, por ejemplo de manera que al ratón se le administra la variante en una dosis de 10 mg/kg i.p. utilizando un régimen de 4 inyecciones cada 24 horas durante 4 días. Preferiblemente, el fragmento puede reducir la hipersensibilidad mecánica relacionada con el dolor neuropático en el ratón macho adulto C57BL/6J (B6) en la misma medida que la EV131.

En algunas realizaciones, el fragmento tiene al menos 80 aminoácidos de longitud, por ejemplo al menos 100, 120, 140, 150, 160, 170, 180, 185 o 188 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el fragmento está truncado en no más de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 19, 20 o 25 aminoácidos del extremo N- y/o C-terminal de la secuencia de HBP de longitud completa. Un fragmento activo de una HBP no contiene la longitud completa de la secuencia de la HBP. Tal y como se ha explicado, los ejemplos específicos de fragmentos activos incluyen fragmentos de SEQ ID NO 2, 4, 6 y 8 (o variantes de los mismos) que carecen de los aminoácidos 1-19, 1-18, 1-18 y 1-28 de SEQ ID NO 2, 4, 6 y 8, respectivamente.

En algunas realizaciones, el fragmento comprende la secuencia presentada en SEQ ID NO:10. Esta secuencia corresponde a la secuencia de FS-HBP2, que tiene la SEQ ID NO:2. Sin embargo, la proteína carece de los primeros 19 aminoácidos de la secuencia de FS-HBP2. Por consiguiente, la secuencia comienza en la posición 20 de la secuencia de FS-HBP2. Sin embargo, de manera adicional, se ha añadido un residuo de metionina a la secuencia en el extremo N-terminal. Además, en la posición 146 de la secuencia de aminoácidos de la proteína de la invención hay un residuo de Leucina que sustituye al residuo de Prolina que ocupa la posición 164 en la secuencia de aminoácidos de la proteína FS-HBP2. Esta proteína se describe en el documento WO 2009/141621. SEQ ID NO: 10 es un ejemplo de una HBP que carece de la secuencia señal y, por lo tanto, puede describirse como una 'proteína madura'. Así, estas 'proteínas maduras' pueden describirse como fragmentos de HBPs. Un ejemplo adicional de una proteína madura es SEQ ID NO:11.

La HBP utilizada en la invención puede formar parte de una proteína de fusión. Por ejemplo, a menudo resulta ventajoso incluir una o más secuencias de aminoácidos adicionales que pueden contener secuencias secretoras o secuencias líder, prosecretoras, secuencias que ayudan en la purificación o secuencias que confieren una mayor estabilidad proteica, por ejemplo durante la producción recombinante, o que hacen que el polipéptido sea detectable mediante tecnología de imágenes. Por ejemplo, un derivado puede incluir una proteína o polipéptido adicional fusionado con la HBP en su extremo amino o carboxi o añadido internamente a la HBP. El propósito del polipéptido adicional puede ser proporcionar propiedades adicionales a la HBP según se desee. Los ejemplos de posibles compañeros de fusión incluyen los siguientes: β -galactosidasa, glutatión-S-transferasa, luciferasa, etiquetas de polihistidina, fragmentos de polimerasa T7 y péptidos señal de secreción. Otros ejemplos incluyen los siguientes: dominios extracelulares de proteínas unidas a membrana, regiones constantes de inmunoglobulina (regiones Fc), dominios de multimerización, dominios de proteínas extracelulares, secuencias señal, secuencias de exportación y secuencias que permiten la purificación mediante cromatografía de afinidad o secuencias que permiten la obtención de imágenes, por ejemplo polipéptidos fluorescentes. Otros ejemplos resultarán evidentes para los expertos en la técnica de este campo. Por ejemplo, una HBP usada en la invención también puede comprender una etiqueta de histidina, preferiblemente situada en el extremo C-terminal del polipéptido, que generalmente comprende entre 1 y 10 residuos de histidina, particularmente 6 residuos de histidina. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una HBP que es una variante o un fragmento como los descritos en el presente documento. Preferiblemente, el fragmento es un fragmento activo.

La HBP usada en la invención se une a la histamina con una alta afinidad. Preferiblemente, la HBP se une a la histamina con una constante de disociación de menos de 10^{-7} M, más preferiblemente menos de 10^{-8} M, menos de 10^{-9} M o menos de 10^{-10} M. Por ejemplo, la HBP puede unirse a la histamina con una constante de disociación inferior a 10^{-7} M pero superior a 10^{-12} M y, más preferiblemente, inferior a 10^{-8} M pero superior a 10^{-11} M, o inferior a 10^{-9} M pero superior a 10^{-10} M.

En algunas realizaciones, la HBP se une específicamente a la histamina con una constante de disociación inferior a 10^{-7} M y pertenece a la misma familia de proteínas que MS-HBP1, FS-HBP1, FS-HBP2 y D.RET6. En algunas realizaciones, se considera que una proteína pertenece a esta familia si el 70% o más de los aminoácidos que se conservan completamente como residuos idénticos en el alineamiento de las cuatro HBP solas, todavía se conservan completamente como residuos idénticos si la proteína se incluye en el alineamiento, de manera que los alineamientos se obtienen usando el comando de acumulación de GCG (Manual de programa para el paquete Wisconsin, 1994;

penalización por creación de espacios = 2,50; penalización por extensión de espacios = 0,05). También se incluyen como miembros de esta familia de HBP's aquellas proteínas de artrópodos hematófagos que se unen a la histamina con una afinidad caracterizada por una constante de disociación inferior a 10^{-7} M y que contienen los motivos de secuencia D/E A W K/R e Y/C E/D L/I W.

5

En algunas realizaciones, la HBP se selecciona de entre:

10

(a) cualquier proteína de unión a histamina que se une específicamente a la histamina con una constante de disociación inferior a 10^{-7} M y que pertenece a la misma familia de proteínas que las proteínas MS-HBP1, FS-HBP1 y FS-HBP-2 desveladas en el documento W097/44451, de manera que se considera que una proteína pertenece a esta familia de proteínas si la secuencia monomérica madura primaria de la proteína no tiene más de 260 aminoácidos y al menos 30 de los aminoácidos en la secuencia completa de la proteína se conservan como residuos idénticos en un alineamiento de dicha proteína y las proteínas MS-HBP1, FS-HBP1 y FS-HBP-2, de manera que el alineamiento se obtiene preferiblemente usando el comando de acumulación de GCG (Manual de programa para el paquete Wisconsin, 1994; penalización por creación de espacios = 3; penalización por extensión de espacios = 1, matriz de puntuación Blosum62.cmp, acumulación realizada usando la opción de peso final);

15

(b) una proteína de un artrópodo hematófago que se une específicamente a histamina con una constante de disociación inferior a 10^{-7} M y que contiene los motivos de secuencia D/E A W K/R (preferiblemente DAWK y, más preferiblemente, QDAWK) e Y/C E/D L/I/F W (preferiblemente Y/C ELW);

20

(c) una variante biológica natural, por ejemplo una variante alélica o una variante geográfica, de una proteína tal y como se ha definido anteriormente en (a) o (b);

25

(d) un equivalente funcional de una proteína tal y como se ha definido anteriormente en (a), (b) o (c) que contiene sustituciones, adiciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos simples o múltiples con respecto a la secuencia de proteína de tipo natural y/o sustituciones de aminoácidos químicamente modificados que no afectan a la función biológica de unión a su respectiva amina vasoactiva;

30

(e) un fragmento activo de una proteína tal y como se ha definido anteriormente en (a), (b), (c) o (d), de manera que la expresión 'fragmento activo' denota una proteína truncada que conserva la función biológica de unión a la histamina (por ejemplo, una proteína que carece de su secuencia señal, tal y como se explica en otra parte del presente documento); y

(f) una proteína de fusión que comprende una proteína tal y como se ha definido anteriormente en (a), (b), (c), (d) o (e) fusionada con un péptido u otra proteína, por ejemplo un marcador, que puede ser -por ejemplo- bioactivo, radiactivo, enzimático o fluorescente, o un anticuerpo.

35

En algunas realizaciones, una proteína pertenece a la misma familia que las proteínas MS-HBP1, FS-HBP1 y FS-HBP-2 desveladas en el documento W097/44451 si contiene más de 40, más preferiblemente más de 50, más preferiblemente más de 60 y, más preferiblemente, 70 residuos o más que son idénticos -tal y como se ha definido anteriormente en a)- cuando se alinean con las proteínas que se muestran en la Tabla 1.

40

La HBP utilizada en la invención también se une específicamente a la histamina. El término 'específicamente' significa que la HBP tiene una afinidad considerablemente mayor por la histamina que por otros compuestos. Por 'afinidad considerablemente mayor' se entiende que hay un aumento mensurable en la afinidad por la histamina de una HBP usada en la invención en comparación con su afinidad por otros compuestos. Preferiblemente, este aumento mensurable de la afinidad es al menos 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces o 10^6 veces mayor o más para la histamina que para otros compuestos. Los expertos en la técnica de este campo conocerán los métodos para medir la especificidad, que incluyen ensayos de competición y similares.

45

Se ha descubierto que las HBP descritas en el presente documento son estables. Preferiblemente, la HBP usada en la invención es estable. Por ejemplo, preferiblemente la proteína es estable a temperatura ambiente (aproximadamente 19°C - 25°C , o aproximadamente 20°C). Preferiblemente, la semivida de la proteína es superior a una hora, preferiblemente superior a 5 horas, preferiblemente superior a 10 horas, preferiblemente superior a 24 horas y, más preferiblemente, superior a 48 horas o más, a temperatura ambiente. Preferiblemente, la HBP es estable durante su almacenamiento a 4°C o a una temperatura ambiente de 25°C durante al menos 52 semanas. Preferiblemente, la semivida de la proteína es de más de una semana, preferiblemente más de dos semanas, preferiblemente más de 4 semanas, preferiblemente más de 12 semanas, preferiblemente más de 26 semanas y, preferiblemente, más de 52 semanas o más a temperatura ambiente o a una temperatura de almacenamiento (aproximadamente 4°C). Esto facilita el trabajo con la HBP y facilita, por ejemplo, su manipulación y su administración como fármaco a un paciente.

55

La estabilidad de la HBP se puede medir evaluando si conserva la integridad molecular con el paso del tiempo, por ejemplo si su peso molecular se altera con el tiempo como resultado de la degradación o la agregación. Esto puede evaluarse mediante métodos estándar conocidos en la técnica de este campo, como SDS-PAGE. La estabilidad también se puede medir evaluando la actividad de la proteína, ya que una preparación de proteína estable habrá conservado básicamente toda su afinidad de unión a la histamina. La capacidad de la HBP para conservar la actividad de unión a la histamina se puede medir directamente mediante la detección de complejos de HBP-histamina. De manera alternativa, la capacidad de la HBP para conservar la actividad de unión a la histamina se puede medir indirectamente, por ejemplo mediante un ensayo que mide un cambio en una célula causado por la reducción de los niveles de histamina debido a la

65

actividad de la HBP. Por ejemplo, la eliminación de histamina mediante HBPs disminuye la producción de IL-6 dependiente de histamina en monocapas de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) activadas por TNF α . Por consiguiente, la estabilidad de la HBP puede evaluarse determinando el efecto de la HBP sobre la liberación de IL-6 por parte de dichas células. Preferiblemente, la HBP de la invención inhibe la producción de IL-6 inducida por histamina por parte de células HUVEC en al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90% y, preferiblemente, al menos un 95%, después de su almacenamiento a temperatura ambiente o a una temperatura de almacenamiento (aproximadamente 4°C) durante al menos 52 semanas.

La estabilidad de la proteína también puede estimarse a partir de su secuencia, por ejemplo usando una herramienta bioinformática (ProtParam [ExpASY, Suiza]). De acuerdo con esta evaluación, preferiblemente la semivida estimada de la proteína es de entre 20 y 40 horas, y más preferiblemente de aproximadamente 30 horas, en un sistema mamífero representativo (reticulocitos de mamífero, 'in vitro'); preferiblemente, la semivida estimada de la proteína es de más de 10 horas, y más preferiblemente de más de 20 horas, en levadura 'in vivo'; preferiblemente, la semivida estimada de la proteína es de más de 5 horas, y más preferiblemente de más de 10 horas, en 'Escherichia coli', 'in vivo'.

Preferiblemente, la HBP usada en la invención tiene una semivida en ratas de al menos 7 horas. Preferiblemente, la HBP tiene una semivida en un mamífero 'in vivo', preferiblemente un ser humano, de más de 2 horas, preferiblemente más de 5 horas, preferiblemente más de 6 horas y, preferiblemente, más de 7 horas. La semivida 'in vivo' puede aumentarse mediante conjugación o fusión de la HBP con moléculas conocidas en la técnica para este fin, por ejemplo polietilenglicol.

Las HBP usadas en la presente invención pueden prepararse usando técnicas conocidas de biología molecular o química de proteínas (por ejemplo, síntesis química de péptidos). Preferiblemente, las HBP se preparan usando técnicas conocidas de ingeniería genética, tal y como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., 'Molecular Cloning; A Laboratory Manual', segunda edición (1989), volúmenes I y II (D.N. Glover ed., 1985); B. Perbal, 'A Practical Guide to Molecular Cloning' (1984); 'Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells' (J.H. Miller y M.P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); y Scopes (1987), 'Protein Purification: Principles and Practice', segunda edición (Springer Verlag, Nueva York). Por ejemplo, las HBP usadas en la presente invención pueden prepararse en forma recombinante mediante expresión en una célula huésped. Así, un aspecto adicional de la invención proporciona un método para preparar una HBP de la invención que incluye cultivar una célula huésped que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica una HBP para su uso en la invención en condiciones en las que se expresa dicha proteína y extraer dicha proteína así producida. Estos métodos de expresión resultan muy conocidos para los expertos en la técnica de este campo y muchos de ellos son descritos con detalle por Sambrook et al., 1989. Puede elegirse un vector de expresión adecuado para el huésped elegido. El vector puede contener una molécula de ADN recombinante que codifica una HBP unida operativamente a una secuencia de control de expresión que es reconocida por la maquinaria de transcripción del huésped. Los huéspedes adecuados incluyen especies procariotas usadas comúnmente, como 'E. coli', o levaduras eucariotas a las que se puede obligar a expresar altos niveles de proteínas recombinantes y que pueden cultivarse fácilmente en grandes cantidades. También son adecuadas las líneas celulares cultivadas 'in vitro', particularmente cuando se usan sistemas de expresión impulsados por virus, como el sistema de expresión de 'Baculovirus', que conlleva el uso de células de insecto como huéspedes.

Las HBP también pueden expresarse 'in vivo', por ejemplo en larvas de insectos o en tejidos de mamíferos. Preferiblemente, la proteína HBP se expresa en E. coli; por ejemplo, resulta adecuada la cepa BLR(DE3). Por ejemplo, la proteína puede expresarse a partir de un plásmido basado en pET24a (Novagen), aunque los sistemas equivalentes son igualmente adecuados, como bien sabrá el lector experto.

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico purificada que codifica una HBP como la descrita en el presente documento para su uso en un método para tratar el dolor neuropático. Estas moléculas incluyen el ADN, el ADNc y el ARN, así como las variedades de ácidos nucleicos sintéticos. Preferiblemente, el término 'molécula de ácido nucleico purificada' se refiere a una molécula de ácido nucleico que se usa en la invención y que (1) se ha separado de al menos aproximadamente el 50 por ciento de las proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que se encuentra naturalmente cuando el ácido nucleico total se aísla de las células fuente; (2) no está unida a todo o a una porción de un polinucleótido al que la 'molécula de ácido nucleico purificada' está unida en la naturaleza; (3) está unida operativamente a un polinucleótido al que no está unida en la naturaleza; o (4) no existe en la naturaleza como parte de una secuencia de polinucleótidos más grande. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico purificada utilizada en la presente invención está básicamente libre de cualquier otra molécula de ácido nucleico contaminante u otros contaminantes que se encuentren en su entorno natural y que interferirían en su uso en la producción de proteínas o su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico o de investigación. Preferiblemente, la 'molécula de ácido nucleico purificada' sólo está compuesta de ADNc. Los ADNc que codifican las HBPs FS-HBP2, FS-HBP1, MS-HBP1 y D.RET6 se desvelan en el presente documento a modo de ejemplo en las SEQ ID NO: 1, 3, 5 y 7, respectivamente. En SEQ ID NO:9 se proporciona un ADNc que codifica el fragmento activo de FS-HBP2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10 y que carece de los 19 aminoácidos N-terminales de FS-HBP2, descrita anteriormente. También pueden usarse ADNc que codifican fragmentos activos, que pueden ser, por ejemplo, proteínas maduras; por ejemplo, la molécula de ácido nucleico purificada puede comprender o constar de los nucleótidos 87-599 de SEQ ID NO: 1, los nucleótidos 66-581 de SEQ ID NO: 3, los nucleótidos 72-612 de SEQ ID NO: 5 o los nucleótidos 85-627 de SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico purificada comprende o consta de la secuencia de ácido

nucleico descrita en cualquiera de las SEQ ID Nos.: 1, 3, 5, 7 o 9, de manera que, más preferiblemente, comprende o consta de la secuencia de ácido nucleico descrita en cualquiera de las SEQ ID Nos.: 1, 3, 5 o 7, o bien es un fragmento o equivalente redundante de cualquiera de estas secuencias. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico purificada comprende o consta de la secuencia de ácido nucleico descrita en SEQ ID NO:1 (que codifica EV131) o es un fragmento o equivalente redundante de esta secuencia.

En una realización adicional, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico purificada que se hibrida en condiciones de alta severidad con una molécula de ácido nucleico purificada como la descrita en el presente documento, para su uso en un método para tratar el dolor neuropático. Las condiciones de hibridación de alta severidad consisten en una incubación durante la noche a 42 °C en una solución que comprende formamida al 50%, 5X SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato trisódico), 50 mM de fosfato de sodio (pH 7.6), 5x solución Denhardts, 10% de sulfato de dextrano y 20 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, seguido de un lavado de filtros en 0,1X SSC a aproximadamente 65 °C. En otra realización, la molécula de ácido nucleico purificada es básicamente homóloga a la mencionada secuencia. Por 'básicamente homóloga(s)' se entienden aquellas secuencias que presentan al menos un 60% de homología de secuencia, por ejemplo, al menos un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología de secuencia.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un vector, por ejemplo un vector de expresión, que contiene una molécula de ácido nucleico purificada como la descrita anteriormente, para su uso en un método para tratar el dolor neuropático. Además, puede resultar conveniente hacer que determinados huéspedes secreten la proteína recombinante. Así, otros componentes adicionales de estos vectores pueden incluir secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de procesamiento y señalización de secreciones. La invención también proporciona una célula huésped transformada con un vector de este tipo para su uso en un método para tratar el dolor neuropático.

También pueden usarse moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención para crear animales transgénicos. Esto se puede hacer localmente mediante modificación de células somáticas o mediante terapia de línea germinal para incorporar modificaciones heredables. Por lo tanto, la invención también incluye células huésped procariotas o eucariotas transformadas o transfectadas u organismos transgénicos que contienen una molécula de ácido nucleico purificada de acuerdo con la invención, tal y como se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una HBP, una molécula de ácido nucleico, un vector o una célula huésped de acuerdo con los aspectos de la invención descritos anteriormente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método para tratar el dolor neuropático. Preferiblemente, estas composiciones farmacéuticas comprenden HBPs de acuerdo con la invención, que opcionalmente incluyen un vehículo o vehículos inertes. La HBP puede ser el único componente activo de la composición o puede formar parte de un compuesto terapéutico, por ejemplo como componente de una píldora, crema, aerosol, polvo, aceite o composición acuosa. En el caso de una composición acuosa, evidentemente esta puede liofilizarse para su distribución, y finalmente el material liofilizado puede reconstituirse con un vehículo acuoso para su administración a los pacientes. Así, cualquier proceso para preparar una composición de acuerdo con la invención también puede incluir los pasos de liofilizar la composición y después, opcionalmente, reconstituir la composición con un medio acuoso.

En una realización, la HBP de la invención se prepara en un tampón de formulación, fosfato de sodio (12,6 mM), cloruro de sodio (124 mM), pH 7.2. Después, la proteína se diluye en serie a partir de esta solución madre en PBS.

En otra realización, la HBP de la invención se puede preparar como una crema, preferiblemente una crema a base de agua.

En otra realización, la HBP de la invención puede ser un aerosol, que preferiblemente comprende polvo seco con lactosa, con HFA (hidrofluoroalcano) como propelente.

Una vez formuladas, las composiciones de este aspecto de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales; en particular, pueden tratarse sujetos humanos.

La invención también proporciona un método para tratar a un paciente que incluye administrar una composición farmacéutica de la invención al paciente. Preferiblemente, el paciente es un ser humano, y puede ser un niño (por ejemplo, un niño pequeño o un bebé), un adolescente o un adulto, pero generalmente será un adulto. La invención también proporciona composiciones de HBP de la invención para su uso como medicamento. La invención también proporciona el uso de HBPs y otras composiciones de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente. Estos usos, métodos y medicamentos son para tratar el dolor neuropático.

Las composiciones de acuerdo con la invención deben administrarse directamente a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión 'cantidad terapéuticamente eficaz' se refiere a una cantidad de HBP necesaria para tratar, mejorar o prevenir la enfermedad o afección objetivo, o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular, por ejemplo de células neoplásicas,

o en modelos animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también puede usarse para determinar el rango de concentración y la vía de administración adecuados. Después, esta información puede usarse para determinar dosis y vías útiles para la administración en humanos.

- 5 La administración directa se puede realizar mediante inyección parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular o en el espacio intersticial de un tejido), o por vía rectal, oral, vaginal, tópica, transdérmica, intranasal, ocular, auditiva, pulmonar u otra vía mucosa de administración. El modo de administración exacto dependerá de la ubicación del dolor neuropático a tratar y/o de la ubicación de la patología que causa el dolor neuropático. Los modos de administración preferidos incluyen los siguientes: inyección, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración tópica, administración subcutánea e inhalación (particularmente, subcutánea o tópica, por ejemplo subcutánea). En algunas realizaciones, la HBP se administra mediante inyección intraperitoneal o inyección intraplantar.

- 10 Normalmente, la dosificación de la HBP se ajusta al tamaño corporal del paciente, medido mediante el peso corporal (kg) o mediante el área de superficie corporal (BSA; medida en m² y medida o estimada mediante una combinación de la altura y el peso del paciente). Si bien no existe una conversión exacta para la dosificación entre el peso y la BSA, existe una buena aproximación: para una persona de peso y altura promedio (percentil 50 para cada uno), 25000 UI/kg = 1 MUI/m².

- 20 El tratamiento puede incluir un esquema de dosis única o un esquema de dosis múltiples. Puede usarse cualquier dosificación que sea eficaz. La cantidad eficaz exacta para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, la hora y la frecuencia de administración, la HBP particular que se esté utilizando, la combinación de medicamentos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse mediante experimentación rutinaria y está sujeta al criterio del médico. En algunas realizaciones, la dosis eficaz de una HBP a la que se hace referencia en el presente documento es de más de 3 mg/kg, por ejemplo más de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 o 40 mg/kg. En algunas realizaciones, la dosis eficaz de una HBP a la que se hace referencia en el presente documento es de 4 a 40 mg/kg, de 4 a 30 mg/kg, de 4 a 20 mg/kg, de 5 a 15 mg/kg, de 8 a 12 mg/kg, de 9 a 11 mg/kg o de aproximadamente 10 mg/kg. En algunas realizaciones, se administran de una a seis dosis (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6), o hasta 1, 2, 3, 4, 5 o 6, cada 24 horas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se administran cuatro dosis cada 24 horas. El tratamiento puede administrarse por un período de días, semanas, meses o años. Preferiblemente, se administra una dosis cada 24 horas.

- 35 Se ha demostrado que dosis más bajas pueden lograr un tratamiento eficaz del dolor neuropático cuando se administran localmente, es decir, cerca del lugar del dolor, por ejemplo a 2, 5, 10 o 20 cm del lugar del dolor. A modo de ejemplo, la administración cercana al lugar del dolor es una administración local, por ejemplo mediante administración subcutánea o administración tópica. Para la administración subcutánea, las dosis de HBP pueden ser, por ejemplo, de 2-10 mg/kg, 4-8 mg/kg o aproximadamente 6 mg/kg, por ejemplo con la misma frecuencia descrita anteriormente.

- 40 A modo de ejemplo, en algunas realizaciones, la HBP comprende o consta de la secuencia de aminoácidos que incluye los aminoácidos 20 a 190 de la SEQ ID NO:2, o bien es la SEQ ID NO:11, o bien es una secuencia que tiene al menos un 70, 80, 90, 95, 98 o 99% de identidad con los aminoácidos 20 a 190 de SEQ ID NO:2, o con SEQ ID NO:11, y/o el dolor neuropático es dolor neuropático periférico y/o el método de administración es la administración subcutánea. Preferiblemente, el dolor neuropático es dolor neuropático periférico y el método de administración es la administración subcutánea. Las HBP de la invención pueden usarse como ingrediente activo de productos farmacéuticos. Estos productos farmacéuticos se pueden usar solos para tratar a pacientes, o se pueden usar junto con otros ingredientes activos, por ejemplo con otros productos farmacéuticos o no farmacéuticos usados para tratar el dolor neuropático. Normalmente, las HBP no se mezclarán con ningún otro ingrediente activo antes de la administración; antes bien, la HBP y los demás ingredientes activos se administrarán como medicamentos independientes separados en un protocolo combinado. Por consiguiente, la invención proporciona (a) HBPs de la invención y (b) un segundo agente farmacéutico, para su administración simultánea, separada o secuencial. La invención también proporciona un sistema o preparación farmacéutica, que comprende (a) un primer agente farmacéutico, que comprende HBPs de la invención; y (b) un segundo agente farmacéutico, de manera que los mencionados primer agente y segundo agente están mezclados o bien son composiciones separadas, por ejemplo para una administración simultánea, ya sea separada o secuencial. La invención también proporciona un kit, que comprende (a) un primer agente farmacéutico, que comprende HBPs de la invención; y (b) un segundo agente farmacéutico. Los ejemplos del segundo agente farmacéutico incluyen los agentes bloqueantes de la histamina (por ejemplo, agentes antagonistas de los receptores de histamina y que preservan el SNC) y los antagonistas de los receptores H1, H2, H3 y/o H4. El uso de uno o más tipos adicionales de moduladores de histamina puede mejorar aún más el efecto de modular la histamina en el dolor neuropático. Otros ejemplos de segundos agentes farmacéuticos para el dolor neuropático incluyen los agentes actualmente conocidos para tratar el dolor neuropático, por ejemplo, antiepilépticos (por ejemplo, gabapentina y pregabalina), antidepresivos (por ejemplo, amitriptilina, duloxetina), opioides (por ejemplo, codeína, dihidrocodeína y morfina, oxicodona, fentanilo, buprenorfina), crema de capsicum, parches de lidocaína e inyecciones/bloqueos nerviosos (generalmente una combinación de un agente anestésico local, opioides y esteroides). De manera alternativa, la HBP de la invención se puede administrar junto con una terapia alternativa, por ejemplo estimulación nerviosa eléctrica transcutánea (TENS), estimulación nerviosa eléctrica percutánea (PENS) o acupuntura [2]. En algunas realizaciones, la

HBP de la invención se administra junto con una proteína inhibidora de LTB4 (por ejemplo, esculetina) [13].

Las HBP de la invención también pueden administrarse en combinación con otros agentes farmacéuticos conocidos por tratar la enfermedad de Parkinson u otros trastornos relacionados. Estos agentes incluyen, por ejemplo, los agonistas de la dopamina, como pramipexol (Mirapex), ropinirol (Requip), rotigotina (administrada en forma de parche, Neupro) y apomorfina (Apokyn). Otros agentes conocidos para tratar la enfermedad de Parkinson o un trastorno relacionado incluyen, por ejemplo, los siguientes: levodopa; inhibidores de la monoaminooxidasa B (MAO-B), como selegilina (E ldepryl, Zelapar), safinimida (Xadigo) y rasagilina (Azilect); inhibidores de catecol O-metiltransferasa (COMT), como entacapona (Comtan) y tolcapone (Tasmar); medicamentos anticolinérgicos, como benzotropina (Cogentin) o trihexifenidilo; y amantadina.

La invención también proporciona el uso de (a) HBPs de la invención y (b) un segundo agente farmacéutico, en la fabricación de un medicamento combinado.

La invención también proporciona el uso de HBPs de la invención en la fabricación de un medicamento, de manera que el medicamento se coadministra con un segundo agente farmacéutico. De un modo similar, la invención proporciona el uso de un segundo agente farmacéutico en la fabricación de un medicamento, de manera que el medicamento se coadministra con microagregados de HBPs de la invención. En algunas realizaciones, los dos agentes se administran con 4 horas de diferencia.

La invención también proporciona el uso de HBPs de la invención en la fabricación de un medicamento, de manera que el medicamento es para administrarse a un paciente que ha sido pretratado con un segundo agente farmacéutico. De un modo similar, la invención proporciona el uso de un segundo agente farmacéutico en la fabricación de un medicamento, de manera que el medicamento es para administrarse a un paciente que ha sido pretratado con HBPs de la invención. El pretratamiento puede ser reciente (por ejemplo, dentro de las 24 horas anteriores a la administración del mencionado medicamento), intermedio (por ejemplo, más de 24 horas antes, pero no más de 4 semanas), más antiguo (por ejemplo, al menos 4 semanas antes) o muy antiguo (por ejemplo, al menos 6 meses antes), y estos períodos de tiempo se refieren a la dosis más reciente previa al tratamiento. El paciente puede ser reactivo al tratamiento con el agente farmacéutico que se le administró en el pretratamiento.

Se puede utilizar terapia génica para propiciar la producción endógena de una proteína de unión a histamina por parte de células específicas de un paciente. La terapia génica puede realizarse 'in vivo' o 'ex vivo'. La terapia génica 'ex vivo' requiere el aislamiento y la purificación de las células del paciente, la introducción del gen terapéutico y la introducción de las células genéticamente alteradas nuevamente en el paciente. Por el contrario, la terapia génica 'in vivo' no requiere el aislamiento ni la purificación de las células del paciente. Normalmente, el gen terapéutico está 'envasado' para su administración a un paciente. Los vehículos de administración de genes pueden ser no virales, como liposomas, o virus con replicación deficiente, como adenovirus [14] o vectores de virus adenoasociados (AAV) [15,16]. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a histamina puede estar diseñada para su expresión en un vector retroviral con replicación defectuosa. Después, este constructo de expresión puede aislarse e introducirse en una célula empaquetadora transducida con un vector plasmídico retroviral que contiene ARN que codifica el polipéptido, de tal manera que la célula empaquetadora ahora produce partículas virales infecciosas que contienen el gen de interés. Estas células productoras pueden administrarse a un sujeto para modificar células 'in vivo' y expresar el polipéptido 'in vivo' [17].

Otra estrategia consiste en la administración de 'ADN desnudo', de manera que el compuesto terapéutico de unión a histamina se inyecta directamente en el torrente sanguíneo o en el tejido muscular.

En las realizaciones que describen la administración de una HBP de la invención, también se prevé que en lugar de la HBP se pueda administrar una molécula de ácido nucleico purificada que codifica la HBP, un vector que comprende la molécula de ácido nucleico purificada o una composición farmacéutica que comprende la HBP, la molécula de ácido nucleico purificado o el vector.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término 'que comprende(n)' también abarca las realizaciones que constan únicamente de los elementos enumerados, así como las realizaciones que comprenden los elementos enumerados.

A continuación se describirán con más detalle diversos aspectos y realizaciones de la presente invención, haciendo referencia particularmente a la HBP EV131. Debe entenderse que pueden realizarse modificaciones de los detalles sin apartarse por ello del alcance de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: La administración i.p. crónica de EV131 atenuó la hipersensibilidad mecánica pero no atenuó la hipersensibilidad térmica en el modelo de lesión por constricción crónica (CCI) en ratones. (A-D) Efectos de la inyección i.p. sistémica de EV131 (1, 3 o 10 mg/kg) o un vehículo en ratones CCI en (A) el umbral de retirada mecánica medido con filamentos de von Frey y (B) el umbral de retirada térmica medido con la prueba de Hargreaves. Las mediciones se evaluaron antes de la lesión como un umbral de dolor basal (BS) y, posteriormente, 6 días después de la lesión. El

efecto de EV131 se evaluó 0,5 h, 1 h y 24 h después de cada una de las cuatro inyecciones i.p. consecutivas. La flecha indica cada una de las cuatro inyecciones i.p. de EV131. Los datos se presentan como medias $\pm$ S.E.M, $n = 6$ en cada grupo. (A) $F(39,280)=2,34$ $P<0,0001$ vs. animales de control del vehículo (ANOVA de dos vías, seguido de la prueba post-hoc de comparación de Bonferroni). (B) $F(39,266)=1,03$ $P=0,43$ vs. animales de control del vehículo (ANOVA de dos vías, seguido de la prueba post-hoc de comparación de Bonferroni). (C) El área bajo la curva (AUC) que resume las mediciones en A. $F(3,20)=6,51$ $P<0,003$ vs. animales de control del vehículo (ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post-hoc de comparación de Bonferroni). (D) El área bajo la curva (AUC) que resume las mediciones en B. $F(3,20)=0,16$ $P=0,92$ vs. animales de control del vehículo (ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post-hoc de comparación de Bonferroni).

Figura 2: La administración i.p. crónica de EV131 atenuó significativamente la hipersensibilidad mecánica, al tiempo que produjo un efecto débil sobre la hipersensibilidad térmica en el modelo de lesión por constricción crónica (CCI) en ratones. (A-D) Efectos de la inyección i.p. sistémica de EV131 (1, 3, 10, 20 o 40 mg/kg) o el vehículo en ratones CCI en (A) el umbral de retirada mecánica medido con filamentos de von Frey y (B) el umbral de retirada térmica medido con la prueba de Hargreaves. Las mediciones se evaluaron antes de la lesión como un umbral de dolor basal (BS) y, posteriormente, 7 días después de la lesión (d7). El efecto de EV131 se evaluó 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h y 24 h después de cada una de las cuatro inyecciones i.p. consecutivas. La flecha indica cada una de las cuatro inyecciones i.p. de EV131. Los datos se presentan como medias $\pm$ S.E.M, $n = 6-14$ en cada grupo. (C) El área bajo la curva (AUC) que resume las mediciones en A. $F(5,32)=102,2$ $P<0,0001$ vs. los animales de control del vehículo (ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post-hoc de comparación de Bonferroni). (D) El área bajo la curva (AUC) que resume las mediciones en B. $F(5,32)=2,81$ $P=0,03$ vs. animales de control del vehículo (ANOVA unidireccional, seguido de una prueba post-hoc de comparación de Bonferroni no significativa).

Figura 3: La administración i.p. crónica de EV131 no atenuó la hipersensibilidad mecánica o la hipersensibilidad térmica en ratones simulados. (A-D) Efectos de la inyección i.p. sistémica de EV131 (40 mg/kg) o el vehículo en ratones simulados en (A) el umbral de retirada mecánica medido con filamentos de von Frey y (B) el umbral de retirada térmica medido con la prueba de Hargreaves. Las mediciones se evaluaron antes de la lesión como un umbral de dolor basal (BS) y, posteriormente, 7 días después de la lesión (d7). El efecto de EV131 se evaluó 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h y 24 h después de cada una de las cuatro inyecciones i.p. consecutivas. La flecha indica cada una de las cuatro inyecciones i.p. de EV131. Los datos se presentan como medias $\pm$ S.E.M, $n = 5-6$ en cada grupo. (C) El área bajo la curva (AUC) que resume las mediciones en A. $t_{11}=0,85$ $P=0,41$ vs. animales de control del vehículo (prueba t no apareada). (D) El área bajo la curva (AUC) que resume las mediciones en B. $t_{11}=1,799$ $P=0,09$ vs. animales de control del vehículo (prueba t no apareada).

Figura 4: La administración i.pl. (intraplantar) crónica localizada de EV131 en la superficie plantar de la pata lesionada atenuó significativamente la hipersensibilidad mecánica, al tiempo que produjo un efecto débil sobre la hipersensibilidad térmica en el modelo de lesión por constricción crónica (CCI) en ratones. (A-D) Efectos de la inyección i.pl. localizada de EV131 (0,0075, 0,025, 0,075, 0,25 mg/50 μ l; 50 μ l/inyección) o el vehículo en ratones CCI en (A) el umbral de retirada mecánica medido con filamentos de von Frey y (B) el umbral de retirada térmica medido con la prueba de Hargreaves. Las mediciones se evaluaron antes de la lesión como un umbral de dolor basal (BS) y, posteriormente, 7 días después de la lesión (d7). El efecto de EV131 se evaluó 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h y 24 h después de cada una de las cuatro inyecciones i.p. consecutivas. La flecha indica cada una de las cuatro inyecciones i.pl. de EV131. Los datos se presentan como medias $\pm$ S.E.M, $n = 6$ en cada grupo. (C) El área bajo la curva (AUC) que resume las mediciones en A. $F(4,25)=93,38$ $P<0,0001$ vs. los animales de control del vehículo (ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post-hoc de comparación de Bonferroni). (D) El área bajo la curva (AUC) que resume las mediciones en B. $F(4,25)=17,11$ $P<0,0001$ vs. animales de control del vehículo (ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post-hoc de comparación de Bonferroni).

Figura 5: La administración i.pl. crónica localizada de EV131 en la superficie plantar de la pata lesionada no atenuó la hipersensibilidad mecánica ni la hipersensibilidad térmica en ratones simulados. (A-D) Efectos de la inyección i.pl. localizada de EV131 (0,25 mg/50 μ l; 50 μ l/inyección) o el vehículo en ratones simulados en (A) el umbral de retirada mecánica medido con filamentos de von Frey y (B) el umbral de retirada térmica medido con la prueba de Hargreaves. Las mediciones se evaluaron antes de la lesión como el umbral de dolor basal (BS) y, posteriormente, 7 días después de la lesión (d7). El efecto de EV131 se evaluó 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h y 24 h después de cada una de las cuatro inyecciones i.pl. consecutivas. La flecha indica cada una de las cuatro inyecciones i.p. de EV131. Los datos se presentan como medias $\pm$ S.E.M, $n = 6$ en cada grupo. (C) El área bajo la curva (AUC) que resume las mediciones en A. $t_{11}=1,31$ $P=0,22$ vs. animales de control del vehículo (prueba t no apareada). (D) El área bajo la curva (AUC) que resume las mediciones en B. $t_{11}=1,44$ $P=0,18$ vs. animales de control del vehículo (prueba t no apareada).

Figura 6: Secuencia primaria de la proteína FS-HBP2, incluida la secuencia señal, alineada con la secuencia de ADN codificante. El final de la secuencia señal se indica mediante la flecha.

Figura 7: Secuencia primaria de la proteína FS-HBP1, incluida la secuencia señal, alineada con la secuencia de ADN codificante. El final de la secuencia señal se indica mediante la flecha.

Figura 8: Secuencia primaria de la proteína MS-HBP1, incluida la secuencia señal, alineada con la secuencia

de ADN codificante. El final de la secuencia señal se indica mediante la flecha.

Figura 9: Secuencia primaria de la proteína D.RET6, incluida la secuencia señal, alineada con la secuencia de ADN codificante. El final de la secuencia señal se indica mediante la flecha.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Evaluación de la eficacia de la proteína de unión a histamina recombinante EV131 en el dolor neuropático

La proteína nativa EV131 se encuentra en la saliva de la garrapata, donde su actividad antiinflamatoria contrarresta la respuesta inmunológica del huésped en el punto de alimentación de la garrapata.

Métodos: Se indujo dolor neuropático en ratones machos adultos C57BL/6J (B6) (n=6/grupo) mediante lesión por constricción crónica (CCI) del nervio ciático. El efecto de EV131 (1, 3 y 10 mg/kg i.p.) sobre la hipersensibilidad mecánica y térmica se determinó 0,5, 1 y 24 h después de EV131 (4 inyecciones cada 24 h durante 4 días) y se comparó con controles de solución salina. La hipersensibilidad mecánica y térmica se evaluó mediante filamentos de von Frey y pruebas de Hargreaves.

Resultados: En ratones neuropáticos, la EV131 a una dosis de 10 mg/kg, pero no de 1 y 3 mg/kg, redujo la hipersensibilidad mecánica (AUC [g-días] - 10 mg: 10,47±1,75[SEM], 3 mg: 4,41±1,23[SEM], 1 mg: 4,03±1,37[SEM], solución salina: 2,22±1,21[SEM]). La EV131 no afectó a la hipersensibilidad térmica. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Conclusiones: Nuestros hallazgos proporcionan la primera evidencia de los efectos analgésicos de EV131 sobre la hipersensibilidad mecánica relacionada con el dolor neuropático y, por lo tanto, ponen de relieve la importancia del sistema de histamina en la modulación de las neuropatías periféricas.

Ejemplo 2: Evaluación de la eficacia de la proteína de unión a histamina recombinante EV131 en el dolor neuropático

Sujetos

Ratones C57BL/6J. Se permitió que ratones machos adultos C57BL/6J (8 semanas de edad; 20-25 g; Charles River Laboratories, Kent, Reino Unido) se aclimataran a la sala de la colonia (Universidad de Durham, Reino Unido, o Centro de Biología Comparada, Universidad de Newcastle, Reino Unido) durante al menos 7 días después de su llegada, y se les alojó en jaulas de polietileno (4 por jaula), con temperatura (21 °C) y humedad (55%) controladas, bajo un ciclo regular día/noche de 12 h (luces encendidas a las 8:00 a.m.; luces apagadas a las 8:00 p.m.). Dispusieron de comida y agua para roedores de laboratorio estándar 'ad libitum'. Los animales se habituaron a los procedimientos de prueba durante al menos 3-4 días antes de los experimentos. El manejo y las pruebas de los animales se realizaron durante la fase de luz, entre las 9:00 a.m. y las 6:00 p.m. Se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales usados en el estudio. Los protocolos experimentales se llevaron a cabo con la autorización del Ministerio del Interior del Reino Unido, con aprobación ética local y de acuerdo con la legislación vigente en Reino Unido tal y como se define en la Ley de Animales (Procedimientos Científicos) de 1986. Para informar de este estudio se han seguido las directrices ARRIVE.

Fármacos: preparación y administración

Inyecciones sistémicas. Para la administración sistémica (i.p.) se preparó EV131 (SEQ ID NO: 10) en una solución salina tamponada con fosfato como solución madre de 5,8 mg/ml y, después, se preparó inmediatamente antes de las inyecciones en una solución vehículo (solución salina) en las concentraciones requeridas. Los ratones se pesaron y se les inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) EV131 (1-40 mg por kg de peso corporal) o una solución vehículo equivalente (solución salina) sin EV131 como grupo de control. Se inyectó la EV131/el vehículo cuatro veces (cada 24 h durante cuatro días).

Inyecciones intraplantares. Para la administración intraplantar (i.pl.), se preparó EV131 (SEQ ID NO: 10; 0,0075-0,25 mg por cada 50 µl; 50 µl por inyección) a partir de una solución madre de 5,8 mg/ml inmediatamente antes de las inyecciones en una solución vehículo (solución salina). Se administraron inyecciones intraplantares (i.pl) durante 1 min con un volumen de 50 µl sin anestesia en la superficie plantar de la pata trasera del animal, ipsilateral a la lesión del nervio ciático. Los animales de control recibieron 50 µl de solución vehículo equivalente sin EV131. Se inyectó la EV131/el vehículo cuatro veces (cada 24 h durante cuatro días).

Modelo de dolor

Lesión del nervio ciático. Los ratones fueron sometidos a una neuropatía periférica inducida mediante lesión por constricción crónica (CCI) del nervio ciático, tal y como lo describen Bennett y Xie [18], con ligeras modificaciones en el caso de los ratones [19,20]. La lesión del nervio ciático se llevó a cabo bajo anestesia con isoflurano administrada a través de un cono nasal (isoflurano al 2% con oxígeno como gas portador). Se afeitó la piel y se practicó una incisión justo debajo del hueso de la cadera derecha, en paralelo al nervio ciático. Se separaron el bíceps femoral y el glúteo superficial y se dejó al descubierto el nervio ciático derecho. De manera proximal a la trifurcación ciática, la lesión se produjo mediante tres ligaduras holgadas alrededor del nervio ciático. Las ligaduras (seda 4/0) se ataron holgadamente

alrededor del nervio con una separación de 1 mm, hasta que provocaron una breve contracción en la respectiva extremidad trasera, lo que impidió aplicar una ligadura demasiado fuerte. La longitud total de nervio que se vio afectado fue de 3-4 mm. El músculo y la piel se cerraron en dos capas separadas. Para la cirugía simulada, el nervio ciático se dejó al descubierto tal y como se ha descrito anteriormente, pero no se hizo contacto con el nervio. Tanto el umbral mecánico en la superficie plantar lateral de la pata trasera como la sensibilidad térmica se evaluaron antes de la lesión en el nervio (como umbral de dolor basal) y, posteriormente, las pruebas se iniciaron el día 7 después de la cirugía y continuaron durante 3 días más (un total de 4 días de pruebas de comportamiento).

Pruebas de comportamiento

En todos los experimentos, el observador no conocía la dosis de EV131 administrada en las inyecciones intraplantares/intraperitoneales. Cada animal fue sometido a la prueba de von Frey, seguida de la prueba de Hargreaves.

Estimulación mecánica. La sensibilidad mecánica se evaluó midiendo el umbral de retirada de la pata (ipsilateral al sitio de la lesión) en respuesta a estímulos mecánicos, usando para ello filamentos de von Frey (Ugo Basile, Gemonio, Italia). Los animales se colocaron en una jaula de plástico con un suelo de red de alambre y se les permitió habituarse antes de comenzar las pruebas. Los animales también se habituaron durante un período de 3-4 días consecutivos, de manera que se registraron una serie de mediciones de referencia. Los filamentos se aplicaron en orden ascendente -cada uno cinco veces en un intervalo de 2-3 segundos- en la superficie plantar de la pata trasera, tal y como se ha descrito anteriormente [21, 22], y el filamento más pequeño que provocase una respuesta de retirada de la pata se consideró el estímulo umbral. La intensidad de los estímulos de von Frey usados en los presentes experimentos fue de entre 0,04 y 6,0 g.

Estimulación térmica. Se evaluó en los ratones la latencia de la respuesta de retirada de la pata frente a un estímulo térmico nocivo utilizando un dispositivo emisor de calor radiante (IITC Life Science Inc., Estados Unidos), tal y como se describe en [23]. Los ratones se colocaron individualmente en cámaras de plexiglás sobre una plataforma de vidrio elevada y se les permitió habituarse al aparato antes de que comenzaran las pruebas. Los animales también se habituaron durante un período de 3-4 días consecutivos, de manera que se registraron una serie de mediciones de referencia. Se aplicó una fuente de calor radiante de intensidad constante a la superficie plantar de la pata a través de la placa de vidrio y se midió la latencia a la retirada de la pata. La pata trasera recibió 3 estímulos, y el intervalo entre estímulos fue de al menos 3 minutos para evitar lesiones. Las latencias de retirada se definieron como la media de las lecturas de la pata trasera. Se usó un límite de 20 s para evitar lesiones tisulares.

Análisis de datos estadísticos

El análisis de datos y las comparaciones estadísticas se realizaron usando GraphPad Prism™, versión 7.00 para Windows, GraphPad Software, California, Estados Unidos, www.graphpad.com.

Los resultados se presentan en los gráficos como la media $\pm$ SEM. Cada grupo incluía de 5 a 14 animales. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA) con pruebas post-hoc de comparación múltiple de Bonferroni, o mediante la prueba t de Student no apareada cuando se compararon dos grupos. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

En ratones neuropáticos sometidos a un modelo de lesión por constricción crónica (CCI) de ratones neuropáticos, cuando se inyectó EV131 i.p. en una dosis de 10, 20 y 40 mg/kg, pero no de 1 y 3 mg/kg, se redujo significativamente la hipersensibilidad mecánica (AUC [g·días] - 40 mg: $21,3 \pm 0,9$ [SEM], 20 mg: $18,3 \pm 0,7$ [SEM], 10 mg: $15,2 \pm 1,4$ [SEM], 3 mg: $5,1 \pm 0,4$ [SEM], 1 mg: $3,9 \pm 0,4$ [SEM], solución salina: $2,7 \pm 0,3$ [SEM]; $F(5,32)=102,2$, $P<0,0001$; ver Figuras 2A y 2C), mientras que la hipersensibilidad térmica solo se vio levemente afectada (AUC [g·días] - 40 mg: $71,2 \pm 2,5$ [SEM], 20 mg: $65,1 \pm 2,1$ [SEM], 10 mg: $79,1 \pm 5,4$ [SEM], 3 mg: $62,6 \pm 1,7$ [SEM], 1 mg: $63,0 \pm 1,4$ [SEM], solución salina: $69,1 \pm 6,3$ [SEM]; $F(5,32)=2,8$, $P=0,03$; Prueba de comparación múltiple de Bonferroni no significativa; ver Figuras 2B y 2D). Curiosamente, cuando la EV-131 se inyectó i.pl. en el rango de dosificación más bajo en comparación con el tratamiento i.p., también produjo el efecto analgésico observado en las pruebas de hipersensibilidad mecánica (AUC [g·días] - 0,25 mg: $21,2 \pm 1,1$ [SEM], 0,075 mg: $13,8 \pm 0,7$ [SEM], 0,025 mg: $10,1 \pm 0,6$ [SEM], 0,0075 mg: $6,1 \pm 0,5$ [SEM], solución salina: $3,8 \pm 0,2$ [SEM]; $F(4,25)=93,4$, $P<0,0001$; ver Figuras 4A y 4C) y sólo afectó moderadamente a la hipersensibilidad térmica (AUC [g·días] - 0,25 mg: $94,2 \pm 2,9$ [SEM], 0,075 mg: $92,2 \pm 2,7$ [SEM], 0,025 mg: $89,9 \pm 2,8$ [SEM], 0,0075 mg: $88,3 \pm 3,6$ [SEM], solución salina: $65,2 \pm 2,0$ [SEM]; $F(4,25)=17,1$, $P<0,0001$; ver Figuras 4B y 4D). Tanto la administración sistémica i.p. como la administración local i.pl. de EV-131 no afectaron al umbral de dolor medido en animales simulados ($P>0,05$; ver Figuras 3 y 5) o cuando se evaluó en la pata ilesa ($P>0,05$).

TABLA 1

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE FS-HBP1 (línea superior), FS-HBP2 (línea central) y MS-HBP1 (línea inferior). Los residuos idénticos están marcados con '=' debajo de las tres líneas de secuencia. Las secuencias se alinearon tal y como se ha descrito anteriormente.

5

D	K	P	V	W	A	D	E	A	A	N	G	E	H	Q	D	A	w	K	H
N	Q	P	D	W	A	D	E	A	A	N	G	A	H	Q	D	A	W	K	S
N		P	T	W	A	N	E	A	K	L	G	S	Y	Q	D	A	W	K	S
		=		=	=		=	=			=			=	=	=	=	=	
L	Q	K	L	V	E	E	N			Y	D	L	I	K	A	T	Y	K	N
L	K	A	D	V		E	N	V		Y	Y	M	V	K	A	T	Y	K	N
L	Q	Q			D	Q	N	K	R	Y	Y	L	A	Q	A	T	Q	T	T
=						=			=					=	=				
D	P	V	W	G	N	D	F	T	C	V	G	T	A	A	Q	N	L	N	E
D	P	V	W	G	N	D	F	T	C	V	G	V	M	A	N	D	V	N	E
D	G	V	W	G	E	E	F	T	C	V	S	V	T	A	E	K	I	G	
=		=	=	=			=	=	=	=				=					
D	E	K	N	V	E	A	W	F	M	F	M	N	N	A	D	T	V	Y	Q
D	E	K	S	I	Q	A	E	F	L	F	M	N	N	A	D	T	N	M	Q
	K	K	K	L	N	A	T	I	L	Y	K	N	K	H	L	T	D	L	K
		=				=						=				=			
H	T	F	E	K	A	T	P	D	K	M	Y	G	Y	N	K	E	N	A	I
F	A	T	E	K	V	T	A	V	K	M	Y	G	Y	N	R	E	N	A	F
E	S	H	E	T	I	T	V	W	K	A	Y	D	Y	T	T	E	N	G	I
			=			=			=		=			=		=	=		

TABLA 1 (continuación)

T	Y	Q	T	E	D	G				Q	V	L	T	D	V	L	A	F	S
R	Y	E	T	E	D	G				Q	V	F	T	D	V	I	A	Y	S
K	Y	E	T	Q		G	T	R	T	Q	T	F	E	D	V	F	V	F	S
	=		=			=				=				=	=				=
D		D	N	C	Y	V	I	Y	A	L	G	P	D	G	S	G	A	G	
D		D	N	C	D	V	I	Y	V	P	G	T	D	G	N	E	E	G	
D	Y	K	N	C	D	V	I	F	V	P	K	E	R	G	S	D	E	G	D
=			=	=		=	=							=				=	
Y	E	L	W	A	T		D		Y	T	D	V	P	A	S	C	L	E	K
Y	E	L	W	T	T		D		Y	D	N	I	P	A	N	C	L	N	K
Y	E	L	W	V	S	E	D	K	I	D	K	I	P		D	C	C		K
=	=	=	=				=						=			=			=
F	N		E	Y		A	A	G	L	P				V	R	D	V	Y	T
F	N		E	Y		A	V	G	R	E				T	R	D	V	F	T
F	T	M	A	Y	F	A	Q	Q	Q	E	K	T	V	R	N	V	Y	T	D
=				=		=								=		=			=
S	D	C	L	P					E										
S	A	C	L						E										
S	S	C	K	P	A	P	A	Q	N										
=		=																	

Referencias

- ¹ Colloca, L. et al., Nature Reviews, 'Disease primers, Neuropathic pain', 2017, vol. 3, 17002, 1-19;
- 5 ² Brain and Spine Foundation, 'What causes neuropathic pain?'
- <https://www.brainandspine.org.uk/neuropathic-pain/>;
- ³ Finnerup, N.B. et al. and Attal, N., 'Pharmacotherapy of neuropathic pain: time to rewrite the rulebook?', Pain Manag. 6, 1-3, 2016;
- ⁴ Panula P, Chazot PL, Cowart M, Gutzmer R, Leurs R, Liu WL, Stark H, Thurmond RL, Flaas HL., International Union of
10 Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. 'Histamine Receptors'. Pharmacol. Rev., julio de 2015; 67(3):601-55. doi: 10.1124/pr.114.010249.
- ⁵ Obara, L, Rosa, A., Battle, E., Pini, A., Liu, W. L. y Chazot, P. BPS 2016. OB056, 'Novel peripheral histamine H3 receptor antagonist ZPL868087 attenuates mechanical hypersensitivity in neuropathic pain in mice';
- ⁶ Weston-Davies W et al. (2005), Ann N Y Acad. Sci. 1056:189-196;
- 15 ⁷ WO 97/44451;
- ⁸ WO 2009/141621;
- ⁹ WO 2004/087188;
- ¹⁰ K. Sunil kumar Reddy, M. U. R. Naidu, P. Usha Rani y T. Ramesh Kumar Rao, 'Human experimental pain models: A review of standardized methods in drug development', J Res Med Sci., junio de 2012; 17(6): 587-595. PMID: 20 PMC3634303;
- ¹¹ Needleman & Wunsch (1970), J. Mol. Biol. 48, 443-453;
- ¹² Rice et al. (2000), Trends Genet, 16:276-277;
- ¹³ Rzdokiewicz P. Gasinska E. Maslinski S, Buialska-Zadrozny M, 'Antinociceptive properties of esculetin in non-inflammatory and inflammatory models of pain in rats', Clin Exp Pharmacol Physiol., febrero de 2015; 42(2):213-9. doi: 25 10.1111/1440-1681.12346.
- ¹⁴ Berkner, K.L., en 'Curr. Top. Microbiol. Immunol.', 158, 39-66 (1992);
- ¹⁵ Muzyczka, N., en 'Curr. Top. Microbiol. Immunol.', 158, 97-129 (1992);
- ¹⁶ Patente de EE. UU. n.º 5,252,479;
- ¹⁷ Ver capítulo 20, 'Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches' (y las referencias
30 citadas en el mismo) en 'Human Molecular Genetics' (1996), T Strachan y A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd.
- ¹⁸ Bennett GJ, Xie YK. 'A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man'. Pain, 1988, 33:87-107.
- ¹⁹ Obara I, Mika J, Schafer MK, Przewlocka B. 'Antagonists of the kappa-opioid receptor enhance allodynia in rats and mice after sciatic nerve ligation'. Br J Pharmacol, 2003, 140: 538-546.
- 35 ²⁰ Osikowicz M, Mika J, Makuch W, Przewlocka, B. 'Glutamate receptor ligands attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate morphine effects in a mouse model of neuropathic pain', Pain, 2008, 139: 117-126.
- ²¹ Bourquin AF, Suveges M, Pertin M, Gilliard N, Sardy S, Davison AC, Spahn DR, Decosterd I. 'Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse', Pain, 2006, 122:14.
- ²² Obara I, Tochiki KK, Geranton SM, Carr FB, Lumb BM, Liu Q, Hunt SP. 'Systemic inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway reduces neuropathic pain in mice', Pain, 2011, 152:2582-2595.
- 40 ²³ Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. 'A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia', Pain, 1988, 32:77-88.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión a histamina (HBP) para su uso en un método para tratar el dolor neuropático.
- 5 2. Una HBP de la reivindicación 1, de manera que puede obtenerse de la saliva de una garrapata.
3. Una HBP de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de manera que la HBP se selecciona de entre FS-HBP2, FS-HBP1, MS-HBP1 y D.RET6, por ejemplo de manera que la HBP es FS-HBP2 y, opcionalmente, de manera que la HBP comprende o consta de la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEQ ID NO:2.
- 10 4. Una HBP de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es una variante de una HBP como la descrita en la reivindicación 2 o la reivindicación 3, de manera que la variante tiene una secuencia proteica que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con una secuencia proteica seleccionada de entre cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 y 10, y de manera que la variante conserva la función biológica de unión a la histamina.
- 15 5. Una HBP de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es un fragmento de una HBP de longitud completa o que es un fragmento de una variante de la misma, de manera que la variante tiene una secuencia proteica que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con una secuencia proteica seleccionada de entre cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 y 10, y de manera que los fragmentos y la variante conservan la función biológica de unión a la histamina.
- 20 6. Una HBP de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de manera que la HBP se administra en una dosis de más de 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 o 40 mg/kg de peso corporal, y opcionalmente de manera que la dosis es de 2-10 mg/kg o 4-8 mg/kg o es de aproximadamente 6 mg/kg de peso corporal, de manera que se administran de 1 a 6 dosis cada 24 horas.
- 25 7. Una molécula de ácido nucleico purificada que codifica una HBP como las descritas en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método para tratar el dolor neuropático.
- 30 8. Una molécula de ácido nucleico purificada para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende o consta de:
 - (a) una secuencia de ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, de manera que opcionalmente comprende o consta de la secuencia de ADNc de SEQ ID NO:1; o
 - (b) una secuencia de ADNc que codifica una variante o un fragmento activo de SEQ ID NO:2 o un fragmento activo de dicha variante, de manera que la variante tiene una secuencia proteica que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con una secuencia proteica seleccionada de entre cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 y 10, y de manera que la variante conserva la función biológica de unión a la histamina.
- 35 9. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico purificada de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8 para su uso en un método para tratar el dolor neuropático.
- 40 10. Una composición farmacéutica que comprende una HBP, un ácido nucleico purificado o un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, junto con un portador farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método para tratar el dolor neuropático.
- 45 11. Una HBP, un ácido nucleico purificado, un vector o una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, de manera que el dolor neuropático es un dolor neuropático en el que la histamina tiene un papel.
- 50 12. Una HBP, un ácido nucleico purificado, un vector o una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, de manera que el método:
 - (a) incluye impedir que la histamina se una a sus receptores; y/o
 - (b) incluye tratar el dolor neuropático que se observa como hipersensibilidad a estímulos mecánicos, de manera que opcionalmente:
 - (i) el dolor neuropático es alodinia y/o hiperalgesia; y/o
 - (ii) el tratamiento produce mejoras en las sensaciones de uno o más de los siguientes: tacto (incluyendo toques leves), 'hormigueo', entumecimiento, picor y dolor insoportable.
- 55 13. Una HBP, un ácido nucleico purificado, un vector o una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, de manera que:
 - (a) el dolor neuropático es un dolor neuropático periférico, de manera que opcionalmente el paciente que está siendo tratado por un dolor neuropático periférico tiene una afección o enfermedad seleccionada de entre las siguientes: nervios periféricos dañados, irritados o enfermos, neuropatía periférica, dolor neuropático inducido por una lesión en los nervios periféricos, diabetes mellitus, neuropatía diabética, polineuropatía diabética, prediabetes, disfunción
- 60 65

- metabólica, una enfermedad infecciosa (por ejemplo, infección por VIH o lepra), un trastorno inmunológico (por ejemplo, síndrome de Guillain-Barré), un trastorno inflamatorio, una neuropatía hereditaria, una canalopatía hereditaria (por ejemplo, eritromelalgia hereditaria), una lesión del nervio ciático, estenosis espinal, neuralgia del trigémino, neuralgia postherpética, dolor por lesión del nervio periférico, dolor post-amputación, polineuropatía dolorosa, radiculopatía dolorosa, lesión de la médula espinal, neuropatía postraumática, neuropatía posquirúrgica, polirradiculopatía cervical, polirradiculopatía lumbar y síndrome de dolor regional complejo tipo 2;
- 5 (b) el dolor neuropático es un dolor neuropático central, de manera que opcionalmente el paciente que está siendo tratado por el dolor neuropático central tiene una afección o enfermedad seleccionada de entre una enfermedad cerebrovascular que afecta a las vías somatosensoriales centrales, una enfermedad neurodegenerativa y una lesión
- 10 o enfermedad de la médula espinal; o
- (c) el dolor neuropático es una mezcla de periférico y central, de manera que opcionalmente el paciente que está siendo tratado por dolor neuropático periférico y central tiene la enfermedad de Parkinson.
14. Una HBP, un ácido nucleico purificado, un vector o una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con
- 15 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, de manera que el paciente que está siendo tratado por un dolor neuropático también está siendo tratado con quimioterapia o se ha sometido anteriormente a un tratamiento con quimioterapia.

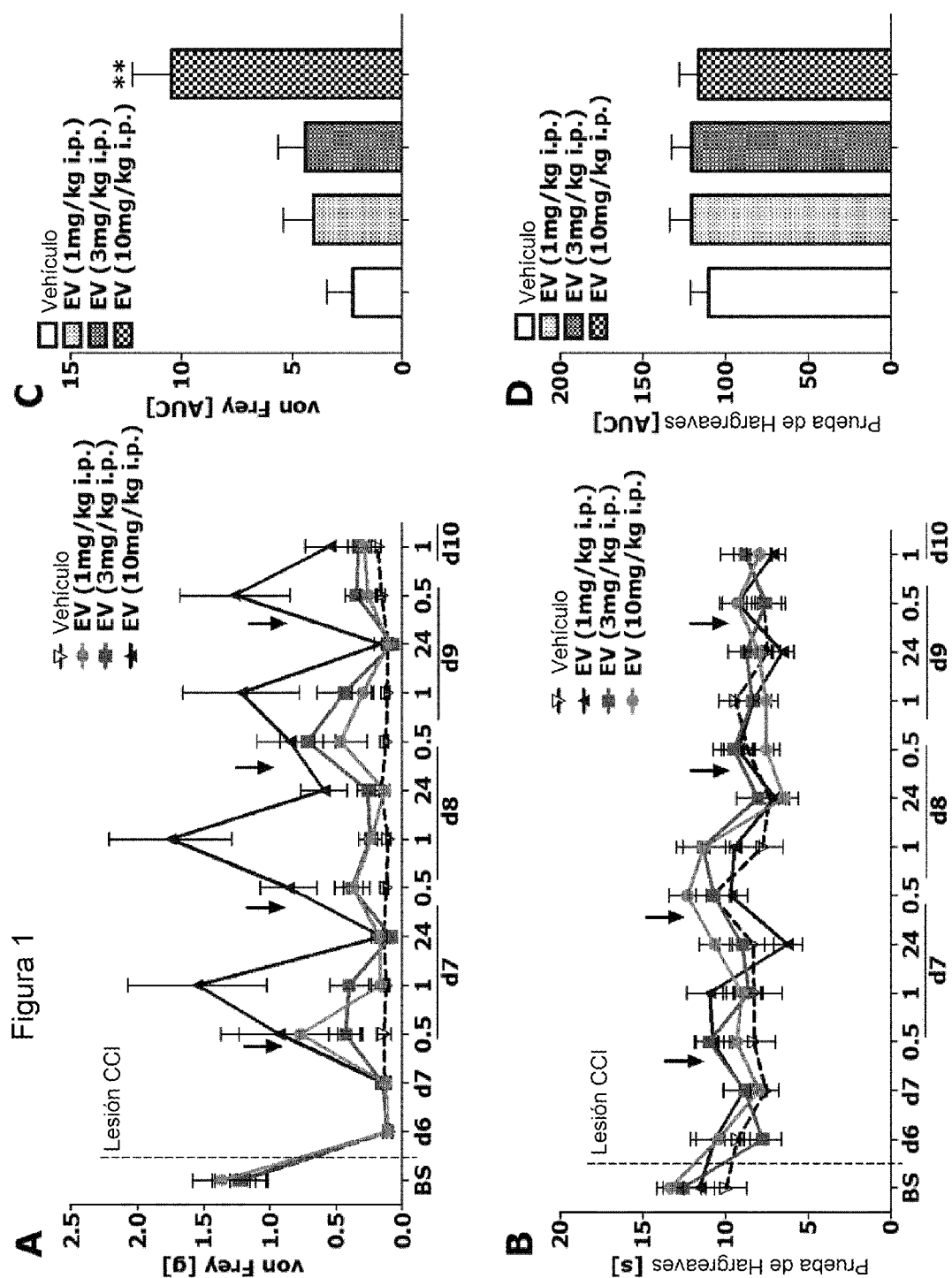
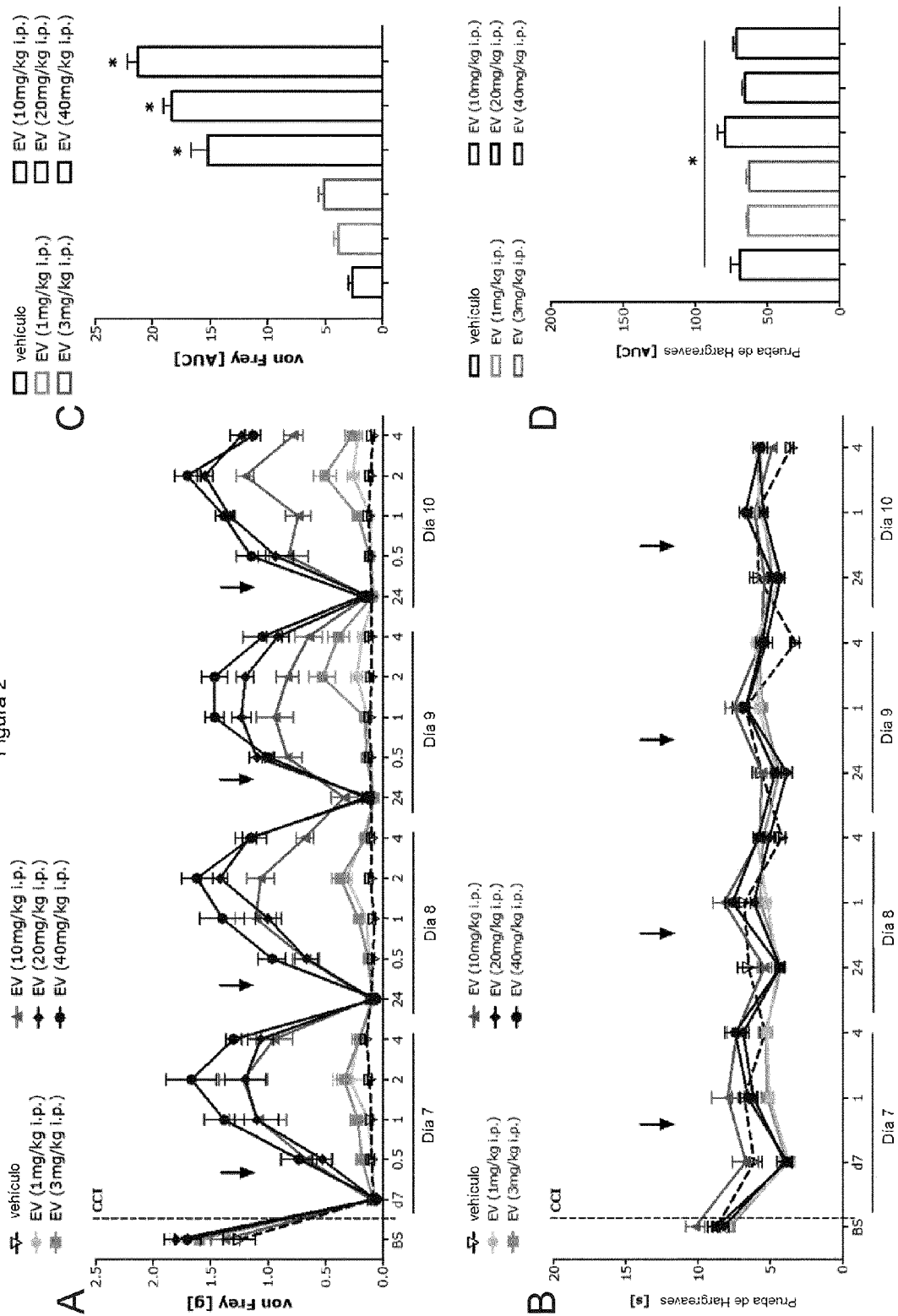


Figura 2



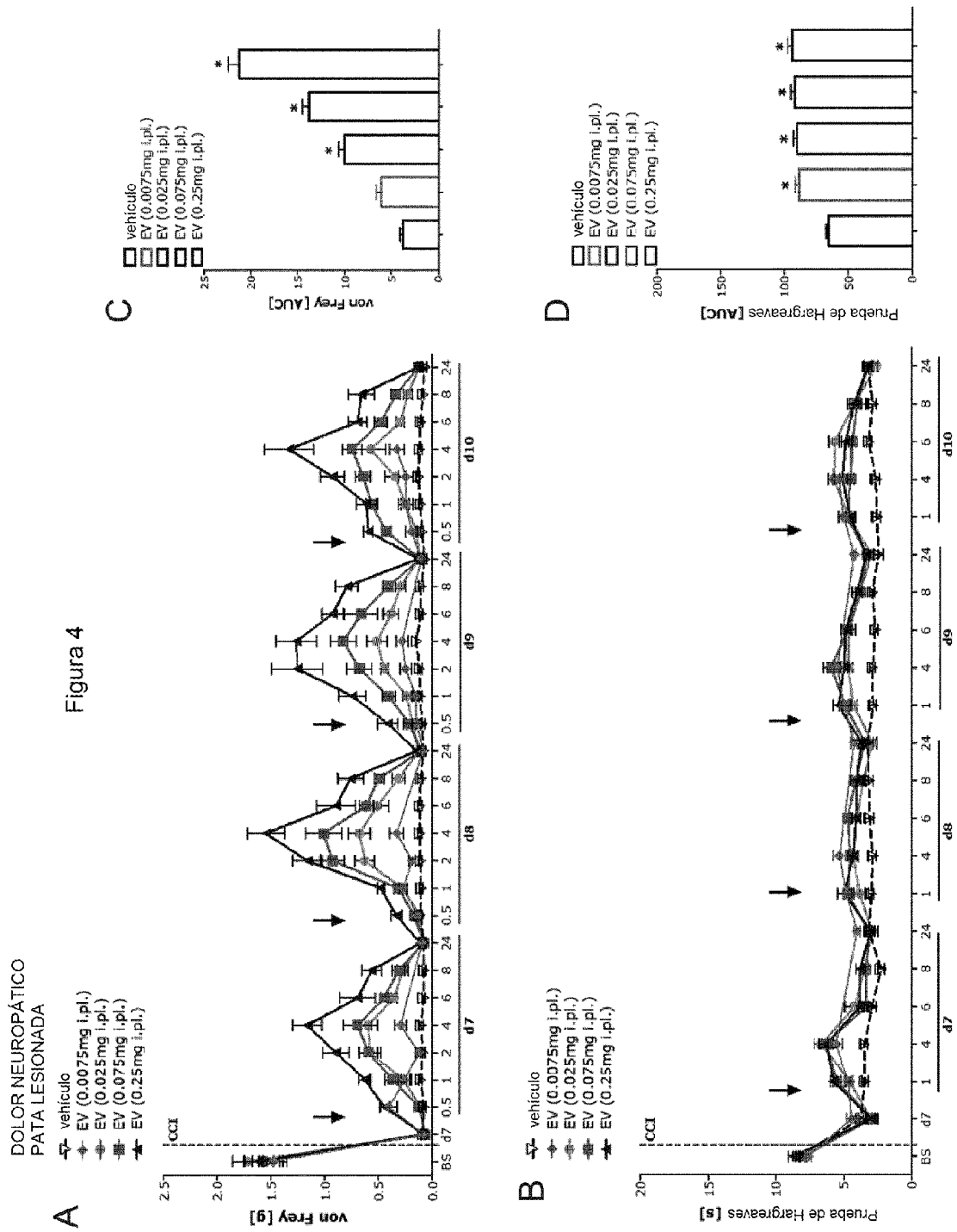


Figura 4

Figura 6

ES-HBP2

T3→

1 GCCGCGACGGAACCTTCGAAGGAAGTCAGCATGAAGCTTCTCATACTCTCTCTTGCCCTCG 60
M K L L I L S L A L V

61 TCCTCGCCCTCAGCCAGGTTAAGGGAAATCAGCCAGATTGGGCCGATGAAGCGGCAAATG 120
L A L S Q V K G N Q P D W A D E A A N G
↑

121 GTGCACACCAAGACGCCTGGAAGAGTCTGAAAGCGGACGTTGAAAACGTTTACTACATGG 180
A H Q D A W K S L K A D V E N V Y Y M V

181 TGAAGGCCACCTATAAGAATGACCCAGTGTGGGGCAATGACTTCACTTGCCTGGGTGTTA 240
K A T Y K N D P V W G N D F T C V G V M

T3b→←T7a

241 TGGCAAATGATGTCAACGAGGATGAGAAGAGCATTCAAGCAGAGTTTTTGTATTGAATA 300
A N D V N E D E K S I Q A E F L F M N N

301 ATGCTGACACAAACATGCAATTCGCCACTGAAAAGGTGACTGCTGTTAAATGTATGGTT 360
A D T N M Q F A T E K V T A V K M Y G Y

361 ACAATAGGGAAAACGCCTTCAGATACGAGACGGAGGATGGCCAAGTTTTACAGACGTC A 420
N R E N A F R Y E T E D G Q V F T D V I

421 TTGCATACTCTGATGACAACTGCGATGTCATCTACGTTCTCTGGCACAGACGGAAATGAGG 480
A Y S D D N C D V I Y V P G T D G N E E

481 AAGGTTACGAACTATGGACTACGGATTACGACAAACATTCCAGCCAATTGTTTAAATAAGT 540
G Y E L W T T D Y D N I P A N C L N K F

541 TTAATGAGTACGCTGTAGGTAGGGAGACAAGGGATGTATTCACAAGTGCTTGCCCTAGAGT 600
N E Y A V G R E T R D V F T S A C L E

601 AATAACTTCAGAAATGTCGTTCTTTCAAAGCGAAAAA←CCAACAATGTGAACATCGGCTTGC 660

661 TGTGCTCGACGTAGCCAGCGATAATGTTGTTTTCTGGGTTTCTGGGTTTGGATACTTTT 720

721 AGCCACTGCCGAAGAGCTGTAAGGTAATGAAAAATAAATGTTCAAGAGTGTGAAAAA 780

←T7

781 AAAAAAAAAAAAAA 793

Figura 7

FS-HBP1

T3→

```

1  AGAAAGCCAACATGAAGCTTCTGCTCTCTCTTGCCTTCGTCTTAGCTCTCAGCCAAGTTA  60
    M K L L L S L A F V L A L S Q V K

61  AAGCCGATAAGCCAGTTTGGGCGGATGAAGCGGCAAACGGGGAACACCAAGACGCCTGGA  120
    A D K P V W A D E A A N G E H Q D A W K
    ↑

121 AGCATCTCCAAAACTCGTTGAAGAGAATTACGACTTGATAAAAGCCACCTACAAGAACG  180
    H L Q K L V E E N Y D L I K A T Y K N D

181 ACCCAGTTTGGGGTAACGACTTCACCTGCGTGGGTACTGCAGCGCAGAATTTGAACGAGG  240
    P V W G N D F T C V G T A A Q N L N E D
    T3a→←T7c

241 ACGAGAAGAACGTTGAAGCATGGTTTATGTTTATGAATAATGCTGATACCGTATACCAAC  300
    E K N V E A W F M F M N N A D T V Y Q H

301 ATACTTTTGAAAAGGCGACTCCTGATAAAATGTACGGTTACAATAAGGAAAACGCCATCA  360
    T F E K A T P D K M Y G Y N K E N A I T

361 CATATCAAACAGAGGATGGGCAAGTTCTCACAGACGTCCTTGCATTCTCTGACGACAATT  420
    Y Q T E D G Q V L T D V L A F S D D N C

421 GCTATGTCATCTACGCTCTTGGCCCAGATGGAAGTGGAGCAGGTTACGAACTCTGGGCTA  480
    Y V I Y A L G P D G S G A G Y E L W A T

481 CCGATTACACGGATGTTCCAGCCAGTTGTCTAGAGAAGTTCAATGAGTATGCTGCAGGTC  540
    D Y T D V P A S C L E K F N E Y A A G L
    T3b→←T7d

541 TGCCGGTACGGGACGTATACACAAGTGATTGCCTCCCAGAATAACTTGGGCATATCGTAA  600
    P V R D V Y T S D C L P E *

601 TTTCAACTTCAAAGTGTGTTATTGTCAGCATATGTCTCGAGTGTTTGATGTAGTGCCTTC  660

661 GATGATGCCATTTCATCTAGGTTTCGGGTGTTCCGGTACTTTATGGTCACTGCCGACGGCCA  720

721 GCACGAGTACTCGAAAATAAAGTATTCTGAAATCGGAAAAAAAAAAAAAAAAA  770
    ←T7

```

Figura 8

MS-HBPI

T3→

1 AAAGCACTCAACATGAAGGTTCTTTTGTGGTTCTTGGAGCTGCTCTTTGCCAGAATGCA 60
M K V L L L V L G A A L C Q N A

61 GATGCAAACCCCAACATGGGCGAACGAAGCTAAATTGGGATCCTACCAAGACGCCTGGAAG 120
D A N P T W A N E A K L G S Y Q D A W K
↑

121 AGCCTTCAGCAAGACCAAAACAAGAGATACTATTTGGCACAAGCGACACAAACGACTGAC 180
S L Q Q D Q N K R Y Y L A Q A T Q T T D

181 GGCCTATGGGGTGAAGAGTTTACTTGTGTGAGTGTACGGCTGAGAAGATTGGAAGAAA 240
G V W G E E F T C V S V T A E K I G K K
→

241 AAACTTAACGCTACGATCCTCTATAAAAAATAAGCACCTTACTGACCTGAAAGAGAGTCAT 300
K L N A T I L Y K N K H L T D L K E S H
←

301 GAAACAATCACTGTCTGGAAAGCATACGACTACACAACGGAGAATGGCATCAAGTACGAG 360
E T I T V W K A Y D Y T T E N G I K Y E

361 ACGCAAGGGACAAGGACGCAGACTTTTGAAGATGTCTTTGTATTCTCTGATTACAAGAAC 420
T Q G T R T Q T F E D V F V F S D Y K N

421 TGCGATGTAATTTTCGTTCCCAAGAGAGAGGAAGCGACGAGGGCGACTATGAATTGTGG 480
C D V I F V P K E R G S D E G D Y E L W
→ ←

481 STTAGTGAAGACAAGATTGACAAGATTTCCCGATTGCTGCAAGTTTACGATGGCGTACTTT 540
V S E D K I D K I P D C C K F T M A Y F

541 GCCCAACAGCAGGAGAAGACGGTTCGTAATGTATACACTGACTCATCATGCAAACCAGCA 600
A Q Q Q E K T V R N V Y T D S S C K P A
→

601 CCAGCTCAGAACTGATATTCTGGTAATGCTTGAACCGTAATGGTTCGACCTGCAGTCTAG 660
P A Q N *

661 AAACATTTACCACCATCACGGTGATTATCTTACCGTAGTTTCTTAGGTCTTGTCTTTGA 720

721 ATAAAATAGTTCCCTGCATTGACAAAAA 753
←T7

Figura 9

D.RET6

T3→

1	ATGAAGATGCAGGTAGTGCTCTTACTTACCTTTGTTAGCGCCGCCCTCGCCACTCAAGCG	60
1	M K M Q V V L L L T F V S A A L A T Q A	20
61	GAGACTACATCTGCGAAAGCAGGAGAAAACCCGCTCTGGGCGCATGAGGAACACTTGGGA	120
21	E T T S A K A G E N P L W A H E E L L G	40
	↑	
121	AAATATCAAGATGCCTGGAAGCATCGATCAGGGCGTGTGGTGACTTATGTCCTTGCA	180
41	K Y Q D A W K S I D Q G V S V T Y V L A	60
181	<u>AAGACAACATATGAGAATGACACAGGATCATGGGGATCCCAGTTTAAGTGCCTCCAGGTA</u>	240
61	K T T Y E N D T G S W G S Q F K C L Q V	80
	→ ←	
241	CAAGAAATAGAAAGAAAGGAAGAAGACTATACAGTTACATCTGTTTTCACCTTTAGAAAT	300
81	Q E I E R K E E D Y T V T S V F T F R N	100
301	GCGTCTTCTCCAATCAAGTATTACAACGTGACAGAAACAGTGAAGGCCGTTTTCATAT	360
101	A S S P I K Y Y N V T E T V K A V F Q Y	120
361	GGATACAAAACATAAGGAATGCAATTGAATACCAAGTGGGCGGTGGACTTAACATAACC	420
121	G Y K N I R N A I E Y Q V G G G L N I T	140
421	<u>GACACGCTCATTTTCACTGATGGAGAATTATGCGATGTTTTCTATGTTCCCAATGCAGAT</u>	480
141	D T L I F T D G E L C D V F Y V P N A D	160
	→ ←	
481	CAAGGTTGTGAGCTCTGGGTCAAAAAGAGTCACTACAAACACGTACCAGACTACTGCACG	540
161	Q G C E L W V K K S H Y K H V P D Y C T	180
541	TTCGTGTTCAATGTTTCTGTGCGAAAGACAGGAAAACCTACGATATATTTAATGAAGAA	600
181	F V F N V F C A K D R K T Y D I F N E E	200
601	TGTGTTTATAACGGCGAACCCCTGGCTTTAAAGGCAAAAAATCTATAAAATACGGTTTCTG	660
201	C V Y N G E P W L *	220
661	TAGTAAGTACTAATAGCAAGTAGTTGAATAAATAAAGATTGTAAGTGCAAAAAAAAAA	719

←T7