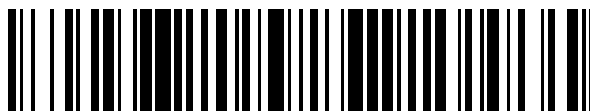


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 068**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61P 25/02** (2006.01)  
**A61P 25/04** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 35/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2011 E 11773666 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2621512**

54 Título: **Uso de meteorina para el tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y dolor fantasma**

30 Prioridad:

**07.10.2010 US 390791 P**  
**01.10.2010 DK 201070423**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.09.2016**

73 Titular/es:

**NSGENE A/S (100.0%)**  
**Baltorpevej 154**  
**2750 Bellerup, DK**

72 Inventor/es:

**JOHANSEN, TEIT E.;**  
**WAHLBERG, LARS ULRIK y**  
**JØRGENSEN, JESPER ROLAND**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 584 068 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**

Uso de meteorina para el tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y dolor fantasma.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y dolor fantasma. En una realización preferida, el trastorno a tratar es alodinia e hiperalgesia, más preferentemente alodinia que incluye alodinia térmica y táctil. En otra realización preferida, el trastorno es hiperalgesia térmica.

10

**Antecedentes de la invención**

Se han explorado muchas terapias para el tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y dolor fantasma con un grado de éxito variable, incluyendo fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), opioides, anticonvulsivos, antiarrítmicos, antidepresivos tricíclicos y agentes tópicos. Enfoques alternativos incluyen bloqueos anestésicos, administración epidural de esteroides y lesiones neuroquirúrgicas. Sin embargo, todas las terapias presentes tienen una modesta eficacia en la mayoría de los pacientes y son paliativos en lugar de curativos y sus efectos secundarios representan limitaciones significativas.

15

Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha de terapias que traten alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y dolor fantasma eficazmente, preferentemente con solamente efectos secundarios menores que no afecten a la salud general de los pacientes.

20

**Resumen de la invención**

25

La presente invención proporciona métodos para el tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y dolor fantasma. Los métodos usan la proteína meteorina, secuencias de nucleótidos que codifican meteorina, vectores de expresión que contienen la secuencia de nucleótidos que codifica meteorina, líneas celulares transformadas/transfectadas con el vector de expresión que codifica meteorina, o una cápsula biocompatible que administra meteorina secretada.

30

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

35

- i. La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- ii. Una variante de secuencia biológicamente activa de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, donde la variante tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3; y
- iii. Un fragmento biológicamente activo de al menos 50 aminoácidos contiguos de i) o ii) donde el fragmento es al menos el 70% idéntico a la SEQ ID NO: 3.

40

Los inventores han descubierto que la meteorina es capaz de aliviar la alodinia en modelos animales de alodinia tanto térmica como mecánica y el dolor espontáneo (déficit de soporte de peso). De forma importante, los animales no experimentaron ninguna pérdida de peso o signos de toxicidad durante la duración del experimento y no se observaron efectos secundarios dolorosos. Los efectos positivos se han observado independientemente en varios modelos diferentes de alodinia y dolor espontáneo y usando administración tanto sistémica (subcutánea) como local (intratecal).

45

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

50

- i. La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- ii. Una variante de secuencia biológicamente activa de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, donde la variante tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3; y
- iii. Un fragmento biológicamente activo de al menos 50 aminoácidos contiguos de i) o ii) donde el fragmento es al menos el 70% idéntico a la SEQ ID NO: 3.

55

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma.

5 En un aspecto adicional más, la invención se refiere a una célula huésped aislada que comprende un vector de expresión de acuerdo con la invención para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma. En particular, la invención se refiere a células huésped útiles para terapia basada en células, terapia basada en células desnudas o terapia con células encapsuladas para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma.

10

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una cápsula biocompatible implantable para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma mediante la administración de meteorina biológicamente activa secretada a un sujeto, comprendiendo dicha cápsula:

- 15 i. Una membrana externa biocompatible y un núcleo interno,  
ii. Comprendiendo dicho núcleo interno células de acuerdo con la invención,  
iii. Comprendiendo dichas células un vector de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende:

20

- i. El polipéptido aislado de acuerdo con la invención; o  
ii. El ácido nucleico aislado de acuerdo con la invención; o  
iii. El vector de expresión de acuerdo con la invención; o  
iv. La línea celular de acuerdo con la invención; o

25

- v. Una cápsula biocompatible implantable de acuerdo con la invención;

para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de:

30

- i. El polipéptido aislado de acuerdo con la invención;  
ii. El ácido nucleico aislado de acuerdo con la invención;  
iii. El vector de expresión de acuerdo con la invención;  
iv. La línea celular de acuerdo con la invención; y

35

- v. Una cápsula biocompatible implantable de acuerdo con la invención;

en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma.

40 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma en un sujeto que comprende administrar, a dicho sujeto que lo necesita, cantidades terapéuticamente efectivas del polipéptido aislado de acuerdo con la invención.

### Descripción de los dibujos

45

Figura 1. Umbral de retirada de la pata trasera ipsolateral ante estimulación mecánica con pelos de von Frey después de lesión del nervio ciático. Nótese que el tratamiento con meteorina alivia de forma dependiente de la dosis la alodinia mecánica. Las flechas indican puntos temporales del tratamiento. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM y la puntuación se realizó con enmascaramiento. \* $p < 0,05$ .

50

Figura 2. Puntuación de respuesta de la pata trasera ipsolateral ante estimulación con frío después de lesión del nervio ciático. 0 es sin respuesta, 1 corresponde a una respuesta similar a un sobresalto observada en ratas normales mientras que 2 y 3 indican reacciones de dolor leve y severo. Nótese que el tratamiento con meteorina alivia de manera dependiente de la dosis la alodinia por frío. Las flechas indican puntos temporales del tratamiento.

55

La puntuación se realizó con enmascaramiento y los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ .

Figura 3. Cambios de peso corporal en ratas con lesión en el nervio ciático. Todos los animales ganaron peso de forma normal durante todo el estudio. Las flechas indican puntos temporales del tratamiento. La puntuación se realizó con enmascaramiento y los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ .

- Figura 4. Déficits de soporte de peso en ratas después de LCC (Lesión por constricción crónica). Se usó un medidor de incapacidad para valorar la fuerza descendente aplicada por cada extremidad trasera. Antes de la cirugía, no había ningún déficit dado que todos los animales soportaban peso por igual en ambas extremidades traseras.
- 5 Después de 12 días, inmediatamente antes de que comience el tratamiento, ~ 50 g más se colocaron sobre la extremidad contralateral en comparación con la extremidad ipsilateral. Nótese que el tratamiento con meteorina alivia los déficits de soporte de peso. La puntuación se realizó con enmascaramiento y los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ .
- 10 Figura 5. Cambios de peso corporal en ratas con LCC. Todos los animales ganaron peso de forma normal durante todo el estudio. Las flechas indican puntos temporales del tratamiento. La puntuación se realizó con enmascaramiento y los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ .
- Figura 6. Alineamiento con CLUSTAL W (1.82) de múltiples secuencias de meteorina.
- 15 Figura 6a: alineamiento de precursores de meteorina de ser humano (SEQ ID NO 2), rata (SEQ ID NO 9) y ratón (SEQ ID NO 5).
- Figura 6b: alineamiento de meteorina madura de ser humano (SEQ ID NO 3), rata (SEQ ID NO 10) y ratón (SEQ ID NO 6).
- 20 Figura 6c: meteorina madura, secuencia consenso (SEQ ID NO 11) generada a partir de residuos totalmente conservados en las secuencias humana, de ratón y de rata. X representa cualquiera de los 21 aminoácidos de origen natural codificados por ADN.
- 25 Figura 7. Efecto de meteorina sobre hipersensibilidad mecánica en ratas con LCC. Las flechas indican días de tratamiento donde a los animales se les inyectó por vía sistémica con 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg o 1,8 mg/kg de meteorina recombinante o con vehículo como control negativo. Las ratas fueron examinadas para nocicepción alterada usando filamentos de von Frey y los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SEM. \* indica una diferencia significativa
- 30 ( $p < 0,05$ ) en comparación con animales tratados con vehículo.
- Figura 8. Efecto de meteorina sobre hipersensibilidad térmica en ratas con LCC. Las flechas indican días de tratamiento donde a los animales se les inyectó por vía sistémica con 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg o 1,8 mg/kg de meteorina recombinante o con vehículo como control negativo. Se usó un dispositivo de Hargreaves para valorar la latencia de retirada térmica y los resultados se expresaron como medias  $\pm$  SEM. \* indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre 1,8 mg/kg de meteorina y animales tratados con vehículo. # indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre 0,5 mg/kg de meteorina y animales tratados con vehículo. Nótese que la meteorina reducía significativamente y de forma dependiente de la dosis la alodinia térmica.
- 35 Figura 9. Efecto de meteorina sobre soporte de peso diferencial en ratas con LCC. Las flechas indican días de tratamiento donde a los animales se les inyectó por vía sistémica con 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg o 1,8 mg/kg de meteorina recombinante o con vehículo como control negativo. El soporte de peso diferencial entre la extremidad lesionada y la no lesionada se determinó usando un medidor de incapacidad y se expresó como % de diferencia. Los datos se muestran como medias  $\pm$  SEM. \* indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre 1,8 mg/kg de meteorina y animales
- 40 tratados con vehículo. # indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre 0,5 mg/kg de meteorina y animales tratados con vehículo. \$ indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre 0,1 mg/kg de meteorina y animales tratados con vehículo. Nótese que la meteorina reducía significativamente y de forma dependiente de la dosis déficits de soporte de peso.
- 45 Figura 10. Peso corporal del animal durante el estudio de LCC. Las flechas indican días de tratamiento donde a los animales se les inyectó por vía sistémica con 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg o 1,8 mg/kg de meteorina recombinante o con vehículo como control negativo. No se produjeron cambios de peso corporal en los grupos tratados con meteorina en comparación con vehículo.
- 50 Figura 11. Meteorina en suero de rata postadministración sistémica. A los animales se les inyectó por vía sistémica con 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg o 1,8 mg/kg de meteorina recombinante el día 39 ( $t=0$ ). Se recogieron muestras de suero a las 2, 6, 24 h después de la inyección y la concentración de meteorina se determinó usando ELISA. La meteorina no era detectable en muestras de suero de ratas de control sin exposición previa.
- 55

Figura 12. Efecto de meteorina sobre el umbral de retirada de la pata ante estimulación mecánica después de lesión isquémica del nervio ciático. Las flechas indican puntos temporales para inyección intratecal. Los datos se muestran como medias  $\pm$  SEM. \* indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre vehículo y 6  $\mu$ g de meteorina mientras que # indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre vehículo y 2  $\mu$ g de meteorina.

5

Figura 13. Efecto de meteorina sobre response a estimulación por frío después de lesión isquémica del nervio ciático. Las flechas indican puntos temporales para inyección intratecal. Los datos se muestran como medias  $\pm$  SEM. \* indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre vehículo y 6  $\mu$ g de meteorina mientras que # indica una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre vehículo y 2  $\mu$ g de meteorina.

10

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

15 Tal como se usa en el presente documento “una cápsula biocompatible” significa que la cápsula, tras la implantación en un mamífero huésped, no desencadena una respuesta del huésped perjudicial suficiente para dar como resultado el rechazo de la cápsula o para hacerla inoperante, por ejemplo a través de degradación.

Tal como se usa en el presente documento, una “secuencia codificante” es una secuencia de polinucleótidos que se transcribe y se traduce a un polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “secuencia de control” se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de secuencias codificantes y no codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control generalmente incluyen promotor, sitio de unión al ribosoma, y secuencia de terminación de la transcripción. Además, “secuencias de control” se refiere a secuencias que controlan el procesamiento del péptido codificado dentro de la secuencia codificante; éstas pueden incluir, aunque no se limitan a, secuencias que controlan la secreción, la escisión por proteasa, y la glucosilación del péptido. La expresión “secuencias de control” pretende incluir, como mínimo, componentes cuya presencia puede influir en la expresión, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias compañeras de fusión.

“Regulación negativa” de un promotor significa la reducción de la expresión del producto de transgén a un nivel, que puede causar una falta de actividad biológica significativa del producto de transgén después de implantación *in vivo*. Tal como se usa en el presente documento “un promotor no sujeto a regulación negativa” significa un promotor, que, después de implantación *in vivo* en un huésped mamífero, impulsa o continúa impulsado la expresión del transgén a un nivel que es biológicamente activo.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “vectores de expresión” se refiere a vectores que son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están enlazados de forma operativa. En general, vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están, a menudo, en forma de plásmidos.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones “modificación genética” e “ingeniería genética” se refieren a la alteración estable o transitoria del genotipo de una célula mediante introducción intencionada de ADN exógeno. El ADN puede ser sintético, o de origen natural, y puede contener genes, partes de genes, u otras secuencias de ADN útiles. La expresión “modificación genética” no pretende incluir alteraciones de origen natural tales como las que se producen a través de actividad viral natural, recombinación genética natural, o similares.

Tal como se usa en el presente documento, “una cápsula inmunoaislante” significa que la cápsula, tras la implantación en un huésped mamífero, minimiza los efectos perjudiciales del sistema inmunitario del huésped sobre las células dentro de su núcleo.

Tal como se usa en el presente documento, “expresión estable a largo plazo de un compuesto biológicamente activo” significa la producción continuada de un compuesto biológicamente activo a un nivel suficiente para mantener su actividad biológica útil durante periodos mayores de un mes, preferentemente mayores de tres meses y de la forma más preferente mayor de seis meses.

Por un “promotor de mamífero”, se entiende un promotor capaz de funcionar en una célula de mamífero.

Meteorina, tal como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos que tienen las secuencias de

aminoácidos de meteorina sustancialmente purificada obtenida a partir de cualquier especie, particularmente mamífero, que incluye de chimpancé, bovina, ovina, porcina, murina, equina, y preferentemente humana, a partir de cualquier fuente ya sea natural, sintética, semisintética, o recombinante. El término también se refiere a fragmentos biológicamente activos de meteorina obtenidos de cualquiera de estas especies, así como a variantes de secuencia biológicamente activa de éstas y a proteínas sujetas a modificaciones postraduccionales.

Las características del factor de crecimiento, tal como se usa en el presente documento, definen características relacionadas con la secuencia similares a las de factores de crecimiento clásicos, que son proteínas secretadas que actúan sobre una célula diana a través de un receptor para causar una o más de las siguientes respuestas en la célula diana: crecimiento incluyendo proliferación, diferencia, supervivencia, regeneración, migración, recuperación de función, mejora de soporte trófico a la función tal como soporte neurotrófico.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "enlazado/a de forma operativa" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está enlazada a la una o más secuencias reguladoras dentro de un vector de expresión recombinante, de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación).

"Identidad de secuencia": un nivel elevado de identidad de secuencia indica probabilidad de que la primera secuencia se derive de la segunda secuencia. La identidad de secuencia de aminoácidos requiere secuencias de aminoácidos idénticas entre dos secuencias alineadas. Por lo tanto, una secuencia candidata que comparte el 70% de identidad de aminoácidos con una secuencia de referencia, requiere que, después del alineamiento, el 70% de los aminoácidos en la secuencia candidata sean idénticos a los aminoácidos correspondientes en la secuencia de referencia. La identidad puede determinarse con ayuda de análisis informático, tal como, sin limitaciones, el programa de alineamiento informático ClustalW (Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680), y los parámetros por defecto sugeridos en él. El software ClustalW está disponible como un servicio de ClustalW WWW Service en el European Bioinformatics Institute a partir de <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>. Usando este programa con su configuración por defecto, la parte madura (bioactiva) de un polipéptido de consulta y un polipéptido de referencia se alinean. El número de residuos totalmente conservados se cuenta y se divide por la longitud del polipéptido de referencia.

El algoritmo ClustalW puede usarse de forma similar para alinear secuencias de nucleótidos. Las identidades de secuencia pueden calcularse de manera similar, tal como se indica para secuencias de aminoácidos.

El término "sujeto", usado en el presente documento, se interpreta que significa cualquier mamífero al que se le puede administrar polipéptido o polinucleótido de meteorina, células terapéuticas o cápsulas biocompatibles. Sujetos destinados específicamente para tratamiento con el método de la invención incluyen seres humanos, así como primates no humanos, ovejas, caballos, vacas, cabras, cerdos, perros, gatos, conejos, cobayas, hámsteres, jerbos, ratas y ratones, así como los órganos, tumores, y células derivadas u originarias de estos huéspedes.

Tal como se usa en el presente documento, el término "transformación" se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno (es decir, un "transgén") en una célula huésped. El polinucleótido exógeno se integra dentro del genoma del huésped.

El "tratamiento" puede realizarse de varias maneras diferentes, incluyendo curativo, de mejoría y como profilaxis. El tratamiento curativo generalmente pretende curar una afección clínica, tal como una enfermedad o una infección, que ya está presente en el individuo tratado. Un tratamiento de mejoría generalmente significa tratar para mejorar, en un individuo, una afección clínica existente. El tratamiento profiláctico generalmente pretende prevenir una afección clínica o reducir el riesgo de contraer la afección o reducir el alcance de la afección.

Un tratamiento que puede alterar la evolución subyacente de la enfermedad. Afectando al auténtico proceso de la enfermedad, terapia de "modificación de la enfermedad" puede retardar, invertir o prevenir la progresión de los síntomas, o puede cambiar la evolución a largo plazo de la enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha estado enlazado. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse de forma intercambiable, dado que el plásmido es la forma de vector usada más habitualmente. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados defectuosos en replicación), que sirven para funciones equivalentes.

### Alodinia

Alodinia, que significa “otro dolor”, es un dolor debido a un estímulo que normalmente no provoca dolor y puede ser térmico o mecánico/táctil. Es un dolor a partir de un estímulo que normalmente no causa la sensación de dolor, y puede producirse después de lesión en un sitio. La alodinia es diferentes de hiperalgesia y dolor espontáneo, que se describen en la sección “hiperalgesia” y “dolor espontáneo” respectivamente.

Existen diferentes clases o tipos de alodinia:

- Alodinia mecánica (también conocida como alodinia táctil)

- Alodinia mecánica estática - dolor en respuesta a ligero toque/presión
- Alodinia mecánica dinámica - dolor en respuesta a cepillado

- Alodinia térmica (calor o frío) - dolor a partir de temperaturas cutáneas normalmente suaves en la zona afectada

La alodinia es una característica clínica de muchas afecciones dolorosas, tales como neuropatías, síndrome de dolor regional complejo, neuralgia postherpética, fibromialgia, y migraña. La alodinia también puede ser causada por algunas poblaciones de células madre usadas para tratar daño nervioso incluyendo lesión de la médula espinal. En una realización preferida de la presente invención, la alodinia a tratar es alodinia por frío. En otra realización preferida de la presente invención la alodinia a tratar es alodinia por calor.

Los tipos celulares implicados en nocicepción y sensación mecánica son las células responsables de alodinia. En individuos sanos, los nocirreceptores detectan información sobre estrés o daño celular y temperatura en la piel y la transmiten a la médula espinal. Los cuerpos celulares de estas neuronas están en ganglios de la raíz dorsal, estructuras importantes ubicadas a ambos lados de la médula espinal. Los axones pasan, a continuación, a través del cuerno dorsal para establecer conexiones con neuronas secundarias. Las neuronas secundarias cruzan hasta el otro lado (contralateral) de la médula espinal y alcanzan los núcleos del tálamo. A partir de allí, la información es transportada a través de una o más neuronas hasta la corteza somatosensorial del cerebro. Los mecanorreceptores siguen la misma ruta general. Sin embargo, sin embargo no cruzan a nivel de la médula espinal, sino en su lugar en la médula inferior. Además, están agrupados en haces que son espacialmente distintos de los haces nociceptivos.

A pesar de esta separación anatómica, los mecanorreceptores pueden incluir en la emisión de nocirreceptores estableciendo conexiones con las mismas interneuronas, cuya activación puede reducir o eliminar completamente la sensación de dolor. Otra manera de modular la transmisión de información de dolor es mediante fibras descendentes desde el cerebro. Estas fibras actúan a través de diferentes interneuronas para bloquear la transmisión de información desde los nocirreceptores hasta neuronas secundarias.

Ambos de estos mecanismos para modulación del dolor han estado implicados en la patología de alodinia. Varios estudios sugieren que la lesión a la médula espinal podría causar la pérdida y reorganización de los nocirreceptores, mecanorreceptores e interneuronas, causando la transmisión de información del dolor mediante mecanorreceptores. Un estudio diferente describe el aspecto de fibras descendentes en el sitio de lesión. Todos estos cambios afectan en última instancia a los circuitos dentro de la médula espinal, y el equilibrio alterado de señales probablemente causa la sensación intensa de dolor asociada con alodinia.

Diferentes tipos celulares también se han relacionado con alodinia. Por ejemplo, hay informes de que la microglia en el tálamo podría contribuir a alodinia cambiando las propiedades de los nocirreceptores secundarios. El mismo efecto se consigue en la médula espinal mediante el reclutamiento de células del sistema inmunitario, tales como monocitos/macrófagos y linfocitos T.

Tal como ya se ha mencionado, existen neuronas descendentes que modulan la percepción del dolor. Muchas de

estas neuronas se originan en núcleos en el tronco del encéfalo y pasan a través de la zona gris periacueductal (PAG) del mesencéfalo.

5 El cuerpo posee un mecanismo adicional para controlar el dolor: la liberación de opioides endógenos, especialmente a nivel de la PAG. Existen neuronas que liberan encefalinas, endorfinas, y dimorfinas en la PAG, y de esta manera modulan su capacidad para modular la percepción del dolor. Otras neuronas pueden liberar su opioides endógenos en la fuente del dolor, también. Si esto ocurre, la transmisión de información del dolor desde los nocirreceptores hasta las neuronas secundarias se bloquea, y no se siente ningún dolor. Desafortunadamente, estos mecanismos endógenos a menudo resultan dañados y no son funcionales en personas que padecen alodinia, así que la  
10 aplicación de productos farmacéuticos es necesaria.

Numerosos compuestos alivian el dolor procedente de alodinia. Algunos son específicos de ciertos tipos de alodinia mientras que otros son generales. Estos incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), opioides y compuestos dirigidos a diferentes canales iónicos.

15

La presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de alodinia. Preferentemente la alodinia a tratar es alodinia térmica.

20 Tal como se documenta mediante el ejemplo 4, se consiguió inversión completa a la función sensorial normal en la mayoría de animales en el grupo que recibe la dosis más elevada de meteorina (1,8 mg/kg). Es concebible, por lo tanto, que la meteorina pueda dar como resultado inversión sustancialmente completa de alodinia en al menos un subconjunto de los sujetos tratados. En una realización preferida, el tratamiento da como resultado una modificación de la enfermedad en al menos un subconjunto de los sujetos tratados.

## 25 Hiperalgnesia

La hiperalgnesia es una respuesta extrema a un estímulo que normalmente es percibido como doloroso. El estímulo puede ser mecánico/táctil o térmico.

30 La hiperalgnesia es similar a otras clases de dolor asociadas con daño a los nervios tales como alodinia, y en consecuencia puede responder a tratamiento estándar para esta afección tal como se describe en la sección "alodinia".

En una realización, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de hiperalgnesia. Preferentemente la hiperalgnesia a tratar es hiperalgnesia térmica. En una realización de la presente invención, la hiperalgnesia a tratar es hiperalgnesia por frío. En otra realización de la presente invención, la hiperalgnesia a tratar es hiperalgnesia por calor. Tal como se ha afirmado anteriormente, se consiguió inversión sustancialmente completa de la función sensorial normal en animales que recibían la dosis más elevada de meteorina. Es concebible, por lo tanto, que la meteorina puede dar como resultado la inversión completa de hiperalgnesia en al menos un subconjunto de los  
40 sujetos tratados. En una realización preferida, el tratamiento da como resultado modificación de la enfermedad en al menos un subconjunto de los sujetos tratados.

## Dolor espontáneo

45 El dolor espontáneo se caracteriza por ser dolor que se produce sin ningún desencadenante. Los síntomas clínicos del dolor espontáneo incluyen sensaciones de sensación parestésica, dolor punzante, escozor, incisivo y paroxístico (similar a choque eléctrico) algunas veces asociado con disestesia y/o parestesia. La disestesia se define como una sensación de tacto desagradable, anormal, y puede considerarse como una clase de dolor que se produce espontáneamente. La parestesia se define como una sensación de hormigueo, pinchazos o entumecimiento de la  
50 piel de un sujeto sin efecto físico a largo plazo aparente. Parece probable que el dolor espontáneo esté causado por actividad espontánea de neuronas en la vía aferente.

En una realización, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de dolor espontáneo. Es concebible, por lo tanto, que la meteorina pueda dar como resultado la inversión completa de dolor espontáneo en al  
55 menos un subconjunto de los sujetos tratados. En una realización preferida, el tratamiento da como resultado modificación de la enfermedad en al menos un subconjunto de los sujetos tratados.

## Dolor fantasma



Las sensaciones de dolor fantasma se describen como percepciones que un sujeto experimenta en relación con una extremidad o un órgano que no es físicamente parte del cuerpo. Las sensaciones de dolor fantasma se registran de la forma más frecuente después de la amputación de un brazo o una pierna, pero también pueden producirse después de la eliminación de una mama o un órgano interno. La sensación de dolor fantasma varía de un individuo a otro. El dolor fantasma puede experimentarse como sensaciones relacionadas con el movimiento, el tacto, la temperatura, la presión y el picor.

En una realización, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de dolor fantasma.

**10 Causas de alodinia e hiperalgesia**

Alodinia, hiperalgesia y, en general, hipersensibilidad pueden surgir a partir de diversos trastornos, algunos de los cuales se enumeran a continuación.

<b>Clase</b>	<b>Subtipo de causa</b>
Lesión mecánica traumática	Neuropatía por atrapamiento Transección del nervio Lesión de la médula espinal Dolor postquirúrgico Dolor del miembro fantasma Formación de cicatrices Ciática
Metabólicos o nutricionales	Neuropatía alcohólica Pelagra Beriberi Síndrome de ardor en los pies
Vírica	Neuralgia postherpética Dolor de HIV/SIDA
Neurotoxicidad	Vincristina Cisplatino Taxol Talio Arsénico Terapia de radiación
Enfermedad (no vírica)	Diabetes Tumores malignos Esclerosis múltiple Neuralgia trigeminal Síndrome de Guillain-Barré Enfermedad de Fabry Enfermedad de Tangier Vasculitis / angiopática Amiloide Idiopática
Isquemia	Síndrome talámico Dolor post-accidente cerebrovascular

15

Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere un tratamiento de alodinia, hiperalgesia o hipersensibilidad en un sujeto al que se le diagnosticó un trastorno enumerado en la tabla anterior. Preferentemente, la invención se refiere al tratamiento de hipersensibilidad en un sujeto al que se le diagnosticó neuropatía diabética dolorosa, neuralgia postherpética o ciática. Más preferentemente, la invención se refiere al tratamiento de alodinia o hiperalgesia en un sujeto al que se le diagnosticó neuropatía diabética dolorosa, neuralgia postherpética o ciática. En una realización aún más preferida, la invención se refiere al tratamiento de alodinia en un sujeto al que se le diagnosticó neuropatía diabética dolorosa, neuralgia postherpética o ciática.

20

**25 Meteorina para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma**

En una realización, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma. En una realización más preferida, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de alodinia, hiperalgesia y/o dolor espontáneo. En aún una realización, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de hiperalgesia y/o alodinia.

5

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de alodinia. En una realización más preferida, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de alodinia mecánica. En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de alodinia térmica. En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de alodinia por frío. En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de alodinia por calor.

10

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de dolor espontáneo.

15

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de hiperalgesia. En una realización más preferida, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de hiperalgesia mecánica. En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de hiperalgesia térmica. En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de hiperalgesia por frío. En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al uso de meteorina para el tratamiento de hiperalgesia por calor.

20

Los ejemplos adjuntos (ejemplo 4) demuestran que el efecto de meteorina es de larga duración, en particular en vista de la relativamente corta semi-vida sérica de la meteorina (figura 11). Esto indica que la meteorina no solamente alivia los síntomas de hiperalgesia, hipersensibilidad, alodinia y dolor espontáneo, sino que la meteorina puede ser realmente capaz de modificar la enfermedad o el trastorno subyacente. Por lo tanto, en una realización, el tratamiento es un tratamiento que modifica la enfermedad.

25

Los ejemplos también demuestran que algunos de los sujetos puestos a prueba experimentaron inversión completa de su disfunción sensorial. Por lo tanto, en una realización, el tratamiento da como resultado inversión completa de disfunción sensorial, preferentemente inversión completa de alodinia, más preferentemente inversión completa de alodinia táctil en al menos un subconjunto de los sujetos tratados. En otra realización preferida, el tratamiento da como resultado sustancialmente inversión completa de hiperalgesia en al menos un subconjunto de los sujetos tratados.

30

35

#### **Uso de meteorina para el tratamiento de dolor neuropático**

El dolor neuropático es una categoría de dolor que incluye varias formas de dolor crónico y que resulta de la disfunción de tejido nervioso en lugar de somático. El dolor neuropático, que es dolor que se deriva de disfunción del sistema nervioso central o periférico, también puede ser consecuencia de daño a los nervios periféricos o a regiones del sistema nervioso central, puede resultar de enfermedad, o puede ser idiopático. Los síntomas del dolor neuropático incluyen sensaciones de escozor, hormigueo, electricidad, sensación parestésica, parestesia, disestesia, rigidez, entumecimiento en las extremidades, sensaciones de distorsión corporal, alodinia (dolor evocado por una estimulación que normalmente es inocua), hiperalgesia (sensibilidad anormal al dolor), hiperpatía (una respuesta exagerada de dolor que persiste largo tiempo después de que los estímulos del dolor cesan), dolor fantasma y dolor espontáneo.

40

45

Las actuales terapias para la gestión del dolor neuropático son de beneficio limitado para muchos pacientes, e implican efectos secundarios indeseables o toxicidades limitantes de la dosis. Además, las terapias actuales son sintomáticas, no modificadoras de la enfermedad. Sigue existiendo una necesidad de terapias mejoradas para la gestión y el tratamiento del dolor neuropático, especialmente aquellas que tienen la capacidad de modificar la enfermedad.

50

En una serie de estudios en animales los inventores de la presente invención han observado que la administración de dosis de meteorina causa una mejoría de larga duración en alodinia táctil y térmica, así como dolor espontáneo. En varios casos, el efecto terapéutico aún es detectable en los animales una semana después de la administración de la última dosis. En otros casos, el efecto terapéutico aún es detectable y significativamente diferente del tratamiento de control durante hasta dos o incluso tres semanas después de la última dosis.

55

En los casos observados, el polipéptido de meteorina ha sido administrado como inyecciones subcutáneas o intratecales cada segundo o tercer día durante 9 u 11 días. La meteorina es indetectable en el suero de animales 24 horas después de la inyección subcutánea. Por lo tanto, cualquier acumulación de meteorina con los esquemas de administración observados usados es improbable. El efecto de larga duración de la meteorina puede estar causado por cambios epigenéticos o mediante reparación de los daños a los nervios en los animales. La reparación puede ser a través de recuperación de la función, neurogénesis o diferenciación de precursores neuronales.

En cualquier caso, es altamente sorprendente que un efecto terapéutico pueda observarse un tiempo tan largo después del cese del tratamiento. En fármacos aprobados para el dolor neuropático, tales como gabapentina, inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina, antidepresivos tricíclicos, analgésicos, cannabinoides, y opiodes, el efecto terapéutico no se observa un tiempo tan largo después de la administración de la última dosis. Por ejemplo, en el caso de opiodes, la eficacia está supeditada al fármaco que está presente en suero sanguíneo. Cuando el nivel en suero sanguíneo del fármaco cae por debajo de cierto umbral, no se observa ningún efecto terapéutico.

Como los inventores de la presente invención han demostrado, la meteorina administrada a intervalos de dosificación largos es eficaz en el tratamiento de diferentes síntomas de diferentes tipos de dolor neuropático incluyendo alodinia térmica y táctil y dolor espontáneo, los inventores de la presente invención contemplan que el dolor neuropático en general puede ser tratado administrando polipéptido de meteorina a intervalos de dosificación relativamente largos.

Por un intervalo de dosificación relativamente largo se pretende al menos 2 días entre dosificaciones, tal como al menos 3 días entre dosificaciones, por ejemplo 2 dosificaciones por semana. Más preferentemente, el intervalo de dosificación largo es de al menos una semana, tales como al menos 2 semanas, más preferentemente al menos 3 semanas, tal como al menos 4 semanas, o al menos un mes.

Expresado de una manera diferente, los intervalos de dosificación son tan largos que, después de una dosificación de polipéptido de meteorina, el polipéptido ya no es detectable en el suero del sujeto a tratar cuando se administra la siguiente dosificación. En otra realización, el nivel en suero sanguíneo está por debajo de 10 ng/ml, tal como por debajo de 5 ng/ml, más preferentemente por debajo de 1 ng/ml, tal como por debajo de 0,5 ng/ml, por ejemplo por debajo de 0,1 ng/ml.

En algunas realizaciones, el intervalo de dosificación largo viene precedido por administración inicial más frecuente de meteorina, por ejemplo, dos veces al día, una vez al día, una vez cada día, una vez cada tres días, o una vez cada cuatro días. Esta pauta posológica inicial puede mantenerse por ejemplo, durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 21 días, o más. Una vez completada esta pauta posológica, la meteorina puede administrarse con menos frecuencia, por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere al uso de meteorina en un método de tratamiento de dolor neuropático en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido neurotrófico que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, donde dicha administración es tres veces por semana o de forma más infrecuente.

Preferentemente, la administración es administración semanal o más infrecuente. Aún más preferentemente la administración es administración quincenal o más infrecuente.

En una realización, el efecto terapéutico dicho tratamiento mejora al menos un síntoma de dolor neuropático durante todo el periodo entre administraciones del polipéptido. El al menos un síntoma puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo, dolor fantasma, sensaciones de escozor, hormigueo, electricidad, sensación parestésica, parestesia, disestesia, rigidez, entumecimiento en las extremidades, sensaciones de distorsión corporal e hiperpatía (una respuesta exagerada de dolor que persiste largo tiempo después de que los estímulos del dolor cesan). Preferentemente el al menos un síntoma se selecciona de entre alodinia, hiperalgesia y dolor espontáneo. Más preferentemente alodinia.

Preferentemente, dicho tratamiento no mantiene niveles medibles de dicho polipéptido en el suero de dicho sujeto durante todo el periodo entre administraciones del polipéptido.

Preferentemente, el nivel de dicho polipéptido en el suero de dicho sujeto cae por debajo de 10 ng/ml, tal como por

debajo de 5 ng/ml, más preferentemente por debajo de 1 ng/ml, tal como por debajo de 0,5 ng/ml, por ejemplo por debajo de 0,1 ng/ml entre administraciones del polipéptido.

En otro aspecto relacionado, se divulga un método de tratamiento dolor neuropático en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido neurotrófico que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, donde dicho tratamiento no mantiene niveles medibles de dicho polipéptido en el suero de dicho sujeto durante todo el intervalo entre administraciones del polipéptido.

10 La invención también se refiere al uso del polipéptido de la invención en dichos métodos de tratamiento de dolor neuropático y al uso de los polipéptidos de la invención en la fabricación de un medicamento para dicho tratamiento de dolor neuropático.

Preferentemente, el nivel de dicho polipéptido en el suero de dicho sujeto cae por debajo de 10 ng/ml, tal como por debajo de 5 ng/ml, más preferentemente por debajo de 1 ng/ml, tal como por debajo de 0,5 ng/ml, por ejemplo por debajo de 0,1 ng/ml entre administraciones del polipéptido.

Para estos aspectos de la invención que se refieren al tratamiento del dolor neuropático usando intervalos de dosificación largos, el polipéptido neurotrófico preferentemente tiene al menos el 85% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, más preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, más preferentemente al menos el 98%.

En una realización, el polipéptido neurotrófico comprende la secuencia consenso de la SEQ ID NO: 11.

25 Preferentemente el polipéptido neurotrófico tiene residuos de cisteína en las posiciones 7, 28, 59, 95, 148, 151, 161, 219, 243 y 265 con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

#### Meteorina

30 La presente invención se refiere al uso de polipéptidos que son identificados como proteína meteorina y polinucleótidos que codifican dicha proteína, en el tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma. La administración está, en una realización, contemplada para ser mediante uso de una cápsula para administración de una meteorina biológicamente activa secretada y/o un homólogo de la misma a un sujeto. La proteína meteorina ha sido identificada en seres humanos (SEQ ID No. 2), ratón (SEQ ID No. 5) y rata (SEQ ID No. 8) y diversas otras especies.

La meteorina humana existe como un precursor de 293 aminoácidos, que puede ser procesado para dar origen a al menos un péptido biológicamente activo. La meteorina se expresa a niveles elevados en el sistema nervioso y el ojo, y en particular subregiones del cerebro. Los precursores de meteorina de ratón (SEQ ID No 5) y rata (SEQ ID No 8) consisten en 291 aminoácidos, y los % de identidad con la proteína meteorina humana (SEQ ID NO: 2) son 80,3 y 80,2, respectivamente (véase la figura 6).

La meteorina humana contiene una secuencia de péptido señal N-terminal de 23 aminoácidos, que se escinde en el motivo de secuencia ARA-GY. Este sitio de escisión del péptido señal es predicho mediante el método SignalP. El extremo N de meteorina de ratón ha sido verificado mediante secuenciación N-terminal (Jorgensen et al., Characterization of meteorin - An evolutionary conserved neurotrophic factor, J mol Neurosci septiembre de 2009; 39 (1-2): 104-116).

La tabla 1 muestra el % de identidad de secuencia entre meteorina humana de longitud completa frente a secuencias de ratón y de rata. Véase el alineamiento en la figura 6a.

Secuencia	% id
ser humano	-
ratón	80,3
rata	80,2

La tabla 2 muestra el % de identidad de secuencia entre meteorina humana frente a secuencias de ratón y de rata después de la eliminación del péptido señal N-terminal. Véase el alineamiento en la figura 6b.

Secuencia	% id
ser humano	-

ratón	81,9
rata	79,6

Basándose en los residuos totalmente conservados, puede derivarse una secuencia consenso para meteorina madura (figura 6c), donde X se selecciona independientemente de entre cualquiera de los 21 aminoácidos de origen natural codificados por ADN. En una realización preferida, una meteorina variante comprende la secuencia consenso.

El efecto terapéutico de meteorina puede estar mediado a través de un efecto neurotrófico, un efecto sobre el crecimiento incluyendo proliferación, regeneración, recuperación de la función, mejora de la función, supervivencia, migración y/o diferenciación de células diana.

Una función biológica de la meteorina es la capacidad de inducir crecimiento de neuritas en cultivos de ganglios de la raíz dorsal disociados (DRG) tal como se describe en Jørgensen et al., Characterization of meteorin - An evolutionary conserved neurotrophic factor, J mol Neurosci septiembre de 2009; 39 (1-2): 104-116 y Nishino et al., "Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension", EMBO J., 23(9): 1998-2008 (2004).

Debido a la alta conservación de las cisteínas, se espera que estos residuos jueguen un importante papel en la estructura secundaria y terciaria de la proteína bioactiva. Una o más de las cisteínas pueden participar en la formación de puentes de cisteína intra- y/o intermoleculares.

Se ha demostrado que la meteorina tiene un efecto estimulante sobre el porcentaje de neuronas generadas por una línea de células madre neurales humanas (hNS1, anteriormente llamadas HNSC.100) y la meteorina también tiene un efecto estimulante sobre la generación de neuronas en un cultivo primario de células estriatales de rata (véase el documento WO 2005/095450).

#### Administración y formulación

Los polipéptidos de meteorina pueden administrarse de cualquier manera, que sea médicamente aceptable. Esto puede incluir inyecciones, mediante vías parenterales tal como intravenosa, intravascular, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intratumoral, intraperitoneal, intraventricular, intraepidural, intratecal, intracerebroventricular, intercerebral, u otras así como nasal, o tópica. La administración de liberación lenta también está incluida específicamente en la invención, mediante medios tales como inyecciones "depot" o implantes erosionables.

La administración de meteorina de acuerdo con esta invención puede conseguirse usando cualquier medio de administración adecuado, incluyendo:

inyección, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía intramuscular, por vía intratecal o a otro sitio adecuado; bomba (véase, por ejemplo, Annals of Pharmacotherapy, 27: 912 (1993); Cancer, 41: 1270 (1993); Cancer Research, 44: 1698 (1984)), microencapsulación (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4.352.883; 4.353.888; y 5.084.350, implantes poliméricos de liberación lenta (véase, por ejemplo, Sabel, Patente de Estados Unidos 4.883.666, células encapsuladas (véase, la sección "Cápsula biocompatible"), injertos celulares no encapsulados (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.082.670 y 5.618.531; e inhalación.

La administración puede ser mediante inyecciones periódicas de una embolada de la preparación, o puede hacerse más continua mediante administración intravenosa o intraperitoneal a partir de un depósito que es externo (por ejemplo, una bolsa IV) o interno (por ejemplo, un implante bioerosionable, un órgano bioartificial, una cápsula biocompatible de células productoras de meteorina, o una colonia de células productoras de meteorina implantadas). Véase, por ejemplo, los documento US 4.407.957, 5.798.113 y 5.800.828.

La administración localizada puede ser mediante medios tales como administración mediante un catéter a una o más arterias. En una realización de la presente invención, la administración localizada comprende administración usando células encapsuladas (tal como se describe en la sección "cápsula biocompatible"). Un tipo adicional de administración localizada comprende administración local de vectores de terapia génica, que son inyectados normalmente.

En una realización preferida de la presente invención, la administración es inyección parenteral, preferentemente inyección subcutánea o inyección intratecal.

- 5 Aunque es posible que los compuestos de la presente invención se administren como el producto químico en bruto, se prefiere presentarlos en forma de una formulación farmacéutica. Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse mediante técnicas convencionales, por ejemplo tal como se describe en el documento Remington: The Science and Practice of Pharmacy 2005, Lippincott, Williams & Wilkins.
- 10 La expresión “transportador farmacéuticamente aceptable” significa uno o más ingredientes orgánicos o inorgánicos, naturales o sintéticos, con el que el polipéptido de meteorina se combina para facilitar su aplicación. Un transportador adecuado incluye solución salina estéril aunque otras soluciones estériles y suspensiones estériles isotónicas acuosas y no acuosas que se sabe que son farmacéuticamente aceptables son conocidas para los expertos en la materia.
- 15 Los compuestos de la presente invención pueden formularse para administración parenteral y pueden presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas llenadas previamente, infusión de pequeño volumen o en recipientes multidosis, opcionalmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden asumir formas tales como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos u acuosos, por ejemplo soluciones en polietilenglicol
- 20 Los ejemplos de transportadores, diluyentes, disolventes o vehículos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables (por ejemplo, oleato de etilo), y puede contener agentes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes o de suspensión, estabilizantes y/o de dispersión. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo, obtenido mediante aislamiento aséptico de un sólido estéril o mediante liofilización a partir de solución para constitución antes
- 25 de uso con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril.

Una “cantidad efectiva” se refiere a esa cantidad que es capaz de mejorar o retardar la progresión de la afección patológica, degenerativa o dañina. Una cantidad efectiva puede determinarse de forma individual y se basará, en parte, en la consideración de los síntomas a tratar y los resultados buscados. Una cantidad efectiva puede ser

30 determinada por un experto en la materia empleando dichos factores y sin usar más que experimentación rutinaria.

Un sistema de liposomas puede ser cualquier variedad de vesículas unilaminares, vesículas multilaminares, vesículas plurilaminares estables, y pueden prepararse y administrarse de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo de acuerdo con las enseñanzas de las patentes de Estados Unidos

35 5.169.637, 4.762.915, 5.000.958 o 5.185.154. Además, puede ser deseable expresar los nuevos polipéptidos de esta invención, así como otros polipéptidos seleccionados, como lipoproteínas, para potenciar su unión a liposomas. Una proteína meteorina recombinante se purifica, por ejemplo, a partir de células CHO mediante cromatografía por inmunoafinidad o cualquier otro método conveniente, a continuación se mezcla con liposomas y se incorpora en ellos con alta eficiencia. La proteína encapsulada en liposoma puede ponerse a prueba in vitro para cualquier efecto sobre

40 estimulación del crecimiento celular.

Donde se desea administración de liberación lenta de un polipéptido de meteorina en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiera la administración de un polipéptido de meteorina, se contempla la microencapsulación de un polipéptido de meteorina.

45 La microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación sostenida se ha realizado con éxito con hormona del crecimiento humana (rhGH), interferón-(rhIFN-), interleuquina-2, y MN rgp120. Johnson et al., Nat. Med., 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223 (1993); Hora et al., Bio/Technology, 8: 755-758 (1990); Cleland, “Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems”, en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds.; WO 97/03692, WO 96/40072, WO

50 96/07399; y patente de Estados Unidos N.º 5.654.010.

Las formulaciones de liberación lenta de estas proteínas se desarrollaron usando polímero de ácido poliláctico-coglicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y amplia gama de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos lácticos y glicólicos, pueden aclararse rápidamente dentro del cuerpo humano.

55 Además, la degradabilidad de este polímero puede ajustarse desde meses a años dependiendo de su peso molecular y composición. Lewis, “Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer”, en: M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: Nueva York, 1990), págs. 1-41.

En una realización de la presente invención, se contempla una composición que comprende meteorina. La composición puede comprender un polipéptido aislado tal como se describe en el presente documento, un ácido nucleico aislado tal como se describe en el presente documento, un vector de expresión que codifica meteorina tal como se describe en el presente documento, una línea celular que expresa meteorina tal como se describe en el presente documento o una cápsula biocompatible que secreta meteorina tal como se describe en el presente documento.

### Dosificaciones

10 Se contemplan diversos regímenes posológicos para administración sistémica. En una realización, métodos de administración a un sujeto de una formulación que comprende un polipéptido de meteorina incluyen administrar meteorina a una dosificación de entre 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 10.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal del sujeto, por dosis. En otra realización, la dosificación está entre 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 7.500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal del sujeto, por dosis. En una realización adicional, la dosificación está entre 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 5.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal del sujeto, por dosis. En una realización diferente, la dosificación está entre 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 2.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal del sujeto, por dosis. En una realización más, la dosificación está entre 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 1.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal del sujeto, por dosis. En otra realización más, la dosificación está entre 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 700  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal del sujeto, por dosis. En una realización más preferible, la dosificación está entre 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal del sujeto, por dosis. En una realización la más preferible, la dosificación está entre 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal del sujeto, por dosis. En una realización preferida el sujeto a tratar es humano.

Orientación sobre dosificaciones y métodos de administración particulares se proporciona en la bibliografía; véase, por ejemplo, los documentos WO 02/78730 y WO 07/100898. Orientación sobre el cálculo de las dosificaciones equivalentes humanas basándose en dosificaciones usadas en experimentos en animales se proporciona en Reagan-Shaw et al., FASEB J, 22, 659-661 (2007).

La dosis administrada debe ajustarse cuidadosamente a la edad, el peso y la afección del individuo que está siendo tratado, así como la vía de administración, forma farmacéutica y régimen posológico, y el resultado deseado, y la dosificación exacta deben ser determinados por el facultativo.

En una realización de la presente invención, la administración se repite a diario. En otra realización, la administración se repite al menos 1-3 veces por semana, tales como 2-5 veces por semana, tales como 3-6 veces por semana, una vez cada tres días, una vez cada cuatro días, una vez cada cinco días, una vez cada seis días, o una vez cada 7 días.

En otras realizaciones, la meteorina se administra a un intervalo de dosificación relativamente largo. Un intervalo de dosificación relativamente largo pretende incluir al menos 2 días entre dosificaciones, tales como al menos 3 días entre dosificaciones, por ejemplo 2 dosificaciones por semana. Más preferentemente el intervalo de dosificación largo es al menos una semana, tal como al menos 2 semanas, más preferentemente al menos 3 semanas, tal como al menos 4 semanas, o al menos un mes.

Expresado de diferente manera, los intervalos de dosificación son tal largos so que después de una dosificación del polipéptido de meteorina, el polipéptido ya no es detectable en el suero del sujeto a tratar cuando se administra la siguiente dosificación. En otra realización, el nivel en suero sanguíneo está por debajo de 10 ng/ml, tal como por debajo de 5 ng/ml, más preferentemente por debajo de 1 ng/ml, tal como por debajo de 0,5 ng/ml, por ejemplo por debajo de 0,1 ng/ml.

En algunas realizaciones, la administración inicial de meteorina es, por ejemplo, dos veces al día, a diario, una vez cada dos días, una vez cada tres días, o una vez cada cuatro días. Esta pauta posológica puede mantenerse por ejemplo, durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 21 días, o más. Una vez completada esta pauta posológica, la meteorina puede administrarse con menor frecuencia, por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente.

### Polipéptidos de meteorina

Además de meteorina de longitud completa, meteorina sustancialmente de longitud completa y de prometeorina, la presente invención proporciona variantes biológicamente activas de los polipéptidos. Un polipéptido o fragmento de meteorina es biológicamente activo si muestra una actividad biológica de meteorina de origen natural, tal como se describe en el presente documento, tal como ser neurotrófico. Debe entenderse que la invención se refiere a

meteorina tal como se define en el presente documento.

La invención se refiere a una molécula de polipéptido aislada para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- a) la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID No. 3, 6 y 9;
- b) una variante de secuencia biológicamente activa de la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID No. 3, 6 y 9, donde la variante tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con dicha SEQ ID No.; y
- c) un fragmento biológicamente activo de al menos 50 aminoácidos contiguos de cualquiera de a) o b) donde el fragmento es al menos el 70% idéntico a dicha SEQ ID NO.

En una realización, la invención se refiere a un polipéptido aislado seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- i) AA<sub>30</sub>-AA<sub>288</sub> de la SEQ ID No 2, y polipéptidos que tienen de uno a cinco aminoácidos extra de la secuencia nativa en uno o ambos extremos, hasta AA<sub>25</sub>-AA<sub>293</sub> de la SEQ ID No 2;
- ii) AA<sub>28</sub>-AA<sub>286</sub> de la SEQ ID No 8 y polipéptidos que tienen de uno a cinco aminoácidos extra de la secuencia nativa en uno o ambos extremos, hasta AA<sub>23</sub>-AA<sub>291</sub> de la SEQ ID No 8;
- iii) AA<sub>31</sub>-AA<sub>289</sub> de la SEQ ID No 5 y polipéptidos que tienen de uno a cinco aminoácidos extra de la secuencia nativa en uno o ambos extremos, hasta AA<sub>26</sub>-AA<sub>294</sub> de la SEQ ID No 5; y
- iv) variantes de dichos polipéptidos, donde cualquier aminoácido especificado en la secuencia seleccionada se cambia a un aminoácido diferente, siempre que no más de 20 de los residuos de aminoácidos en la secuencia se cambien de este modo.

La actividad biológica preferentemente es actividad neurotrófica. Las variantes neurotróficamente activas pueden definirse con referencia al uno o más de los otros ensayos neurotróficos in vitro y/o in vivo descritos anteriormente en el documento WO 2005/095450, en particular el ensayo DRG.

Una actividad biológica preferida es la capacidad de desencadenar sustancialmente la misma respuesta que en el ensayo DRG descrito en Jørgensen et al., Characterization of meteorin - An evolutionary conserved neurotrophic factor, J mol Neurosci septiembre de 2009; 39 (1-2): 104-116. En este ensayo, células DRG se cultivan en presencia de la secuencia codificante de meteorina humana de longitud completa (SEQ ID NO 3). Por sustancialmente la misma respuesta en el ensayo DRG, se entiende que el crecimiento de neuritas a partir de células DRG es al menos el 20% del número obtenido en el ensayo DRG descrito en Jørgensen et al., Characterization of meteorin - An evolutionary conserved neurotrophic factor, J mol Neurosci septiembre de 2009; 39 (1-2): 104-116, más preferentemente al menos el 30%, más preferentemente al menos el 40%, más preferentemente al menos el 50%, más preferentemente al menos el 60%, más preferentemente al menos el 70%, más preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%. La actividad biológica de un fragmento o variante de meteorina también puede ser mayor que la de la meteorina de origen natural (SEQ ID NO 3).

Las variantes pueden diferir de meteorina de origen natural en la secuencia de aminoácidos o en maneras que no implican la secuencia, o de ambas maneras. Las variantes de la secuencia de aminoácidos ("variantes de secuencia") se producen cuando uno o más aminoácidos en meteorina de origen natural se sustituye por un aminoácido natural diferente, un derivado de aminoácido o aminoácido no nativo. Variantes particularmente preferidas incluyen meteorina de origen natural, o fragmentos biológicamente activos de meteorina de origen natural, cuyas secuencias difieren de la secuencia de tipo silvestre en una o más sustituciones de aminoácidos conservativas y/o semiconservativas, que normalmente tienen una influencia mínima sobre la estructura secundaria y terciaria y la naturaleza hidrófoba de la proteína o péptido. Las variantes también pueden tener secuencias, que difieren en una o más sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos no conservativas, que no suprimen la actividad biológica de meteorina. El alineamiento de Clustal W en la figura 6 puede usarse para predecir qué residuos de aminoácidos pueden sustituirse sin afectar sustancialmente a la actividad biológica de la proteína. En una realización preferida, una secuencia de meteorina variante comprende la secuencia consenso que tiene la SEQ ID NO 11.

Las sustituciones dentro del siguiente grupo (Clustal W, grupo de conservación "fuerte") se considerarán sustituciones conservativas dentro del significado de la presente invención -S,T,A; N,E,Q,K; N,H,Q,K; N,D,E,Q; Q,H,R,K; M,I,L,V; M,I,L,F; H,Y; F,Y,W. Las sustituciones dentro del siguiente grupo (Clustal W, grupo de conservación "débil") se considerarán sustituciones semiconservativas dentro del significado de la presente



invención -C,S,A; A,T,V; S,A,G; S,T,N,K; S,T,P,A; S,G,N,D; S,N,D,E,Q,K; N,D,E,Q,H,K; N,E,Q,H,R,K; V,L,I,M; H,F,Y.

Otras variantes dentro de la invención son aquellas con modificaciones que incrementan la estabilidad del péptido. Dichas variantes pueden contener, por ejemplo, uno o más enlaces no peptídicos (que sustituyen a los enlaces peptídicos) en la secuencia peptídica. También se incluyen: variantes que incluyen residuos diferentes de L-aminoácidos de origen natural, tales como D-aminoácidos o aminoácidos de origen no natural o sintéticos tales como beta o gamma aminoácidos y variantes cíclicas. La incorporación de D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos en el polipéptido puede incrementar su resistencia a proteasas. Véase, por ejemplo, el documento US 5.219.990. Las variantes de splicing se incluyen específicamente en la invención.

10 Cuando el resultado de una sustitución dada no puede predecirse con certidumbre, los derivados pueden ensayarse fácilmente de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento para determinar la presencia o ausencia de actividad neurotrófica, preferentemente usando el ensayo DRG descrito en Jørgensen et al., Characterization of meteorin - An evolutionary conserved neurotrophic factor, J mol Neurosci septiembre de 2009; 39  
15 (1-2): 104-116.

En una realización, el polipéptido es una variante alélica de origen natural de la secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID No. 3, 6 y 9. Este polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que es la traducción de una secuencia de ácido nucleico que difiere en un único nucleótido de una secuencia de  
20 ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID No. 1, 4 y 7.

Un polipéptido variante, tal como se describe en el presente documento, en una realización comprende un polipéptido donde cualquier aminoácido especificado en la secuencia seleccionada se cambia para proporcionar una sustitución conservativa.

25 Variantes dentro del alcance de la invención en una realización incluyen proteínas y péptidos con secuencias de aminoácidos que tienen al menos el 70 por ciento de identidad con meteorina humana, murina o de rata (SEQ ID NO: 3, 6 y 9). Más preferentemente, la identidad de secuencia es al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al  
30 menos el 95%, más preferentemente al menos el 98%.

En una realización preferida, la identidad de secuencia de la meteorina variante se determina con referencia a un polipéptido de meteorina humana (SEQ ID No 3).

35 En una realización, las variantes incluyen proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tienen al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO 3, más preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, más preferentemente al menos el 98%.

40 En una realización, variantes preferidas incluyen proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO 6, más preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, más preferentemente al menos el 98%.

45 En una realización, variantes preferidas incluyen proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO 9, más preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 85%, más preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95%, más preferentemente al menos el 98%.

50 En una realización, variantes de meteorina preferidas incluyen proteínas que comprenden 50-270 aminoácidos, más preferentemente 75-270 aminoácidos, más preferentemente 90-270 aminoácidos, más preferentemente 100-270 aminoácidos, más preferentemente 125-270 aminoácidos, más preferentemente 150-270 aminoácidos, más preferentemente 175-270 aminoácidos, más preferentemente 200-270 aminoácidos, más preferentemente 225-270  
55 aminoácidos, más preferentemente 250-270 aminoácidos.

En una realización, una meteorina variante en posiciones correspondientes comprende los residuos marcados en la figura 6 como completamente conservados (\*), más preferentemente una meteorina variante también comprende en posiciones correspondientes los residuos marcados en la figura 6 como conservados fuertemente (: los grupos conservados fuertemente incluyen: S,T,A; N,E,Q,K; N,H,Q,K; N,D,E,Q; Q,H,R,K; M,I,L,V; M,I,L,F; H,Y; F,Y,W), más

preferentemente una meteorina variante también comprende en posiciones correspondientes los residuos marcados en la figura 6 como menos conservados (. los grupos menos conservados incluyen: C,S,A; A,T,V; S,A,G; S,T,N,K; S,T,P,A; S,G,N,D; S,N,D,E,Q,K; N,D,E,Q,H,K; N,E,Q,H,R,K; V,L,I,M; H,F,Y). En particular, se contempla que las cisteínas conservadas deben estar ubicadas en posiciones correspondientes en una meteorina variante. Por lo tanto, 5 en una realización, una secuencia de meteorina variante tiene residuos de cisteína en las posiciones 7, 28, 59, 95, 148, 151, 161, 219, 243 y 265 con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

En una realización, el polipéptido neurotrófico comprende la secuencia consenso de la SEQ ID NO: 11. La secuencia consenso comprende los residuos de aminoácidos conservados en meteorina humana de ratón y de rata, tal como 10 se muestra en la figura 6. Preferentemente, el polipéptido neurotrófico tiene residuos de cisteína en las posiciones 7, 28, 59, 95, 148, 151, 161, 219, 243 y 265 con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

Las modificaciones no de secuencia pueden incluir, por ejemplo, derivatización química in vivo o in vitro de partes de meteorina de origen natural, así como acetilación, metilación, fosforilación, carboxilación, PEG-ilación, o 15 glucosilación. Al igual que es posible reemplazar sustituyentes de la proteína, también es posible sustituir grupos funcionales, que están unidos a la proteína, por grupos caracterizados por características similares. Dichas modificaciones no alteran la secuencia primaria. Éstas serán inicialmente conservativas, es decir, el grupo de sustitución tendrá aproximadamente el mismo tamaño, forma, hidrofobicidad y carga que el grupo original.

20 Muchos aminoácidos, incluyendo los aminoácidos terminales, pueden estar modificados en un polipéptido dado, mediante procesos naturales tales como glucosilación y otras modificaciones postraduccionales, o mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica. Entre las modificaciones conocidas que pueden estar presentes en polipéptidos de la presente invención están, por nombrar unos pocos ilustrativos, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, fijación covalente de flavina, fijación covalente de una fracción hemo, fijación covalente 25 de un polinucleótido o derivado de polinucleótido, fijación covalente de un lípido o derivado de lípido, fijación covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puentes disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucación, glucosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de 30 aminoácidos mediada por ARN transferente a proteínas tal como arginilación, y ubiquitinación.

Dichas modificaciones son bien conocidas para los expertos en la materia y se han descrito con gran detalle en la bibliografía científica. Varias modificaciones particularmente comunes, glucosilación, fijación de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación, por ejemplo, se describen en 35 la mayoría de los textos básicos, tales como, por ejemplo, I. E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 2ª Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York, 1993. Muchas revisiones detalladas están disponibles sobre este tema, tales como, por ejemplo, las proporcionadas por Wold, F., en *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12, 1983; Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182: 626-646, 1990 y Rattan et al., *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, Ann. N.Y. 40 Acad. Sci. 663: 48-62, 1992.

Además, la proteína puede comprender una marca proteica para permitir la posterior purificación y opcionalmente eliminación de la marca usando una endopeptidasa. La marca también puede comprender un sitio de escisión de 45 proteasa para facilitar la posterior eliminación de la marca. Ejemplos no limitantes de marcas de afinidad incluyen una marca de polihis, una marca GST, una marca HA, una marca Flag, una marca C-myc, una marca HSV, una marca V5, una marca de proteína de unión a maltosa, una marca de dominio de unión a celulosa. Preferentemente para producción y purificación, la marca es una marca polihis. Preferentemente, la marca es la parte C-terminal de la proteína.

50 La secuencia señal nativa de meteorina también puede sustituirse para incrementar la secreción de la proteína en producción recombinante en otros tipos celulares de mamífero.

Las modificaciones pueden producirse en cualquier lugar en un polipéptido, que incluyen la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. De hecho, el bloqueo del grupo 55 amino o carboxilo en un polipéptido, o ambos, mediante una modificación covalente, es común en polipéptidos de origen natural y sintéticos y dichas modificaciones pueden estar presentes en polipéptidos de la presente invención, también. Por ejemplo, el residuo amino terminal de polipéptidos preparados en *E. coli*, antes del procesamiento proteolítico, de forma casi invariable será N-formilmetionina.

Las modificaciones que se producen en un polipéptido a menudo estarán en función de cómo se prepara. Para polipéptidos preparados expresando un gen clonado en un huésped, por ejemplo, la naturaleza y la medida de las modificaciones estarán determinadas en gran parte por la capacidad de modificación postraduccional de la célula huésped y las señales de modificación presentes en la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Por ejemplo, la glucosilación a menudo no se produce en huéspedes bacterianos tales como *E. coli*. Por consiguiente, cuando se desea glucosilación, un polipéptido debe expresarse en un huésped de glucosilación, generalmente una célula eucariota. Las células de insecto a menudo llevan a cabo las mismas glucosilaciones postraducionales que las células de mamífero y, por esta razón, se han desarrollado sistemas de expresión en células de insecto para expresar de forma eficiente proteínas de mamífero que tienen patrones de glucosilación nativos, *inter alia*. Consideraciones similares se aplican a otras modificaciones.

Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o un grado variable en varios sitios en un polipéptido dado. Además, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones.

En general, tal como se usa en el presente documento, el término polipéptido abarca todas de dichas modificaciones, particularmente aquellas que están presentes en polipéptidos sintetizados expresando un polinucleótido en una célula huésped.

#### Secuencias de nucleótidos de meteorina

La invención proporciona uso médico de ADN genómico y cADN que codifica meteorina, incluyendo por ejemplo la secuencia de nucleótidos de cADN humano (SEQ ID No. 1 y 10), las secuencias de cADN de ratón (SEQ ID NO 4) y las secuencias de cADN de rata (SEQ ID No. 7).

Variantes de estas secuencias también están incluidas dentro del alcance de la presente invención.

La invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- i. La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- ii. Una variante de secuencia biológicamente activa de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, donde la variante tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3; y
- iii. Un fragmento biológicamente activo de al menos 50 aminoácidos contiguos de i) o ii) donde el fragmento es al menos el 70% idéntico a la SEQ ID NO: 3.

En una realización, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma que codifica un polipéptido, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- i) AA<sub>30</sub>-AA<sub>288</sub> de la SEQ ID No 2, y polipéptidos que tienen de uno a cinco aminoácidos extra de la secuencia nativa en uno o ambos extremos, hasta AA<sub>25</sub>-AA<sub>293</sub> de la SEQ ID No 2;
- ii) AA<sub>28</sub>-AA<sub>286</sub> de la SEQ ID No 8 y polipéptidos que tienen de uno a cinco aminoácidos extra de la secuencia nativa en uno o ambos extremos, hasta AA<sub>23</sub>-AA<sub>291</sub> de la SEQ ID No 8;
- iii) AA<sub>31</sub>-AA<sub>289</sub> de la SEQ ID No 5 y polipéptidos que tienen de uno a cinco aminoácidos extra de la secuencia nativa en uno o ambos extremos, hasta AA<sub>26</sub>-AA<sub>294</sub> de la SEQ ID No 5; y
- iv) variantes de dichos polipéptidos, donde cualquier aminoácido especificado en la secuencia seleccionada se cambia a un aminoácido diferente, siempre que no más de 20 de los residuos de aminoácidos en la secuencia se cambien de este modo.

La molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de una variante de ácido nucleico alélica de origen natural.

La molécula de ácido nucleico de la invención puede codificar un polipéptido variante, donde el polipéptido variante tiene la secuencia polipeptídica de una variante de polipéptido de origen natural.

En una realización, la molécula de ácido nucleico difiere en un único nucleótidos respecto a una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID No. 1, 4, 7 y 10.

- Preferentemente, el polipéptido codificado tiene al menos el 60% de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en la SEQ ID No. 3 preferentemente al menos el 65% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 70% de identidad de secuencia, más preferentemente, el 75% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 80% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 85% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 90% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 95% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 98% de identidad de secuencia, más preferentemente donde el polipéptido tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en dichas SEQ ID No. Dichas secuencias constituyen meteorina humana.
- 10 En una realización preferida, el polipéptido codificado comprende la secuencia consenso que tiene la SEQ ID NO: 11.
- 15 En una realización preferida, el polipéptido codificado tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 3, más preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 95%, más preferentemente al menos el 98%, más preferentemente donde dicho polipéptido tiene la secuencia de la SEQ ID No. 3.
- 20 En un aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo que consiste en
- a) la secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID No. 1, 4, 7 y 10;
  - b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID No. 1, 4, 7 y 10; y
  - 25 c) una secuencia de ácido nucleico de al menos 150 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID No. 1, 4, 7 y 10;
- 30 En una realización, el polinucleótido aislado de la invención tiene al menos el 60, más preferentemente al menos el 65%, más preferentemente al menos el 70%, más preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, preferentemente al menos el 85%, más preferido al menos el 90%, más preferido al menos el 95%, más preferido al menos el 98% de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos presentada como SEQ ID NO: 1.
- 35 En una realización preferida, el polinucleótido aislado de la invención tiene al menos el 50%, preferentemente al menos el 60%, más preferentemente al menos el 70%, más preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, preferentemente al menos el 85%, más preferido al menos el 90%, más preferido al menos el 95%, más preferido al menos el 98% de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos presentada como SEQ ID NO: 10.
- 40 En una realización, variantes de polinucleótido aisladas preferidas de la invención comprenden 150-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 175-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 200-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 225-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 250-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 300-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 350-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 400-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 450-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 500-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 550-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 600-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 650-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 700-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 750-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 800-900 ácidos nucleicos, más preferentemente 850-900 ácidos nucleicos.
- 50 Un grupo preferido de polinucleótidos aislados incluye las SEQ ID No 1 y 10, que son secuencias de cADN de meteorina humana. En general, la secuencia de cADN es mucho más corta que las secuencias genómicas y se inserta mucho más fácilmente en un vector de expresión apropiado y se transduce/transfecta en una célula de producción o una célula humana in vivo o ex vivo.
- 55 Además, las secuencias de nucleótidos de la invención incluyen secuencias, que son derivados de estas secuencias. La invención también incluye vectores, liposomas y otros vehículos transportadores, que abarcan una de estas secuencias o un derivado de una de estas secuencias. La invención también incluye proteínas transcritas y traducidas a partir de cADN de meteorina, preferentemente cADN de meteorina humana, incluyendo aunque sin limitarse a meteorina humana y derivados y variantes.

Moléculas de ácido nucleico con optimización de codones para expresión potenciada en células huésped seleccionadas, incluyendo aunque sin limitarse a *E. coli*, especies de levadura, hámster chino, cría de hámster, insecto, hongo, y ser humano también están contempladas.

- 5 Ácidos nucleicos variantes pueden prepararse mediante métodos de mutagénesis del estado de la técnica. Los métodos para mezclar secuencias codificantes de ser humano con las de ratón, rata o chimpancé también están contemplados.

- 10 Ácidos nucleicos variantes preparados intercambiando aminoácidos presentes en meteorina humana con el aminoácido presente en meteorina de ratón o de rata en la posición correspondiente, si este aminoácido es diferente del presente en meteorina humana.

### Vectores virales

- 15 En sentido amplio, la terapia génica busca transferir nuevo material genético a las células de un paciente con un beneficio terapéutico resultante para el paciente. Dichos beneficios incluyen tratamiento o profilaxis de una amplia gama de enfermedades, trastornos y otras afecciones.

- 20 Los enfoques de terapia génica ex vivo implican modificación de células aisladas (incluyendo aunque sin limitarse a células madre, células precursoras neurales y de la glia, y células madre fetales), que a continuación se infunden, injertan o trasplantan de otro modo en el paciente. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 4.868.116, 5.399.346 y 5.460.959. La terapia génica in vivo busca dirigirse directamente al tejido del paciente huésped in vivo.

- 25 Virus útiles como vectores de transferencia génica incluyen papovavirus, adenovirus, virus vaccinia, virus adenoasociado, herpesvirus y retrovirus. Los retrovirus adecuados incluyen el grupo que consiste en HIV, SIV, FIV, EIAV, MoMLV. Un grupo adicional de retrovirus adecuados incluye el grupo que consiste en HIV, SIV, FIV, EAIV, CIV. Otro grupo de vectores virales preferidos incluye el grupo que consiste en alfavirus, adenovirus, virus adenoasociados, baculovirus, HSV, coronavirus, virus del papiloma bovino, Mo-MLV, preferentemente virus adenoasociado.

- 30 Los virus preferidos para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso son lentivirus y virus adenoasociados. Ambos tipos de virus pueden integrarse en el genoma sin divisiones celulares, y ambos tipos han sido puestos a prueba en estudios en animales preclínicos para indicaciones del sistema nervioso, en particular el sistema nervioso central.

Métodos para la preparación de AAV se describen en la técnica, por ejemplo US 5.677.158. Los documentos US 6.309.634 y US 6.683.058 describen ejemplos de administración de AAV al sistema nervioso central.

- 40 Preferentemente, un vector de lentivirus es una partícula de lentivirus defectuosa en replicación. Dicha partícula de lentivirus puede producirse a partir de un vector lentiviral que comprende una LTR lentiviral en 5', un sitio de unión de tARN, una señal de empaquetamiento, un promotor enlazado de forma operativa a una señal de polinucleótidos que codifica dicha proteína de fusión, un origen de síntesis de ADN de segunda cadena y una LTR lentiviral en 3'. Métodos para la preparación y la administración in vivo de lentivirus a células neurales se describen en el documento
- 45 US 20020037281 (Methods for transducing neural cells using lentiviral vectors).

Los vectores retrovirales son los vectores usados más comúnmente en ensayos clínicos en ser humano, dado que portan 7-8 kb y dado que tienen la capacidad de infectar células y tienen su material genético integrado de forma estable en la célula huésped con alta eficiencia. Véase, por ejemplo, los documentos WO 95/30761; WO 95/24929.

- 50 Los *oncovirinae* requieren al menos una ronda de proliferación de células dianas para transferencia e integración de secuencias de ácido nucleico exógenas en el paciente. Los vectores retrovirales se integran aleatoriamente en el genoma del paciente. Los retrovirus pueden usarse para dirigirse a células madre del sistema nervioso dado que muy pocas divisiones celulares tienen lugar en otras células del sistema nervioso (en particular el SNC).

- 55 Se ha descrito tres clases de partículas retrovirales; ecotrópicas, que pueden infectar células murinas de forma eficiente, y anfotrópicas, que pueden infectar células de muchas especies. La tercera clase incluye retrovirus xenotrópicos que pueden infectar células de especies diferentes de las especies que produjeron el virus. Su capacidad para integrarse solamente en el genoma de células en división ha hecho a los retrovirus atractivos para marcar linajes celulares en estudios en desarrollo y para administrar genes terapéuticos o inductores de apoptosis a

cánceres o tumores.

Para uso en pacientes humanos, los vectores retrovirales deben ser defectuosos en replicación. Esto impide la generación adicional de partículas retrovirales infecciosas en el tejido diana--en su lugar, el vector defectuoso en replicación se convierte en un transgén "cautivo" estable incorporado en el genoma de la célula diana. Normalmente en vectores defectuosos en replicación, los genes gag, env y pol han sido deletados (junto con la mayoría del resto del genoma viral). ADN heterólogo se inserta en lugar de los genes virales deletados. Los genes heterólogos pueden estar bajo el control del promotor heterólogo endógeno, otro promotor heterólogo activo en la célula diana, o la LTR 5' retroviral (la LTR viral es activa en diversos tejidos). Normalmente, los vectores retrovirales tienen una capacidad transgénica de aproximadamente 7-8 kb.

Los vectores retrovirales defectuosos en replicación requieren provisión de las proteínas virales necesarias para la replicación y el ensamblaje in trans, a partir de, por ejemplo, líneas celulares de empaquetamiento diseñadas. Es importante que las células de empaquetamiento no liberen virus competentes en replicación y/o virus auxiliares. Esto se ha conseguido expresando proteínas virales de ARN que carecen de la señal  $\psi$ , y que expresan los genes gag/pol y el gen env a partir de unidades transcripcionales diferentes. Además, en algunos retrovirus de 2ª y 3ª generación, las LTR en 5' han sido sustituidas por promotores no virales que controlan la expresión de estos genes, y el promotor 3' ha sido minimizado para contener solamente el promotor proximal. Estos diseños minimizan la posibilidad de recombinación que causa producción de vectores competentes en replicación o virus auxiliares.

### **Vectores de expresión**

La construcción de vectores para la expresión recombinante de polipéptidos de meteorina para uso en la invención puede conseguirse usando técnicas convencionales que no requieren explicación detallada a un experto en la materia. Para revisión, sin embargo, los expertos en la materia pueden desear consultar el documento Maniatis et al., en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (NY 1982). Pueden usarse vectores de expresión para generar células productoras para producción recombinante de polipéptidos de meteorina para uso médico, y para generar células terapéuticas que secreten polipéptidos de meteorina para terapia desnuda o encapsulada.

En resumen, la construcción de vectores de expresión recombinantes emplea técnicas de ligamiento estándar. Para análisis para confirmar las secuencias correctas en vectores construidos, los genes se secuencian usando, por ejemplo, el método de Messing, et al., (*Nucleic Acids Res.*, 9: 309-, 1981), el método de Maxam, et al., (*Methods in Enzymology*, 65: 499, 1980), u otros métodos adecuados que serán conocidos por los expertos en la materia.

La separación por tamaño de fragmentos escindidos se realiza usando electroforesis en gel convencional tal como se describe, por ejemplo, por Maniatis, et al., (*Molecular Cloning*, págs. 133-134, 1982).

Para la generación de vectores de expresión eficientes, estos deben contener secuencias reguladoras necesarias para la expresión del gen codificado en el marco de lectura correcto. La expresión de un gen está controlada a niveles de transcripción, traducción o postraducción. El inicio de la transcripción es un evento temprano y crítico en la expresión génica. Esto depende de las secuencias promotora y potenciadora y está influido por factores celulares específicos que interactúan con estas secuencias. La unidad transcripcional de muchos genes consiste en los elementos promotor y en algunos casos potenciador o regulador (Banerji et al., *Cell* 27: 299 (1981); Corden et al., *Science* 209: 1406 (1980); y Breathnach y Chambon, *Ann. Rev. Biochem.* 50: 349 (1981)). Para retrovirus, elementos de control implicados en la replicación del genoma retroviral residen en la repetición terminal larga (LTR) (Weiss et al., eds., *The molecular biology of tumor viruses: RNA tumor viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, (NY 1982)). Las LTR de virus de leucemia murina de Moloney (MLV) y virus del sarcoma de Rous (RSV) contienen secuencias promotora y potenciadora (Jolly et al., *Nucleic Acids Res.* 11: 1855 (1983); Capecchi et al., en: *Enhancer and eukaryotic gene expression*, Gulzman and Shenk, eds., págs. 101-102, Cold Spring Harbor Laboratories (NY 1991)). Otros potentes promotores incluyen los derivados de citomegalovirus (CMV) y otros promotores virales de tipo silvestre.

Las regiones promotora y potenciadora de una serie de promotores no virales también se han descrito (Schmidt et al., *Nature* 314: 285 (1985); Rossi y deCrombrugge, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 84: 5590-5594 (1987)). Métodos para mantener e incrementar la expresión de transgenes en células quiescentes incluyen el uso de promotores incluyendo colágeno de tipo I (1 y 2) (Prockop y Kivirikko, *N. Eng. J. Med.* 311: 376 (1984); Smith y Niles, *Biochem.* 19: 1820 (1980); de Wet et al., *J. Biol. Chem.*, 258: 14385 (1983)), promotores de SV40 y LTR.

De acuerdo con una realización de la invención, el promotor es un promotor constitutivo seleccionado de entre el grupo que consiste en: promotor de ubiquitina, promotor de CMV, promotor JeT (US 6.555.674), promotor de SV40, promotor del factor 1 alfa de elongación (EF1- $\alpha$ ), RSV, CAG. Ejemplos de promotores inducibles/reprimibles incluyen: Tet-On, Tet-Off, promotor inducible por rapamicina, Mx1, Mo-MLV-LTR, progesterona, RU486.

5

Un grupo de promotores preferidos incluyen CAG, CMV, UbiC humana, JeT, SV40, RSV, promotor regulable por Tet, Mo-MLV-LTR, Mx1, Mt1 y EF-1 $\alpha$ .

Además de usar promotores virales y no virales para impulsar la expresión transgénica, puede usarse una secuencia potenciadora para incrementar el nivel de expresión transgénica. Los potenciadores pueden incrementar la actividad transcripcional no solamente de su gen nativo sino también de algunos genes extraños (Armeler, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 70: 2702 (1973)). Por ejemplo, en la presente invención, pueden usarse secuencias potenciadoras e colágeno con el promotor de colágeno 2 (I) para incrementar la expresión transgénica. Además, el elemento potenciador descubierto en virus SV40 puede usarse para incrementar la expresión transgénica. Esta secuencia potenciadora consiste en una repetición de 72 pares de bases tal como se describe por Gruss et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:943 (1981); Benoist y Chambon, Nature 290: 304 (1981), y Fromm y Berg, J. Mol. Appl. Genetics, 1: 457 (1982), todos los cuales se incorporan como referencia en el presente documento. Estas secuencias de repetición pueden incrementar la transcripción de muchos genes virales y celulares diferentes cuando están presentes en serie con diversos promotores (Moreau et al., Nucleic Acids Res. 9: 6047 (1981)).

20

Secuencias que potencian la expresión adicionales incluyen, aunque no se limitan a, elemento de regulación postranscripcional del virus de la hepatitis de Woodchuck, WPRE, SP163, potenciador de CMV, y aislador de [beta]-globina de pollo y otros aisladores.

## 25 Líneas celulares

En un aspecto, la invención se refiere a células madre aisladas modificadas genéticamente con el vector de acuerdo con la invención.

30 La invención también se refiere a células adecuadas para bioadministración de meteorina mediante células desnudas o encapsuladas, que están genéticamente modificadas para sobreexpresar meteorina, y que pueden trasplantarse al paciente para administrar polipéptido de meteorina bioactivo localmente. Dichas células pueden denominarse ampliamente como células terapéuticas.

35 Para terapia génica ex vivo, el grupo preferido de células incluye células neuronales, células precursoras neuronales, células progenitoras neuronales, células madre neuronales, células madre gliales humanas, células precursoras humanas, células madre y células fetales.

Para encapsulación, las células preferidas incluyen células epiteliales pigmentadas retinianas, que incluyen células 40 ARPE-19; fibroblastos inmortalizados humanos; y astrocitos inmortalizados humanos.

La línea celular ARPE-19 es una línea celular plataforma superior para tecnología de administración basada en células encapsuladas y también es útil para tecnología de administración basada en células no encapsuladas. La línea celular ARPE-19 es robusta (es decir, la línea celular es viable en condiciones astringentes, tales como 45 implantación en el sistema nervioso central o el entorno intraocular). Las células ARPE-19 pueden modificarse genéticamente para secretar una sustancia de interés terapéutico. Las células ARPE-19 tienen una esperanza de vida relativamente larga. Las células ARPE-19 son de origen humano. Además, las células ARPE-19 encapsuladas tienen una buena viabilidad en dispositivos in vivo. Las células ARPE-19 pueden administrar una cantidad eficaz de factor de crecimiento. Las células ARPE-19 desencadenan una reacción inmunitaria en el huésped despreciable. 50 Además, las células ARPE-19 son no tumorigénicas. Métodos para el cultivo y la encapsulación de células ARPE-19 se describen en el documento US 6.361.771.

En otra realización, la línea celular terapéutica se selecciona de entre el grupo que consiste en: líneas celulares de fibroblastos humanos, líneas celulares de astrocitos humanos, línea celular mesencefálica humana y línea celular 55 endotelial humana, preferentemente inmortalizada con TERT, SV40T o vmc.

## Matriz extracelular

La presente invención comprende además cultivar células que producen meteorina in vitro sobre una matriz

extracelular antes de la implantación en el sistema nervioso de mamífero. La preadhesión de células a microtransportadores antes de la implantación se diseña para potenciar la viabilidad a largo plazo de las células trasplantadas y proporcionar un beneficio funcional a largo plazo.

- 5 Los materiales de los que la matriz extracelular puede estar compuesta incluyen aquellos materiales a los que las células se adhieren después de incubación in vitro, y sobre los cuales las células pueden crecer, y que pueden implantarse en el cuerpo del mamífero sin producir una reacción tóxica, o una reacción inflamatoria que destruiría las células implantadas o interferiría de otro modo en su actividad biológica o terapéutica. Dichos materiales pueden ser sustancias químicas sintéticas o naturales, o sustancias que tienen un origen biológico.
- 10 Los materiales de la matriz incluyen, aunque no se limitan a, vidrio y otros óxidos de silicio, poliestireno, polipropileno, polietileno, fluoruro de polivinilideno, poliuretano, polialginato, polisulfona, alcohol polivinílico, polímeros de acrilonitrilo, poliacrilamida, policarbonato, polipentent, nylon, amilasas, gelatina natural y modificada y colágeno natural y modificado, polisacáridos naturales y modificados, incluyendo dextranos y celulosas (por ejemplo,
- 15 nitrocelulosa), agar y magnetita. Pueden usarse materiales reabsorbibles o no reabsorbibles. También se pretenden materiales de la matriz extracelular, que son bien conocidos en la técnica. Los materiales de la matriz extracelular pueden obtenerse comercialmente o prepararse cultivando células que secretan dicha matriz, eliminando las células secretoras, y permitiendo que las células que van a ser trasplantadas interactúen con y se adhieran a la matriz. El material de la matriz sobre el que crecen las células a implantar, o con el que las células se mezclan, puede ser un
- 20 producto autóctono de células RPE. Por lo tanto, por ejemplo, el material de la matriz pueden ser material de la matriz extracelular o de la membrana basal, que es producido y secretado por células RPE a implantar.

Para mejorar la adhesión, la supervivencia y la función celular, la matriz sólida puede estar revestida opcionalmente sobre su superficie externa con factores conocidos en la técnica para promover la adhesión, crecimiento o

25 supervivencia celular. Dichos factores incluyen moléculas de adhesión celular, matriz extracelular, tal como, por ejemplo, fibronectina, laminina, colágeno, elastina, glucosaminoglucanos, o proteoglucanos o factores de crecimiento.

Como alternativa, si la matriz sólida a la que las células implantadas se fijan está construida de material poroso, el

30 factor o factores que promueven el crecimiento o la supervivencia pueden incorporarse en el material de la matriz, desde el que se liberarían lentamente después de la implantación in vivo.

La configuración del soporte es preferentemente esférica, como en una perla, pero puede ser cilíndrica, elíptica, una lámina o tira plana, una forma de aguja o alfiler, y similares. Una forma preferida de matriz de soporte es una perla

35 de vidrio. Otra perla preferida es una perla de poliestireno.

Los tamaños de perla pueden variar entre aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  y 1 mm de diámetro, preferentemente de aproximadamente 90  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ . Para una descripción de diversas perlas microtransportadoras, véase, por ejemplo, isher Biotech Source 87-88, Fisher Scientific Co., 1987, págs. 72-75;

40 Sigma Cell Culture Catalog, Sigma Chemical Co., St, Louis, 1991, págs. 162-163; Ventrex Product Catalog, Ventrex Laboratories, 1989; estas referencias se incorporan por la presente como referencia. El límite superior del tamaño de la perla puede venir dictado por la estimulación por la perla de reacciones no deseadas del huésped, que pueden interferir en la función de las células trasplantadas o causar daños al tejido circundante. El límite superior del tamaño de la perla también puede venir dictado por la vía de administración. Dichas limitaciones son fácilmente

45 determinables por un experto en la materia.

#### Cápsula biocompatible

En un aspecto, la invención se refiere a una cápsula biocompatible que contiene células huésped aisladas

50 modificadas genéticamente con el vector de acuerdo con la invención.

La terapia de bioadministración de células encapsuladas se basa en el concepto de aislar células del sistema inmunitario del huésped receptor rodeando a las células con un material biocompatible semipermeable antes de la implantación dentro del huésped. La invención incluye una cápsula en la que las células se encapsulan en una

55 cápsula inmunoaislante. Las células se inmunoaislan del huésped encerrándolas dentro de cápsulas poliméricas implantables formadas por una membrana microporosa. Este enfoque impide el contacto célula a célula entre tejidos del huésped e implantados, eliminando el reconocimiento del antígeno a través de presentación directa.

La cápsula celular, en lo sucesivo denominada la cápsula, tiene una membrana que está diseñada a medida para



controlar la difusión de moléculas, tales como hormonas de factor de crecimiento, neurotransmisores, péptidos, anticuerpos y complementos, basándose en su peso molecular (Lysaght et al., 56 J. Cell Biochem. 196 (1996), Colton, 14 Trends Biotechnol. 158 (1996)). Usando técnicas de encapsulación, las células pueden trasplantarse en un huésped sin rechazo inmunitario, con o sin uso de fármacos inmunosupresores. Las cápsulas poliméricas  
5 biocompatibles útiles habitualmente contienen un núcleo que contiene células, suspendidas en un medio líquido o inmovilizadas dentro de una matriz de inmovilización, y una región circundante o periférica de matriz o membrana permeoselectiva (“envoltura”) que no contiene células aisladas, que es biocompatible, y que es suficiente para proteger a las células en el núcleo de un ataque inmunológico perjudicial. La encapsulación obstaculiza que  
10 elementos del sistema inmunitario entren en la cápsula, protegiendo de este modo a las células encapsuladas de la destrucción inmunitaria. La naturaleza semipermeable de la membrana de la cápsula también permite que la molécula biológicamente activa de interés se difunda fácilmente desde la cápsula al interior del tejido huésped circundante y permita que los nutrientes se difundan fácilmente al interior de la cápsula y soporten a las células encapsuladas. La cápsula puede estar hecha de un material biocompatible. Un “material biocompatible” es un  
15 material que, después de la implantación en un huésped, no desencadena una respuesta del huésped perjudicial suficiente para dar como resultado el rechazo de la cápsula o para hacerla inoperante, por ejemplo a través de degradación. El material biocompatible es relativamente impermeable a moléculas grandes, tales como componentes del sistema inmunitario del huésped, pero es permeable a moléculas pequeñas, tales como insulina, factores de crecimiento y nutrientes, mientras que permiten que los residuos metabólicos se eliminen. Diversos  
20 materiales biocompatibles son adecuados para la administración de factores de crecimiento mediante la composición de la invención. Se conocen numerosos materiales biocompatibles, que tienen diversas morfologías de la superficie externa y otras características mecánicas y estructurales. Preferentemente, la cápsula de esta invención será similar a las descritas por los documentos WO 92/19195, WO 95/05452 o WO 2005/095450, incorporados como referencia; o las patentes de Estados Unidos N.º 5.639.275; 5.653.975; 4.892.538; 5.156.844; 5.283.187; o la patente de Estados Unidos N.º 5.550.050, incorporadas como referencia.

25 Dichas cápsulas permiten el paso de metabolitos, nutrientes y sustancias terapéuticas mientras minimizan los efectos perjudiciales del sistema inmunitario del huésped. Los componentes del material biocompatible pueden incluir una membrana semipermeable circundante y el armazón de soporte celular interno. Preferentemente, las células recombinantes se siembran sobre el armazón, que está encapsulado por la membrana permeoselectiva. El  
30 armazón de soporte celular filamentoso puede estar hecho de cualquier material biocompatible seleccionado de entre el grupo que consiste en acrílico, poliéster, polietileno, poliácetonitrilo polipropileno, tereftalato de polietileno, nylon, poliamidas, poliuretanos, polibutéster, seda, algodón, quitina, carbono, o metales biocompatibles. Además, pueden usarse estructuras de fibras unidas para implantación celular (patente de Estados Unidos N.º 5.512.600). Los polímeros biodegradables incluyen los compuestos por ácido poli(láctico) PLA, ácido poli(láctico-coglicólico)  
35 PLGA, y ácido poli(glicólico) PGA y sus equivalentes. Los armazones de espuma se han usado para proporcionar superficies sobre las que células trasplantadas pueden adherirse (documentos WO 2005/095450 y WO 98/05304). Se han usado tubos de malla tejida como injertos vasculares (WO 99/52573). Adicionalmente, el núcleo puede estar compuesto por una matriz inmovilizada formada a partir de un hidrogel, que estabiliza la posición de las células. Un hidrogel es una red tridimensional de polímeros hidrófilos reticulados en forma de un gel, sustancialmente  
40 compuesto por agua.

La envoltura preferentemente tiene un límite de peso molecular, definido como ese peso molecular, donde la membrana (la envoltura) rechazará el 90% de los solutos, de menos de 1000 kD, más preferentemente entre 50-700 kD, más preferentemente entre 70-300 kD, más preferentemente entre 70-150 kD, tal como entre 70 y 130 kD. El  
45 límite de peso molecular debe seleccionarse para garantizar que la molécula bioactiva pueda escapar de la cápsula mientras se protege a las células encapsuladas del sistema inmunitario del paciente.

El grosor de la envoltura normalmente está en el intervalo de 2 a 200 micrómetros, más preferentemente de 50 a 150 micrómetros. La envoltura debe tener un grosor para dar a la cápsula suficiente resistencia para mantener a las  
50 células encapsuladas y debe mantenerse, con esto en mente, lo más fina posible para ocupar el menor espacio posible.

Diversos polímeros y mezclas de polímeros pueden usarse para fabricar la membrana semipermeable circundante, que incluye poliácrilatos (incluyendo copolímeros acrílicos), polivinilidenos, copolímeros de cloruro de polivinilo, poliuretanos, poliestirenos, poliamidas, acetatos de celulosa, nitratos de celulosa, polisulfonas (incluyendo  
55 poliétersulfonas), polifosfocenos, poliácridonitrilos, poli(acridonitrilo/cloruro de covinilo), así como derivados, copolímeros y mezclas de los mismos. Preferentemente, la membrana semipermeable circundante es una membrana de fibra hueca semipermeable biocompatible. Dichas membranas, y métodos para fabricarlas son divulgados por las patentes de Estados Unidos N.º 5.284.761 y 5.158.881. La membrana semipermeable

circundante puede estar formada a partir de una fibra hueca de poliétersulfona, tal como las descritas por la patente de Estados Unidos N.º 4.976.859 o la patente de Estados Unidos N.º 4.968.733. Un material de membrana semipermeable circundante alternativo es poli(acrilonitrilo/cloruro de covinilo) (Pan-PVC).

5 La cápsula puede ser de cualquier configuración apropiada para mantener la actividad biológica y proporcionar acceso para la administración del proceso o la función, incluyendo por ejemplo, cilíndrica, rectangular, en forma de disco, en forma de parche, ovoide, estrellada o esférica. Además, la cápsula puede estar bobinada o enrollada en una estructura similar a una malla o anidada. Si la cápsula se va a recuperar después de que se ha implantado, no se prefieren configuraciones, que tienden a causar migración de las cápsulas desde el sitio de implantación, tales como cápsulas esféricas lo suficientemente pequeñas para desplazarse en los vasos sanguíneos del huésped receptor. Ciertas formas, tales como rectángulos, parches, discos, cilindros y láminas planas ofrecen una mayor integridad estructural y son preferibles donde se desea recuperación. Una forma particularmente preferida es en forma de cilindro, dado que dicha forma se produce fácilmente a partir de fibras huecas que pueden producirse de forma industrial.

10  
15 Una macrocápsula en el presente contexto es una cápsula que tiene un volumen de al menos 1  $\mu\text{l}$ , tal como de 1 a 10  $\mu\text{l}$ .

20 Cuando se usan macrocápsulas, preferentemente al menos  $10^3$  células se encapsulan, tal como entre  $10^3$  y  $10^8$  células se encapsulan, de la forma más preferente de  $10^5$  a  $10^7$  células se encapsulan en cada dispositivo. Por supuesto, el número de células en cada cápsula depende del tamaño de la cápsula. Por norma general, en una cápsula con espuma (descrita a continuación) los inventores de la presente invención han descubierto que cargar entre 10.000 y 100.000 células por  $\mu\text{l}$  de cápsula (volumen calculado como el volumen interno incluyendo la espuma) da como resultado un buen llenado de la cápsula, más preferentemente de 25.000 a 50.000 células por  $\mu\text{l}$ , más  
25 preferentemente de 30.000 a 40.000 células por  $\mu\text{l}$ . El número de células a cargar también depende del tamaño de las células.

La dosificación puede estar controlada modificando las dimensiones (longitud, diámetro) de la cápsula y/o implantando un menor o mayor número de cápsulas, preferentemente entre 1 y 10 cápsulas por pacientes.

30 El armazón puede estar revestido con moléculas de la matriz extracelular (MEC). Los ejemplos adecuados de moléculas de la matriz extracelular incluyen, por ejemplo, colágeno, laminina y fibronectina. La superficie del armazón también puede modificarse tratando con irradiación con plasma para otorgar carga para potenciar la adhesión de células.

35 Puede usarse cualquier método adecuado de sellado de las cápsulas, incluyendo el uso de adhesivos poliméricos o engarce, anudamiento y termosellado. Además, cualquier métodos de sellado "en seco" adecuado también puede usarse, tal como se describe, por ejemplo, en el documento US 5.653.687.

40 Los dispositivos de células encapsuladas se implantan de acuerdo con técnicas conocidas. Muchos sitios de implantación están contemplados para los dispositivos y métodos de esta invención. Estos sitios de implantación incluyen, aunque no se limitan a, el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro, la médula espinal (véase los documentos, US 5.106.627, 5.156.844 y 5.554.148), y los humores acuoso y vítreo del ojo (véase el documento WO 97/34586).

45 La cápsula divulgada puede incluir una atadura integral que se extiende desde la cápsula y que es de una longitud suficiente para alcanzar al menos desde el sitio de tratamiento hasta las inmediaciones del sitio de inserción, facilitando de este modo la fijación de la cápsula en el sitio de inserción, por ejemplo a la superficie externa del cráneo. El sitio de inserción queda cubierto posteriormente por la piel.

50 Para facilitar la retirada de la cápsula del tejido, por ejemplo cuando el tratamiento llega a su fin, o si la cápsula debe ser sustituida, la transición entre la cápsula y la atadura podría ser suave y sin proyecciones de cualquier clase, o la dimensión podría incrementarse desde la cápsula hacia la atadura. Esto, obviamente, crea un borde entre las dos partes pero, dado que la relativamente pequeña cápsula forma el extremo distal del sistema de terapia, es decir el extremo que está hacia el cuerpo, puede prevenirse daño secundario durante la retirada de la cápsula. Si la cápsula y la atadura son tubulares con formas de sección transversal circulares, el tamaño radial de la cápsula puede ser, por lo tanto, preferentemente más pequeño que el tamaño radial de la atadura, y la cápsula y la atadura pueden unirse preferentemente de forma coaxial entre sí. Preferentemente, la cápsula de esta invención será similar en diseño a las descritas por los documentos WO 2006/122551 y WO 2005/095450.

Las cápsulas pueden llenarse usando una jeringa o como alternativa, puede usarse llenado automatizado o semiautomatizado, tal como se describe en el documento WO2007/048413.

## 5 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Purificación de proteínas

10 Meteorina de ratón (N.º de entrada de Uniprot Q8C1Q4; SEQ ID NO: 5) (aa22-291 (SEQ ID NO: 6) con un péptido señal de hCD33) se clonó en un vector de expresión. El vector se transfirió en la línea celular de mieloma de ratón NS0 mediante electroporación. Clones estables se aislaron y se cribaron para expresión de mMeteorina mediante análisis de Western usando anticuerpo policlonal Gt x mMETRN (AF3475). Medio acondicionado procedente de  
 15 cultivos que contienen meteorina de ratón se concentró, se suplementó con MOPS 20 mM, el pH se ajustó a 6,5, y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm. La muestra se aplicó a una resina de cromatografía de intercambio aniónico, se equilibró en MOPS 20 mM, NaCl 0,1 M, pH 6,5. Las fracciones que contenían meteorina de ratón se suplementaron con NaCl 2 M, el pH se ajustó a 7,0, y a continuación se aplicó a una resina de fenilsefarosa. Las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente decreciente de NaCl. Las fracciones enriquecidas en meteorina de  
 20 ratón se reunieron, se concentraron y se cargaron en una columna de filtración en gel Superdex y a continuación se equilibraron en PBS. La meteorina de ratón se eluyó como una proteína de aproximadamente 30 kDa de peso molecular. Las fracciones de interés se reunieron, se concentraron, se dializó contra PBS y se almacenó a -80°C.

### Ejemplo 2

#### Lesión del nervio ciático inducida fotoquímicamente

El efecto de meteorina administrada por vía sistémica (sc) se investigó en ratas con lesión en el nervio ciático inducida fotoquímicamente que se sabe que desarrollan alodinia para estimulación tanto mecánica como con frío en  
 30 el plazo de una semana después de la lesión (Kupers,R., Yu,W., Persson,J.K., Xu,X.J., y Wiesenfeld-Hallin,Z. (1998); Photochemically-induced ischemia of the rat sciatic nerve produces a dose-dependent and highly reproducible mechanical, heat and cold allodynia, and signs of dolor espontáneo. Pain 76, 45-59).

En resumen, después de lesión fotoinducida unilateral del nervio ciático, los animales se dividieron aleatoriamente  
 35 en cuatro grupos (n=8 por grupo) y se les inyectó solución salina como control negativo o meteorina a tres concentraciones diferentes (0,05, 0,2 y 0,8 mg/kg). Cada rata recibió seis inyecciones durante un periodo de dos semanas comenzando después de siete días cuando se desarrolló una alodinia estable. Las valoraciones comportamentales se llevaron a cabo antes de cada inyección durante el periodo de tratamiento y durante dos semanas adicionales.

40 A partir de la figura 1, es evidente que solución salina y meteorina a la dosis baja (0,05 mg/kg) no afectaban a la respuesta a estimulación mecánica de la pata trasera ipsilateral. 0,2 mg/kg de meteorina redujeron la alodinia mecánica moderadamente pero este grupo no era estadísticamente diferente del grupo de control con solución salina. En contraste, la inyección repetida de 0,8 mg/kg de meteorina produjo un alivio significativo y marcado de  
 45 alodinia mecánica. Después del cese del tratamiento el día 21, este grupo permanecía significativamente diferente del vehículo durante al menos una semana. Con el tiempo, la alodinia mecánica se restableció gradualmente.

La respuesta al frío se evaluó pulverizando brevemente cloruro de etilo sobre la superficie plantar de la pata trasera y puntuando el comportamiento del animal en consecuencia. La figura 2 muestra que el tratamiento con 0,8 mg/kg  
 50 de meteorina aliviaba potencialmente la estimulación de alodinia por frío y que los 0,2 mg/kg también tienen un efecto positivo significativo. Después del cese del tratamiento, el grupo tratado con 0,8 mg/kg de meteorina permaneció significativamente diferente del vehículo durante al menos una semana y había una tendencia hacia la mejoría incluso después de dos semanas. La alodinia por frío se restablecía gradualmente con el tiempo pero esto no era completo al final del experimento. No había ningún efecto de 0,05 mg/kg de meteorina que era similar al  
 55 grupo de control durante todo el estudio.

De forma importante, todos los animales ganaron peso de forma normal durante todo el estudio y no se observaron efectos secundarios (figura 3).

En conclusión, la meteorina reducía de forma dependiente de la dosis la alodinia tanto mecánica como por frío y el efecto duraba durante al menos una semana después del cese del tratamiento. Dos semanas después del cese del tratamiento, la hipersensibilidad parecía restablecerse gradualmente. No se observaron efectos secundarios.

### 5 Ejemplo 3

#### Lesión por constricción crónica (LCC)

El efecto de meteorina se investigó adicionalmente en el bien establecido modelo de lesión por constricción crónica (LCC) (Bennett, G.J., y Xie, Y.K. (1988); A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain 33, 87-107). En resumen, doce días después de la lesión, cuando se estableció una alodinia mecánica estable, los animales recibieron seis inyecciones subcutáneas de meteorina (0,1, 0,5, 2,0 mg/kg) o vehículo distribuidas durante las siguientes dos semanas (n=7-8 por grupo). Se siguió el comportamiento del animal durante todo el estudio hasta tres semanas después de la última inyección.

El soporte de peso se evaluó inmediatamente antes y después del tratamiento como un marcador sustituto para dolor espontáneo. Antes del tratamiento (día 12), todos los grupos presentaban un déficit de lado a lado de aproximadamente 50 g que se redujo a 10-15 g para los grupos tratados con meteorina. Después del cese del tratamiento, el efecto se redujo gradualmente y no había ninguna diferencia significativa entre los grupos después de tres semanas.

La alodinia mecánica también se evaluó en los animales con LCC. El umbral de retirada de la pata inicial promedio con estimulación mecánica con pelos de von Frey calibrados era de 15 g que se redujo gradualmente a 2 g el día 12 donde comenzó el tratamiento. Aunque el grupo de vehículo permanecía hipersensible durante todo el estudio (~2 g), la meteorina aliviaba eficazmente la alodinia mecánica a todas las dosis puestas a prueba (8-11 g). Después del cese del tratamiento, los animales en el grupo de tratamiento con meteorina seguía siendo significativamente diferente del grupo de control durante aproximadamente una semana, pero la alodinia se restableció gradualmente y no había ninguna diferencia entre grupos después de tres semanas. Para evaluar la magnitud del efecto, a los animales en el grupo de control se les administró una dosis elevada de gabapentina (200 mg/kg) para comparación. Una hora después del tratamiento con gabapentina, el umbral para estimulación mecánica era  $9,7 \pm 1,9$  g en comparación con  $1,9 \pm 0,7$  g antes del tratamiento. Está claro que la meteorina y la gabapentina son eficaces de manera similar pero, de forma importante, mientras que la gabapentina es un analgésico, la meteorina tiene efectos de larga duración y que potencialmente modifican la enfermedad.

Las inyecciones con meteorina no causaron pérdida de peso o diferencias comportamentales generales entre animales de control y tratados.

### Ejemplo 4

#### Lesión por constricción crónica (LCC)

##### **Objetivo**

Este estudio se diseñó para investigar la eficacia de meteorina recombinante administrada por vía subcutánea (s.c) para aliviar alodinia y dolor espontáneo en ratas producidos por lesión por constricción crónica (LCC) (Bennett y Xie, "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man", 1988, Pain 33; págs. 87-107).

##### **Métodos**

Meteorina recombinante. Meteorina de ratón recombinante (N.º de entrada de Uniprot Q8C1Q4) se produjo tal como se ha descrito en otro lugar en esta solicitud.

Cirugía: 30 ratas Sprague-Dawley macho que pesaban 250-280 g se sometieron a cirugía para producir una constricción crónica del nervio ciático izquierdo usando cuatro ligaduras flojas de sutura de cagut 4-0 crómico (modelo de LCC) (Bennett y Xie, "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man", 1988, Pain 33; págs. 87-107). Las ratas se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano gaseoso. Las ratas recibieron una incisión cutánea justamente caudal al bíceps femoral al nivel de la mitad del muslo en la extremidad trasera izquierda. A continuación se realizó una pequeña incisión en la capa de músculo

subyacente y se separó suavemente usando hemostatos teniendo cuidado de no alterar el nervio ciático. El nervio ciático a continuación se identificó, se liberó de tejido adherente y se elevó ligeramente usando pinzas en ángulo de 45°. Cuatro trozos de material de sutura de cagut 4-0 crómico (lavado previamente en solución salina estéril) se colocaron bajo el nervio y a continuación cada una se ató de forma floja alrededor del nervio en un nudo cuadrado.

- 5 Los nudos estaban separados por 1 mm. Estas ligaduras flojas permitían una constricción crónica del nervio sin cortar el suministro de sangre. Las capas de músculo se cerraron con mediante sutura 4-0 Vicryl y la piel se cerró con grapas para heridas.

- 10 Agrupamiento y análisis comportamental: el día 0 del experimento, todas las ratas se pusieron a prueba para alodinia mecánica usando filamentos de von Frey, alodinia térmica usando el método de Hargreaves y soporte de peso sobre las extremidades traseras usando un medidor de incapacidad. Se seleccionaron 24 ratas para continuar en el estudio y después se dividieron en cuatro grupos de tratamiento (n=6). A los animales se les inyectó cinco veces s.c. con vehículo, 0,1, 0,5 o 1,8 mg/kg de proteína meteorina los días postquirúrgicos 10, 12, 14, 17 y 19. Los animales se pusieron a prueba además para alodinia mecánica y térmica así como incapacidad los días 10, 12, 14, 15 17, 19, 21, 26, 32 y 39 postcirugía. De forma importante, se realizó el análisis comportamental antes de la inyección de meteorina para excluir efectos analgésicos inmediatos y para centrarse en potenciales efectos de modificación de la enfermedad de larga duración. Los animales se observaron y se siguió el peso corporal durante todo el estudio. El experimentador desconocía las condiciones del tratamiento y no se retiró ningún animal del estudio.

- 20 Ensayo para meteorina en suero: después del análisis comportamental el día postquirúrgico 39, a los animales se les administrados dosis a 0,1, 0,5 y 2 mg/kg de meteorina y se recogieron muestras de suero de rata a las 2, 6, 24 h después de la administración del fármaco. También se recogió suero a partir de ratas de control no tratadas. Había dos ratas para cada punto temporal. Todas las muestras de suero de rata se ensayaron mediante ELISA de meteorina de ratón (R&D Systems, DY3475).

25

## Resultados

- Alodinia y dolor espontáneo experimentales se indujeron en ratas mediante LCC (Bennett y Xie, 1988) y la alodinia táctil se evaluó usando pelos de Von Frey (figura 7). Las ratas tenían un umbral de retirada inicial de 30 aproximadamente 15 g que se redujo a 1,5 g 10 días después del LCC. Es evidente que el tratamiento con meteorina reducía rápidamente la alodinia y la fuerza resistida por ratas tratadas con 1,8 mg/kg de meteorina era significativa a día 17, 19, 21, 26 y 32 en comparación con ratas tratadas con vehículo. Por lo tanto, la diferencia significativa se mantuvo al menos 13 días después del cese del tratamiento y también se observó una tendencia hacia alodinia reducida después de 20 días. La mayoría de los animales en el grupo tratado con 1,8 mg/kg de 35 meteorina revertía a 15 g pero un animal no respondió, lo que explica el error estándar incrementando en este grupo particular.

- Con respecto a la sensibilidad térmica (figura 8), las ratas presentaban una latencia de retirada inicial de 16,5 segundos que se redujo a aproximadamente 7 segundos 10 días después de LCC, lo que significaba una alodinia 40 térmica. Los animales tratados con vehículo permanecían hipersensibles durante todo el estudio, mientras que el tratamiento con meteorina a 1,8 mg/kg dio como resultado rápidamente una disminución significativa de la latencia de retirada de la pata desde el día 14 que duró durante el resto del experimento incluyendo al menos tres semanas después del cese del tratamiento. De forma interesante, en lugar de volver al nivel de alodinia del grupo de vehículo, la latencia de retirada de la pata se nivelaba a los 10,5 segundos para este grupo de meteorina. La dosis de 0,5 45 mg/kg de meteorina también dio como resultado una latencia de retirada de la pata reducida, que se volvía significativa los días 19 y 21. También había una tendencia hacia alodinia reducida con 0,1 mg/kg de meteorina, aunque esto no alcanzaba niveles estadísticamente significativos. En resumen, la meteorina reducía de forma dependiente de la dosis la alodinia térmica con efectos significativos en el periodo de tratamiento y más allá.

- 50 En la criba inicial posquirúrgica, a las ratas se les distribuyó un peso igual entre ambas de sus extremidades traseras (figura 9). Sin embargo, después de la lesión LCC, había aproximadamente un 60% menos de peso aplicado a la extremidad trasera ipsilateral que se toma como marcador sustituto para el dolor espontáneo. El déficit de soporte de peso del 60% se mantuvo en el grupo de vehículo durante todo el estudio. En contraste, tanto 0,5 como 1,8 mg/kg de meteorina reducían rápidamente el déficit de soporte de peso y, en ambos casos, el efecto positivo 55 permanecía significativamente mejorado durante al menos tres semanas después del cese del tratamiento. Un efecto estadísticamente significativo también se observó con la meteorina a dosis baja el día 19. En general, desde el día 26 hasta el final del experimento, el déficit de soporte de peso se asentó en todos los grupos tratados con meteorina a niveles estables menores que el grupo de vehículo. Donde el grupo de control de vehículo permanecía por encima del 60%, los déficits de soporte de peso promedio para los grupos tratados con meteorina se asentaban

alrededor del 55%, 48% y 40% respectivamente para 0,1, 0,5 y 1,8 mg/kg de meteorina.

No se observaron efectos secundarios inmediatos y todos los animales ganaron peso de forma normal durante todo el estudio (figura 10).

5

Después de la última prueba comportamental el día 39, a los animales se les administraron dosis de 0,1, 0,5 y 1,8 mg/kg de meteorina y se recogieron muestras de suero 2, 6 y 24 horas después para evaluación farmacocinética (figura 11). La meteorina era apenas detectable en suero después de la inyección de 0,1 mg/kg pero se observó una buena relación entre dosis y concentración sérica entre las dos dosis más elevadas. Está claro, además, a partir de

10

la figura 11 que la meteorina ya no es detectable en suero 24 horas después de la inyección. En relación con esto, es interesante que los efectos beneficiosos observados duran varias semanas después de la última inyección donde la meteorina ya no está presente en el suero (figura 7, 8 y 9). Además, en lugar de retornar al nivel inicial de hipersensibilidad, el tratamiento con meteorina causa un nuevo nivel menos hipersensible. Tomado todo junto, es probable que la meteorina tenga propiedades que modifican la enfermedad. Por lo tanto, el efecto de larga duración

15

puede reflejar la normalización o restauración de la función neuronal.

### Conclusión

20 La administración de meteorina a animales que se prepararon quirúrgicamente para mostrar un síndrome similar a alodinia y dolor espontáneo dio como resultado reducción profunda de alodinia y dolor espontáneo inferida por una reducción de alodinia tanto térmica como táctil y una normalización de soporte de peso diferencial. Incluso aunque la meteorina está ausente del suero 24 horas después de las inyecciones, los efectos positivos duran durante varias semanas, demostrando de este modo propiedades que modifican la enfermedad.

### 25 Ejemplo 5: lesión del nervio ciático inducida fotoquímicamente, administración intratecal

#### Métodos

30 Cirugía. Ratas Sprague-Dawley macho (Harlan, países Bajos) que pesaban 380-450 g se equiparon con un catéter intratecal crónico con la punta en la intumescencia lumbar (Storkson, R.V., Kjorsvik, A., Tjolsen, A., y Hole, K. (1996). Lumbar catheterization of the spinal subarachnoid space in the rat. *J. Neurosci. Methods* 65, 167-172). De tres a cinco días después de la implantación del catéter, se produjo lesión isquémica del nervio ciático usando un método fotoquímico (Kupers, R., Yu, W., Persson, J.K., Xu, X.J., y Wiesenfeld-Hallin, Z. (1998); *Pain* 76, 45-59). En resumen, bajo anestesia general (hidrato de cloral 300 mg/kg), el nervio ciático izquierdo se expuso a nivel de la mitad del

35

muslo y se irradiaron durante 1,5 min con un láser de argón que funcionaba a 514 nm a una potencia promedio de 0,17 W. Eritrosina B (32,5 mg/kg disuelta en solución al 0,9%) se inyectó por vía intravenosa a través de la vena caudal justo antes de la irradiación. Esta operación conduce una hipersensibilidad altamente reproducible en el plazo de 7 días.

40

Evaluación de la alodinia. Para la evaluación de la alodinia mecánica, un conjunto de monofilamentos de nylon calibrados (pelos de von Frey, Stoelting, IL) se aplicó a la piel glabra de las patas con fuerza creciente hasta que el animal retira la extremidad. Cada monofilamento se aplicó 5 veces y se determinó el umbral de retirada como la fuerza a la que el animal retira la pata a partir de al menos 3 de 5 estímulos consecutivos. La respuesta a frío se puso a prueba con cloruro de etilo, que se pulverizó brevemente (<1 s) sobre la superficie plantar de la pata trasera.

45

La respuesta se puntuó de la siguiente manera: 0 = sin respuesta, 1 = respuesta similar a un espasmo, sin retirada de la pata trasera (normal), 2 = breve retirada de la pata trasera estimulada (dolor leve), 3 = retirada sostenida o repetida de la pata trasera estimulada, breve lamido o sacudida (dolor severo). Todas las pruebas fueron realizadas por un experimentador que desconocía las condiciones experimentales.

50

Configuración experimental. Las respuestas iniciales se evaluaron después de la implantación del catéter y de nuevo antes de la irradiación del nervio ciático. Las ratas que desarrollaron alodinia para estimulación mecánica y por frío 7 días después de la lesión del nervio se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (N=8) a los que se administró vehículo como control negativo y tres dosis de meteorina recombinante (0,5, 2 y 6 ug) a un volumen de 10 µl por vía intratecal. Cada rata recibió seis inyecciones durante un periodo de dos semanas (el día 7, 9, 11, 14, 16 y 18

55

contando a partir del momento de la lesión al nervio). Las pruebas comportamentales se realizaron antes de la inyección intratecal en días de tratamiento respectivos y además los días 21, 25, 28 y 35 después del cese del tratamiento.

#### Resultados

Tal como se ve en la figura 12, el umbral de retirada de la pata inicial para estimulación mecánica era de aproximadamente 50 g. 7 días después de lesión del nervio ciático inducida fotoquímicamente, las ratas desarrollaron alodinia mecánica significativa evidente como un umbral de retirada de la pata reducido de aproximadamente 8 g. Las ratas se dividieron a continuación aleatoriamente en cuatro grupos que recibían posteriormente vehículo o meteorina como seis inyecciones intratecales en el espacio de dos semanas. Con respecto a la meteorina, las ratas recibieron 0,5 µg, 2 µg o 6 µg. Está claro que la inyección intratecal de meteorina reducía de forma significativa y dependiente de la dosis la alodinia mecánica (figura 12). La alodinia mecánica se restablecía gradualmente en el plazo de una semana después del cese del tratamiento. La inyección intratecal de vehículo no afectó a la hipersensibilidad mecánica durante todo el experimento.

Tal como se ve en la figura 13, la respuesta al frío inicial es 1 que corresponde a una respuesta similar a un espasmo normal. 7 días después de lesión del nervio ciático inducida fotoquímicamente, las ratas desarrollaron una alodinia por frío marcada evidente como reacción de dolor leve. El tratamiento con 2 µg y 6 µg de meteorina invirtió rápidamente la alodinia por frío y los animales presentaron una respuesta cercana a la normal al frío en el periodo de tratamiento. Un efecto positivo significativo de 6 µg de meteorina también se observó tres días después del cese del tratamiento. Sin embargo, la alodinia por frío se restableció completamente una semana después de que el tratamiento terminó. El vehículo no tenía ningún efecto sobre la alodinia por frío.

## 20 Conclusión

La inyección intratecal repetida de meteorina reduce significativamente la alodinia mecánica y por frío en ratas después de la lesión isquémica del nervio ciático.

## 25 Ejemplo 6: Lista de secuencias

SEQ ID NO 1: cADN de meteorina humana

SEQ ID NO 2: secuencia de aminoácidos de longitud completa de meteorina humana

30

SEQ ID NO 3: secuencia de aminoácidos de meteorina humana sin péptido señal

SEQ ID NO 4: cADN de meteorina de ratón

35

SEQ ID NO 5: secuencia de aminoácidos de longitud completa de meteorina de ratón

SEQ ID NO 6: secuencia de aminoácidos de meteorina de ratón sin péptido señal

SEQ ID NO 7: cADN de meteorina de rata

40

SEQ ID NO 8: secuencia de aminoácidos de longitud completa de meteorina de rata

SEQ ID NO 9: secuencia de aminoácidos de meteorina de rata sin péptido señal

45

SEQ ID NO 10: secuencia de ADN optimizada con codón humana

SEQ ID NO 11: meteorina madura, secuencia consenso

cADN de meteorina humana (1109 pb; CDS=118-999) (SEQ ID NO 1)

50

>gi|34147349|ref|NM\_024042.2| Homo sapiens, proteína hipotética MGC2601 (MGC2601), mRNA

GCTTCGCCGGGGCCGGGGCCGGCGCCCGGGCTGCTCCCGCCGCCCGCCGGACCCGCGCCCCGCGGG  
 GCAGCGGTGGTGAGAGCCCGACTCCCCGGACGCGCCCGCCGTGCCATGGGGTTCCCGGCCGCGCGCT  
 GCTTCGCGCGCTGTGCTGCGGCCTCCTGGCCCCGGCTGCCCGCGCCGGCTACTCCGAGGAGCGCTGCAGC  
 TGGAGGGGCAGCGGCCTACCCAGGAGCCCGGCAGCGTGGGGCAGCTGGCCCTGGCCGTGTCGGAGGGCG  
 CGGTGAGTGGCTGTACCCGGCTGGGGCGCTGCGCCTGACCCCTGGCGGCCCGATCCCAGAGCGCGGCC  
 CGGCATCGCCTGTCTGCGGCCGTGCGGCCCTTCGCGGGCGCCCAGGTCTTCGCGGAGCGCGCAGGGGGC  
 GCCCTGGAGCTGCTGCTGGCCGAGGGCCCGGGCCCGGCAGGGGGCCGCTGCGTGCGCTGGGGTCCCCGCG  
 AGCGCCGGGCCCTCTTCCTGCAGGCCACGCCGACCCAGGACATCAGCCGCCGCGTGGCCGCTTCCGCTT  
 TGAGCTGCGCGAGGACGGGCGCCCCGAGCTGCCCGCAGGCCACGGTCTCGGCGTAGACGGTGCCTGC  
 AGGCCCTGCAGCGACGCTGAGCTGCTCCTGGCCGATGCACCAGCGACTTCGTAATTCACGGGATCATCC  
 ATGGGGTCACCCATGACGTGGAGCTGCAGGAGTCTGTCACTACTGTGGTGGCCGCCCGTTCCTCCGCCA  
 GACACCGCCGCTGTTCCAGGCGGGGCGATCCGGGACCAGGGGCTGACCTCCATTTCGTAACCCACTGCGC  
 TGTGGCGTCCACCCGGGCCAGGCACCTTCTCTCATGGGCTGGAGCCGCTTTGGGGAGGCCCGGCTGG  
 GCTGTCCCCACGATTCAGGAGTTCGCCGTGCTACGAGGCTGCCCGTGTGCCACCTCCACCCCTG  
 CGAGGTGGCGCTGCACTGAGGGGCTGGGTGCTGGGGAGGGGCTGGTAGGAGGGAGGGTGGCCCCACTGCT  
 TTGGAGGTGATGGGACTATCAATAAGAACTCTGTTACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Secuencia de aminoácidos de longitud completa de meteorina humana (SEO ID NO 2)

5 >|P|00031531.1 REFSEQ\_NP:NP\_076947 TREMBL:Q9UJH9 ENSEMBL:ENSP00000219542 Tax\_Id=9606  
 C380A1.2.1 (Nueva proteína)

**MGFPAAALLC ALCCGLLAPA ARAGYSEERC** SWRGSGLTQE PGSVGQLALA CAEGAVEWLY  
 PAGALRLTLG GPDPRARPGI ACLRPVRPFA GAQVFAERAG GALELLLAEG PGPAGGRCVR  
 WGPERRALF LQATPHQDIS RRVAEFRFEL REDGRPELPP QAHGLGVDGA CRPCSDAELL  
 LAACTSDFVI HGIIHGVTHD VELQESVITV VAARVLRQTP PLFQAGRSGD QGLTSIRTPL  
 RCGVHPGPGT FLFMGWSRFG EARLGCAPRF QEFRAYEAA RAAHLHPCEV ALH`

10 Meteorina humana, proteína sin péptido señal (SEQ ID NO 3)

GYSEERCSWR GSGLTQEPGS VGQLALACAE GAVEWLYPAG ALRLTLGGPD PRARPGIACL  
 RPVRPFAGA QVFAERAGGAL ELLLAEGPGP AGGRCVRWGP RERRALFLQA TPHQDISRRV  
 AAFRFELED GRPELPPQAH GLGVDGACRP CSDAELLAA CTSDFVIHGI IHGVTHDVEL  
 QESVITVVAA RVLQRTPPLF QAGRSGDQGL TSIRTPLRCG VHPGPGTFLF MGWSRFGEAR  
 LGCAPRFQEF RRAYEAARAA HLHPCEVALH

cADN de meteorina de ratón, 1363 pb, CDS 84..959 (SEQ ID NO 4)

15 NM\_133719. Meteorina de Mus musculus.[gi:56550040]



gggcagccgc gccgaggct gctcgcgctg cggccccgac cctcccgggg cagcagtccg  
 aggccccggc gcgtccccta accatgctgg tagccacgct tctttgcgcg ctctgttgcg  
 gcctcctggc cgcgtccgct cacgctggct actcgggaaga ccgctgcagc tggaggggca  
 gcggtttgac ccaggagcct ggcagcgtgg ggcagctgac cctggactgt actgagggcg

ctatcgagtg gctgtaccca gctggggcgc tgcgcctgac cctgggcggc cccgatccgg  
 gcacacggcc cagcatcgtc tgtctgcgcc cagagcggcc cttecgctgg gcccaggctc  
 tcgctgaacg tatgaccggc aatctagagt tgctactggc cgagggcccg gacctggctg  
 ggggcccgtg catgctgctg ggtccccgcg agcgcgcgagc ccttttcctg caggccacac  
 cacaccgcca catcagccgc agagttgctg ccttcggtt tgaactgcac gaggaccaac  
 gtgcagaaat gtctccccag gctcaaggct ttggtgtgga tgggtgcctgc aggcctgca  
 gtgatgccga gctcctcctg gctgcatgca ccagtgatt tgtgatccac gggaccatcc  
 atggggctgc ccatgacaca gagctgcaag aatcagtcac cactgtggtg gttgctcgtg  
 tcattcccca gacactgcca ctgttcaagg aaggagctc ggagggcca ggcgggctc  
 ccattcgtac cttgctgcgc tgtggtgtgc gtcctggccc aggtccttc ctctcatgg  
 gctggagccg atttggcgaa gcttggctgg gctgtgctcc ccgcttcaa gattcagcc  
 gtgtctatc agctgctctc acgaccatc tcaaccatg tgagatggca ctggactgag  
 agacctgga gcaagccctg gatggacctt cttctggaga tggggtgtg gggaggtga  
 tgggaggtg ggtgagaagg gtgtggctcg gatggcatcc tggtagccac agtgagctgg  
 tagaatacta agtaatctgg accataccag ccactgtagt catggtcttc tgtggcaggc  
 agcataccca gctctgtgcc tgccctcact tgtctactct ccagtctgct gcccttctaa  
 cccttcttag cctgctgacc agtgagctca tgttttctc gaattccagg gtgctgctgg  
 ggttcagagc aaccgtgccg tagtttgaa gacttgagct aattgtttt tttttgttg  
 ttttttgtt tgtttaaagg tggcctgggg ggggcggcaa aca

**Secuencia de aminoácidos de longitud completa de meteorina de ratón (SEQ ID NO 5)**

5 ref|NP\_598480.1| meteorina [Mus musculus]

MLVATLLCAL CCGLLAASAH AGYSEDRC SW RGSGLTQEPG SVGQLTLDCT EGAIEWLYPA  
 GALRLTLGGP DPGTRPSIVC LRPERPFAGA QVFAERMTGN LELLAEGPD LAGGRMRWG  
 PRERRALFLQ ATPHRDISRR VAAFRFELHE DQRAEMSPQA QGLGVDGACR PCSDAELLA  
 ACTSDFVIHG TIHVAHDTE LQESVITVVV ARVIRQTLPL FKEGSSEGQG RASIRTLRRC  
 GVRPGPGSFL FMGWSRFGEA WLGAPRFQE FSRVYSAALT THLNPCEMAL D

**Proteína meteorina de ratón sin péptido señal (SEQ ID NO 6)**

10

GYSEDRC SW RGSGLTQEPGS VGQLTLDCTE GAIEWLYPAG ALRLTLGGPD PGTRPSIVCL RPERPFAGA Q  
 VFAERMTGNL ELLLAEGPDL AGGRMRWGP RERRALFLQA TPHRDISRRV AAFRFELHED QRAEMSPQA Q  
 GLGVDGACRP CSDAELLAA CTSDFVIHGT IHVAHDTEL QESVITVVVA RVIRQTLPLF KEGSSEGQGR  
 ASIRTLRRCG VRPGPGSFLF MGWSRFGEAW LGAPRFQEF SRVYSAALTT HLNPCEMALD

**cADN de meteorina de rata (1026 pb; CDS=1-876) (SEQ ID NO 7)**

15 >gi|34870570|ref|XM\_213261.2| proteína de Rattus norvegicus similar a 1810034B16Rik (LOC287151), mRNA

ATGCTGGTAGCGGCGCTTCTCTGCGCGCTGTGCTGCGGCCCTTTGGCTGCGTCCGCTCGAGCTGGCTACT  
 CCGAGGACCGCTGCAGCTGGAGGGGCGAGCGGTTTGACCCAGGAACCTGGCAGCGTGGGGCAGCTGACCCCT  
 GGATTGTACTGAGGGTGCTATCGAGTGGCTGTATCCAGCTGGGGCGCTGCGCCTGACTCTAGGCGGCTCT  
 GATCCGGGCACGCGGCCAGCATCGTCTGTCTGCGCCCAACACGGCCCTTCGCTGGTGCCAGGTCTTCG  
 CTGAACGGATGGCCGGCAACCTAGAGTTGCTACTGGCCGAGGGCCAAGGCCTGGCTGGGGCCGCTGCAT  
 GCGCTGGGGTCTCGCGAGCGCCGAGCCCTTTTCTGCGAGGCCACGCCACACCGGGACATCAGCCGAGA  
 GTTGTGCTGCCTTCCAAATTTGAACTGCACGAGGACCAACGTGCAGAAATGTCTCCCCAGGCCAAGGTTTTG  
 GTGTGGATGGTGCCTCGAGGCCCTGCAGTGA TGCCGAGCTCCTTCGACTGCATGCACCAGTGACTTTGT  
 GATCCATGGGACCATCCATGGGGTTCGTCATGACATGGAGCTGCAAGAATCAGTCATCACTGTGGTGGCC  
 ACTCGTGTATCCGCCAGACACTGCCACTGTTCCAGGAAGGGAGCTCGGAGGGCCGGGGCCAGGCCCTCCG  
 TTCGTACCTTGTGGCTGTGGTGTGCGTCCCTGGCCAGGCTCCTTCCTTTCATGGGCTGGAGCCGATT  
 TGCGGAAGCTTGGCTGGCTGCGCTCCCCGCTTCCAAGAGTTCAGCCGTGTCTATTAGCTGCTCTCGCG  
 GCCACCTCAACCCATGTGAGGTGGCACTGGACTGAGAGACCTGGGAGCAAGCCCTGGATGGATCTTCCT  
 CTGGGGATGGGGTGTGGGGAGGGGTGATAGGAGGGTGGGTGGGAAGGGTGTGGCTCAGATGGCATCCTG  
 GTACCCACAGTGAGGTGGTAGAATACTAAATAACCTGGATCACACC

**Secuencia de aminoácidos de longitud completa de meteorina de rata (SEQ ID NO 8)**

5 >|PI00369281.1|REFSEQ\_XP:XP-213261|ENSEMBL:ENSRNOP00000026676

**MLVAALLCAL CCGLLAASAR** AGYSEDRCSW RGSGLTQEPG SVGQLTLDCT EGAIEWLYPA

GALRLTLGGS DPGTRPSIVC LRPTRPFAGA QVFAERMAGN LELLAEGQG LAGGRCMRWG  
 PRRRALFLQ ATPHRDISRR VAAFQFELHE DQRAEMSPQA QFGVDGACR PCSDAELLT  
 ACTSDFVIHG TIHGVVHME LQESVITVVA TRVIRQTLPL FQEGSSEGRG QASVRTLLRC  
 GVRPGPGSFL FMGWSRFGEA WLGAPRFQE FSRVYSAALA AHLNPCEVAL D

**Meteorina de rata, proteína sin péptido señal (SEQ ID No 9)**

10

GYSEDRCSWR GSGLTQEPGS VGQLTLDCTE GAIEWLYPAG ALRLTLGGSD PGTRPSIVCL  
 RPTRPFAGA QVFAERMAGNL ELLLAEGQGL AGGRCMRWGP RRRALFLQA TPHRDISRRV  
 AAFQFELHED QRAEMSPQA QFGVDGACRP CSDAELLTA CTSDFVIHGT IHGVVHDMEL  
 QESVITVVA TRVIRQTLPL FQEGSSEGRG ASVRTLLRC VRRPGPGSFLF MGWSRFGEAW  
 LGAPRFQEF SRVYSAALAA HLNPCVALD

**Secuencia de nucleótidos de meteorina con optimización de codones presente en construcciones pCAn.Meteorin y pT2.CAn.Meteorin (SEQ ID NO 10)**

15

ATGGGCTTTCCCGCTGCCGCCCTGCTGTGCGCTCTGTGCTGCGGACTGCT  
 GGCTCCTGCAGCCAGAGCCGGCTACAGCGAGGAACGGTGCAGCTGGCGGG  
 GCAGCGGCCTGACCCAGGAACCTGGCAGCGTCCGCCAGCTCGCACTGGCC  
 TGTGCAGAAGGCGCCGTGGAGTGGCTGTACCCCGCAGGCGCCCTGAGACT  
 GACCCCTGGGCGGACCCGACCCAGAGCCAGACCCGGCATTGCCTGTCTGA  
 GGCCCGTGCGGCCTTTTCGCTGGCGCCAGGTGTTCCGCCAGAGAGCCGGC  
 GGAGCCCTGGAACCTCCTGCTCGCCGAAGGCCCTGGTCCAGCCGGCGGAAG  
 ATGCGTGAGATGGGGCCAAGAGAGCGGAGAGCCCTGTTCCCTGCAAGCCA  
 CCCCCACCAGGACATCAGCAGACGGGTGGCCGCCTTCAGATTCGAGCTG  
 CGGGAGGACGGTAGACCCGAGCTGCCACCTCAGGCCACGGACTGGGAGT  
 GGACGGCGCCTGCAGACCCTGTAGCGACGCCGAGCTGCTGCTCGCCGCCT  
 GCACCAGCGACTTCGTGATCCACGGCATCATCCACGGCGTGACCCACGAC  
 GTGGAGCTGCAGGAAAGCGTCATCACCGTCGTCGCCGCCAGAGTGCTGAG  
 ACAGACCCCCCTCTGTTCCAGGCCGGCAGAAGCGGCGACCAGGGCCCTGA  
 CCAGCATCCGGACCCCCCTGAGATGCGGGCGTGATCCCGGACCCGGCACC  
 TTCTGTTTCATGGGCTGGTCCAGATTCGGCGAGGCCCGGCTGGGCTGCGC  
 TCCCCGTTCCAGGAATTCAGACGGGCCTACGAGGCCGCCAGGGCCGCTC  
 ATCTGCACCCCTGCGAGGTGGCCCTGCATTGA

**Secuencia consenso, meteorina madura (SEQ ID No 11)**

	GYSEXRC	SWR	GSGLTQ	EPGS	VGQLXL	XCXE	GAXEWL	YPAG	ALRLTL	GGXD	PXXRPX	I	60
	RPXRP	F	AERXX	GXL	ELLLA	E	GGRCX	RWGP	RERRAL	FLQA	TPHXDI	S	120
	AAF	FEL	XED	XR	EXXP	QAX	GXGVD	GACRP	CSDAEL	LLXA	CTSDF	VIHG	180
	QESVI	T	VVXX	RVXR	Q	TXPLF	XXGX	XXXXG	XSXR	TL	RCG	VXPG	240
5	LGCA	PRF	QEF	XRXY	XA	XXX	HLXP	CE	ALX				270

X es cualquiera de los 21 aminoácidos que pueden ser codificados por ADN.

LISTA DE SECUENCIAS

- 10 <110> NsGene A/S Johansen, Teit Wahlberg, Lars U Jørgensen, Jesper R.
- <120> Tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y dolor fantasma.
- 15 <130> P2413PC00
  - <150> DK PA 2010 70423
  - < 151> 2010-01-01
- 20 <150> US 61/390,791
  - < 151> 2010-01-07
  - <160> 11
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
  - <210> 1
  - < 211> 1109
  - < 212> ADN
- 30 < 213> Homo sapiens
  - <220>
  - < 221> CDS

< 222> (118)..(999)

<400> 1

gcttcgcccgg ggccggggcgg ccggcgcccc cggtctctcc cgccgcccgc cggaccgcgg	60
ccccgcccggg gcagcgggtgg tgagagcccc gactccccgg acgccgcccg ccgtgcc	117
atg ggg ttc ccg gcc gcg gcg ctg ctc tgc gcg ctg tgc tgc ggc ctc Met Gly Phe Pro Ala Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu 1 5 10 15	165
ctg gcc ccg gct gcc cgc gcc ggc tac tcc gag gag cgc tgc agc tgg Leu Ala Pro Ala Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Arg Cys Ser Trp 20 25 30	213
agg ggc agc ggc ctc acc cag gag ccc ggc agc gtg ggg cag ctg gcc Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Ala 35 40 45	261
ctg gcc tgt gcg gag ggc gcg gtt gag tgg ctg tac ccg gct ggg gcg Leu Ala Cys Ala Glu Gly Ala Val Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala 50 55 60	309
ctg cgc ctg acc ctg ggc ggc ccc gat ccc aga gcg cgg ccc ggc atc Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly Pro Asp Pro Arg Ala Arg Pro Gly Ile 65 70 75 80	357
gcc tgt ctg cgg ccg gtg cgg ccc ttc gcg ggc gcc cag gtc ttc gcg Ala Cys Leu Arg Pro Val Arg Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala 85 90 95	405
gag cgc gca ggg ggc gcc ctg gag ctg ctg ctg gcc gag ggc ccg ggc Glu Arg Ala Gly Gly Ala Leu Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Pro Gly 100 105 110	453

5

ccg gca ggg ggc cgc tgc gtg cgc tgg ggt ccc cgc gag cgc cgg gcc	501
Pro Ala Gly Gly Arg Cys Val Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala	
115 120 125	
ctc ttc ctg cag gcc acg ccg cac cag gac atc agc cgc cgc gtg gcc	549
Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro His Gln Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala	
130 135 140	
gcc ttc cgc ttt gag ctg cgc gag gac ggg cgc ccc gag ctg ccc ccg	597
Ala Phe Arg Phe Glu Leu Arg Glu Asp Gly Arg Pro Glu Leu Pro Pro	
145 150 155 160	
cag gcc cac ggt ctc ggc gta gac ggt gcc tgc agg ccc tgc agc gac	645
Gln Ala His Gly Leu Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp	
165 170 175	
gct gag ctg ctc ctg gcc gca tgc acc agc gac ttc gta att cac ggg	693
Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly	
180 185 190	
atc atc cat ggg gtc acc cat gac gtg gag ctg cag gag tct gtc atc	741
Ile Ile His Gly Val Thr His Asp Val Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile	
195 200 205	
act gtg gtg gcc gcc cgt gtc ctc cgc cag aca ccg ccg ctg ttc cag	789
Thr Val Val Ala Ala Arg Val Leu Arg Gln Thr Pro Pro Leu Phe Gln	
210 215 220	
gcg ggg cga tcc ggg gac cag ggg ctg acc tcc att cgt acc cca ctg	837
Ala Gly Arg Ser Gly Asp Gln Gly Leu Thr Ser Ile Arg Thr Pro Leu	
225 230 235 240	
cgc tgt ggc gtc cac ccg ggc cca ggc acc ttc ctc ttc atg ggc tgg	885
Arg Cys Gly Val His Pro Gly Pro Gly Thr Phe Leu Phe Met Gly Trp	
245 250 255	
agc cgc ttt ggg gag gcc cgg ctg ggc tgt gcc cca cga ttc cag gag	933
Ser Arg Phe Gly Glu Ala Arg Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu	
260 265 270	
ttc cgc cgt gcc tac gag gct gcc cgt gct gcc cac ctc cac ccc tgc	981
Phe Arg Arg Ala Tyr Glu Ala Ala Arg Ala Ala His Leu His Pro Cys	
275 280 285	
gag gtg gcg ctg cac tga ggggctgggt gctggggagg ggctggtagg	1029
Glu Val Ala Leu His	
290	
agggagggtg ggccaactgc tttggagggtg atgggactat caataagaac tctgttcacg	1089
caaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1109

<210> 2

<211> 293

5 <212> PRT

ES 2 584 068 T3

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Phe Pro Ala Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu  
1 5 10 15

5 Leu Ala Pro Ala Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Arg Cys Ser Trp

ES 2 584 068 T3

			20					25					30				
Arg	Gly	Ser	Gly	Leu	Thr	Gln	Glu	Pro	Gly	Ser	Val	Gly	Gln	Leu	Ala		
		35					40					45					
Leu	Ala	Cys	Ala	Glu	Gly	Ala	Val	Glu	Trp	Leu	Tyr	Pro	Ala	Gly	Ala		
	50					55					60						
Leu	Arg	Leu	Thr	Leu	Gly	Gly	Pro	Asp	Pro	Arg	Ala	Arg	Pro	Gly	Ile		
65					70					75					80		
Ala	Cys	Leu	Arg	Pro	Val	Arg	Pro	Phe	Ala	Gly	Ala	Gln	Val	Phe	Ala		
				85					90					95			
Glu	Arg	Ala	Gly	Gly	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Ala	Glu	Gly	Pro	Gly		
			100					105					110				
Pro	Ala	Gly	Gly	Arg	Cys	Val	Arg	Trp	Gly	Pro	Arg	Glu	Arg	Arg	Ala		
		115						120					125				
Leu	Phe	Leu	Gln	Ala	Thr	Pro	His	Gln	Asp	Ile	Ser	Arg	Arg	Val	Ala		
	130						135					140					
Ala	Phe	Arg	Phe	Glu	Leu	Arg	Glu	Asp	Gly	Arg	Pro	Glu	Leu	Pro	Pro		
145					150					155					160		
Gln	Ala	His	Gly	Leu	Gly	Val	Asp	Gly	Ala	Cys	Arg	Pro	Cys	Ser	Asp		
				165					170					175			
Ala	Glu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Cys	Thr	Ser	Asp	Phe	Val	Ile	His	Gly		
			180					185					190				
Ile	Ile	His	Gly	Val	Thr	His	Asp	Val	Glu	Leu	Gln	Glu	Ser	Val	Ile		
		195					200					205					
Thr	Val	Val	Ala	Ala	Arg	Val	Leu	Arg	Gln	Thr	Pro	Pro	Leu	Phe	Gln		
	210					215						220					
Ala	Gly	Arg	Ser	Gly	Asp	Gln	Gly	Leu	Thr	Ser	Ile	Arg	Thr	Pro	Leu		
225					230						235				240		
Arg	Cys	Gly	Val	His	Pro	Gly	Pro	Gly	Thr	Phe	Leu	Phe	Met	Gly	Trp		
				245					250					255			
Ser	Arg	Phe	Gly	Glu	Ala	Arg	Leu	Gly	Cys	Ala	Pro	Arg	Phe	Gln	Glu		
			260					265					270				
Phe	Arg	Arg	Ala	Tyr	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala	Ala	His	Leu	His	Pro	Cys		
		275					280					285					

Glu Val Ala Leu His  
290

<210> 3  
<211> 270  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 3

Gly Tyr Ser Glu Glu Arg Cys Ser Trp Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln  
1 5 10 15

Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Ala Leu Ala Cys Ala Glu Gly Ala  
20 25 30

Val Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly  
35 40 45

Pro Asp Pro Arg Ala Arg Pro Gly Ile Ala Cys Leu Arg Pro Val Arg  
50 55 60

Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg Ala Gly Gly Ala Leu  
65 70 75 80

Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Pro Gly Pro Ala Gly Gly Arg Cys Val  
85 90 95

Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro  
100 105 110

His Gln Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe Arg Phe Glu Leu Arg  
115 120 125

Glu Asp Gly Arg Pro Glu Leu Pro Pro Gln Ala His Gly Leu Gly Val  
130 135 140

Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala  
145 150 155 160

Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Ile Ile His Gly Val Thr His  
165 170 175

Asp Val Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val Val Ala Ala Arg Val  
180 185 190

Leu Arg Gln Thr Pro Pro Leu Phe Gln Ala Gly Arg Ser Gly Asp Gln  
195 200 205



ES 2 584 068 T3

Gly Leu Thr Ser Ile Arg Thr Pro Leu Arg Cys Gly Val His Pro Gly  
210 215 220

Pro Gly Thr Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg Phe Gly Glu Ala Arg  
225 230 235 240

Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Arg Arg Ala Tyr Glu Ala  
245 250 255

Ala Arg Ala Ala His Leu His Pro Cys Glu Val Ala Leu His  
260 265 270

<210> 4

<211> 1363

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

10 <222> (89)..(959)

<400> 4

gggcagccgc gccgcgggct gctcgcgctg cggccccgac cctcccgggg cagcagtcg	60
aggccccggc gcgtccccta acc atg ctg gta gcc acg ctt ctt tgc gcg ctc	113
Met Leu Val Ala Thr Leu Leu Cys Ala Leu	
1 5 10	
tgt tgc ggc ctc ctg gcc gcg tcc gct cac gct ggc tac tcg gaa gac	161
Cys Cys Gly Leu Leu Ala Ala Ser Ala His Ala Gly Tyr Ser Glu Asp	
15 20 25	
cgc tgc agc tgg agg ggc agc ggt ttg acc cag gag cct ggc agc gtg	209
Arg Cys Ser Trp Arg Gly Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val	
30 35 40	
ggg cag ctg acc ctg gac tgt act gag ggc gct atc gag tgg ctg tac	257
Gly Gln Leu Thr Leu Asp Cys Thr Glu Gly Ala Ile Glu Trp Leu Tyr	
45 50 55	
cca gct ggg gcg ctg cgc ctg acc ctg ggc ggc ccc gat ccg ggc aca	305
Pro Ala Gly Ala Leu Arg Leu Thr Leu Gly Gly Pro Asp Pro Gly Thr	
60 65 70	
cgg ccc agc atc gtc tgt ctg cgc cca gag cgg ccc ttc gct ggt gcc	353
Arg Pro Ser Ile Val Cys Leu Arg Pro Glu Arg Pro Phe Ala Gly Ala	
75 80 85 90	
cag gtc ttc gct gaa cgt atg acc ggc aat cta gag ttg cta ctg gcc	401
Gln Val Phe Ala Glu Arg Met Thr Gly Asn Leu Glu Leu Leu Leu Ala	
95 100 105	
gag ggc ccg gac ctg gct ggg ggc cgc tgc atg cgc tgg ggt ccc cgc	449
Glu Gly Pro Asp Leu Ala Gly Gly Arg Cys Met Arg Trp Gly Pro Arg	
110 115 120	
gag cgc cga gcc ctt ttc ctg cag gcc aca cca cac cgc gac atc agc	497
Glu Arg Arg Ala Leu Phe Leu Gln Ala Thr Pro His Arg Asp Ile Ser	
125 130 135	

cgc aga gtt gct gcc ttc cgt ttt gaa ctg cac gag gac caa cgt gca Arg Arg Val Ala Ala Phe Arg Phe Glu Leu His Glu Asp Gln Arg Ala 140 145 150	545
gaa atg tct ccc cag gct caa ggt ctt ggt gtg gat ggt gcc tgc agg Glu Met Ser Pro Gln Ala Gln Gly Leu Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg 155 160 165 170	593
ccc tgc agt gat gcc gag ctc ctc ctg gct gca tgc acc agt gat ttt Pro Cys Ser Asp Ala Glu Leu Leu Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asp Phe 175 180 185	641
gtg atc cac ggg acc atc cat ggg gtc gcc cat gac aca gag ctg caa Val Ile His Gly Thr Ile His Gly Val Ala His Asp Thr Glu Leu Gln 190 195 200	689
gaa tca gtc atc act gtg gtg gtt gct cgt gtc atc cgc cag aca ctg Glu Ser Val Ile Thr Val Val Val Ala Arg Val Ile Arg Gln Thr Leu 205 210 215	737
cca ctg ttc aag gaa ggg agc tcg gag ggc caa ggc cgg gcc tcc att Pro Leu Phe Lys Glu Gly Ser Ser Glu Gly Gln Gly Arg Ala Ser Ile 220 225 230	785
cgt acc ttg ctg cgc tgt ggt gtg cgt cct ggc cca ggc tcc ttc ctc Arg Thr Leu Leu Arg Cys Gly Val Arg Pro Gly Pro Gly Ser Phe Leu 235 240 245 250	833
ttc atg ggc tgg agc cga ttt ggc gaa gct tgg ctg ggc tgt gct ccc Phe Met Gly Trp Ser Arg Phe Gly Glu Ala Trp Leu Gly Cys Ala Pro 255 260 265	881
cgc ttc caa gag ttc agc cgt gtc tat tca gct gct ctc acg acc cat Arg Phe Gln Glu Phe Ser Arg Val Tyr Ser Ala Ala Leu Thr Thr His 270 275 280	929
ctc aac cca tgt gag atg gca ctg gac tga gagacctggg agcaagcct Leu Asn Pro Cys Glu Met Ala Leu Asp 285 290	979
ggatggacct tcttctggag atggggtggt ggggaggggtg atgggaggggt gggtgagaag	1039
gggtgtggctc ggatggcacc ctggtacca cagtgagctg gtagaatact aagtaactctg	1099
gaccatacca gccactgtag tcatggtctt ctgtggcagg cagcatacc agctctgtgc	1159
ctgcctcact ttgtctactc tccagtctgc tgcccttcta acccttctta gctgctgac	1219
cagtgagctc atgttttctc cgaattccag ggtgctgctg gggttcagag caaccgtgcc	1279
gtagtttga agactgagc taattgtttt tttttgttt gttttttgt ttgtttaaag	1339
gtggcctggg gggggcggca aaca	1363

<210> 5

<211> 291  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

5 <400> 5

Met Leu Val Ala Thr Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Ser Ala His Ala Gly Tyr Ser Glu Asp Arg Cys Ser Trp Arg Gly  
 20 25 30

Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Thr Leu Asp  
 35 40 45

Cys Thr Glu Gly Ala Ile Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg  
 50 55 60

Leu Thr Leu Gly Gly Pro Asp Pro Gly Thr Arg Pro Ser Ile Val Cys  
 65 70 75 80

Leu Arg Pro Glu Arg Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg  
 85 90 95

Met Thr Gly Asn Leu Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Pro Asp Leu Ala  
 100 105 110

Gly Gly Arg Cys Met Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe  
 115 120 125

Leu Gln Ala Thr Pro His Arg Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe  
 130 135 140

Arg Phe Glu Leu His Glu Asp Gln Arg Ala Glu Met Ser Pro Gln Ala  
 145 150 155 160

Gln Gly Leu Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu  
 165 170 175

Leu Leu Leu Ala Ala Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Thr Ile  
 180 185 190

His Gly Val Ala His Asp Thr Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val  
 195 200 205

Val Val Ala Arg Val Ile Arg Gln Thr Leu Pro Leu Phe Lys Glu Gly  
 210 215 220

Ser Ser Glu Gly Gln Gly Arg Ala Ser Ile Arg Thr Leu Leu Arg Cys  
 225 230 235 240

Gly Val Arg Pro Gly Pro Gly Ser Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg  
 245 250 255

Phe Gly Glu Ala Trp Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Ser  
 260 265 270

ES 2 584 068 T3

**Arg Val Tyr Ser Ala Ala Leu Thr Thr His Leu Asn Pro Cys Glu Met**  
275 280 285

**Ala Leu Asp**  
290

<210> 6  
<211> 270  
5 <212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 6

ES 2 584 068 T3

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

Gly Arg Ala Ser Ile Arg Thr Leu Leu Arg Cys Gly Val Arg Pro Gly  
210 215 220

Pro Gly Ser Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg Phe Gly Glu Ala Trp  
225 230 235 240

Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Ser Arg Val Tyr Ser Ala  
245 250 255

Ala Leu Thr Thr His Leu Asn Pro Cys Glu Met Ala Leu Asp  
260 265 270

<210> 7

<211> 1026

5 <212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(876)

<400> 7



atg ctg gta gcg gcg ctt ctc tgc gcg ctg tgc tgc ggc ctc ttg gct	48
Met Leu Val Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu Leu Ala	
1 5 10 15	
gcg tcc gct cga gct ggc tac tcc gag gac cgc tgc agc tgg agg ggc	96
Ala Ser Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Asp Arg Cys Ser Trp Arg Gly	
20 25 30	
agc ggt ttg acc cag gaa cct ggc agc gtg ggg cag ctg acc ctg gat	144
Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Thr Leu Asp	
35 40 45	
tgt act gag ggt gct atc gag tgg ctg tat cca gct ggg gcg ctg cgc	192
Cys Thr Glu Gly Ala Ile Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg	
50 55 60	
ctg act cta ggc ggc tct gat ccg ggc acg cgg ccc agc atc gtc tgt	240
Leu Thr Leu Gly Gly Ser Asp Pro Gly Thr Arg Pro Ser Ile Val Cys	
65 70 75 80	
ctg cgc cca aca cgg ccc ttc gct ggt gcc cag gtc ttc gct gaa cgg	288
Leu Arg Pro Thr Arg Pro Phe Ala Gly Ala Gln Val Phe Ala Glu Arg	
85 90 95	
atg gcc ggc aac cta gag ttg cta ctg gcc gag ggc caa ggc ctg gct	336
Met Ala Gly Asn Leu Glu Leu Leu Leu Ala Glu Gly Gln Gly Leu Ala	
100 105 110	
ggg ggc cgc tgc atg cgc tgg ggt cct cgc gag cgc cga gcc ctt ttc	384
Gly Gly Arg Cys Met Arg Trp Gly Pro Arg Glu Arg Arg Ala Leu Phe	
115 120 125	
ctg cag gcc acg cca cac cgg gac atc agc cgc aga gtt gct gcc ttc	432
Leu Gln Ala Thr Pro His Arg Asp Ile Ser Arg Arg Val Ala Ala Phe	
130 135 140	

ES 2 584 068 T3

caa ttt gaa ctg cac gag gac caa cgt gca gaa atg tct ccc cag gcc Gln Phe Glu Leu His Glu Asp Gln Arg Ala Glu Met Ser Pro Gln Ala 145 150 155 160	480
caa ggt ttt ggt gtg gat ggt gcc tgc agg ccc tgc agt gat gcc gag Gln Gly Phe Gly Val Asp Gly Ala Cys Arg Pro Cys Ser Asp Ala Glu 165 170 175	528
ctc ctt ctg act gca tgc acc agt gac ttt gtg atc cat ggg acc atc Leu Leu Leu Thr Ala Cys Thr Ser Asp Phe Val Ile His Gly Thr Ile 180 185 190	576
cat ggg gtc gtc cat gac atg gag ctg caa gaa tca gtc atc act gtg His Gly Val Val His Asp Met Glu Leu Gln Glu Ser Val Ile Thr Val 195 200 205	624
gtg gcc act cgt gtc atc cgc cag aca ctg cca ctg ttc cag gaa ggg Val Ala Thr Arg Val Ile Arg Gln Thr Leu Pro Leu Phe Gln Glu Gly 210 215 220	672
agc tcg gag ggc cgg ggc cag gcc tcc gtt cgt acc ttg ttg cgc tgt Ser Ser Glu Gly Arg Gly Gln Ala Ser Val Arg Thr Leu Leu Arg Cys 225 230 235 240	720
ggt gtg cgt cct ggc cca ggc tcc ttc ctc ttc atg ggc tgg agc cga Gly Val Arg Pro Gly Pro Gly Ser Phe Leu Phe Met Gly Trp Ser Arg 245 250 255	768
ttt ggc gaa gct tgg ctg ggc tgc gct ccc cgc ttc caa gag ttc agc Phe Gly Glu Ala Trp Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Ser 260 265 270	816
cgt gtc tat tca gct gct ctc gcg gcc cac ctc aac cca tgt gag gtg Arg Val Tyr Ser Ala Ala Leu Ala Ala His Leu Asn Pro Cys Glu Val 275 280 285	864
gca ctg gac tga gagacctggg agcaagccct ggatggatct tcctctgggg Ala Leu Asp 290	916
atggggtggt ggggaggggt gataggaggg tgggtgggaa ggggtgggct cagatggcat	976
cctggtaccc acagtgaggt ggtagaatac taaataacct ggatcacacc	1026

<210> 8

<211> 291

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

ES 2 584 068 T3

Met Leu Val Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Cys Cys Gly Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Ser Ala Arg Ala Gly Tyr Ser Glu Asp Arg Cys Ser Trp Arg Gly  
20 25 30

Ser Gly Leu Thr Gln Glu Pro Gly Ser Val Gly Gln Leu Thr Leu Asp  
35 40 45

Cys Thr Glu Gly Ala Ile Glu Trp Leu Tyr Pro Ala Gly Ala Leu Arg

	50					55								60		
Leu	Thr	Leu	Gly	Gly	Ser	Asp	Pro	Gly	Thr	Arg	Pro	Ser	Ile	Val	Cys	
65					70					75					80	
Leu	Arg	Pro	Thr	Arg	Pro	Phe	Ala	Gly	Ala	Gln	Val	Phe	Ala	Glu	Arg	
				85					90					95		
Met	Ala	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Leu	Leu	Ala	Glu	Gly	Gln	Gly	Leu	Ala	
			100					105					110			
Gly	Gly	Arg	Cys	Met	Arg	Trp	Gly	Pro	Arg	Glu	Arg	Arg	Ala	Leu	Phe	
		115					120					125				
Leu	Gln	Ala	Thr	Pro	His	Arg	Asp	Ile	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Ala	Phe	
	130					135					140					
Gln	Phe	Glu	Leu	His	Glu	Asp	Gln	Arg	Ala	Glu	Met	Ser	Pro	Gln	Ala	
145					150					155					160	
Gln	Gly	Phe	Gly	Val	Asp	Gly	Ala	Cys	Arg	Pro	Cys	Ser	Asp	Ala	Glu	
				165					170					175		
Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Cys	Thr	Ser	Asp	Phe	Val	Ile	His	Gly	Thr	Ile	
			180					185					190			
His	Gly	Val	Val	His	Asp	Met	Glu	Leu	Gln	Glu	Ser	Val	Ile	Thr	Val	
		195				200						205				
Val	Ala	Thr	Arg	Val	Ile	Arg	Gln	Thr	Leu	Pro	Leu	Phe	Gln	Glu	Gly	
	210					215					220					
Ser	Ser	Glu	Gly	Arg	Gly	Gln	Ala	Ser	Val	Arg	Thr	Leu	Leu	Arg	Cys	
225					230					235					240	
Gly	Val	Arg	Pro	Gly	Pro	Gly	Ser	Phe	Leu	Phe	Met	Gly	Trp	Ser	Arg	
				245					250					255		
Phe	Gly	Glu	Ala	Trp	Leu	Gly	Cys	Ala	Pro	Arg	Phe	Gln	Glu	Phe	Ser	
			260					265					270			
Arg	Val	Tyr	Ser	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	His	Leu	Asn	Pro	Cys	Glu	Val	
		275					280					285				
Ala	Leu	Asp														
		290														

<211> 270  
<212> PRT  
<213> Rattus norvegicus

5 <400> 9

ES 2 584 068 T3

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

ES 2 584 068 T3

Leu Gly Cys Ala Pro Arg Phe Gln Glu Phe Ser Arg Val Tyr Ser Ala  
 245 250 255

Ala Leu Ala Ala His Leu Asn Pro Cys Glu Val Ala Leu Asp  
 260 265 270

- <210> 10
- <211> 882
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> con optimización de codones
- 10 <400> 10

```

atgggctttc ccgctgccgc cctgctgtgc gctctgtgct gcggactgct ggctcctgca      60
gccagagccg gctacagcga ggaacgggtgc agctggcggg gcagcggcct gaccaggaa      120
cctggcagcg tcggccagct cgcaactggcc tgtgcagaag gcgccgtgga gtggctgtac      180
cccgcaggcg ccctgagact gaccctgggc ggacccgacc ccagagccag acccggcatt      240
gcctgtctga ggcccgtgcg gcctttcgct ggcgcccagg tgttcgccga gagagccggc      300
ggagccctgg aactcctgct cgccgaaggc cctggtccag ccggcggaag atgctgaga      360
tggggcccaa gagagcggag agccctgttc ctgcaagcca cccccacca ggacatcagc      420
agacgggtgg ccgccttcag attcgagctg cgggaggacg gtagaccga gctgccacct      480
caggcccacg gactgggagt ggacggcgcc tgcagaccct gtagcgacgc cgagctgctg      540
ctcgcgcct gcaccagcga cttegtgatc cacggcatca tccacggcgt gaccacgac      600
gtggagctgc aggaaagcgt catcacctgc gtcgccgcca gagtgtgag acagaccccc      660
cctctgttcc aggccggcag aagcggcgac cagggcctga ccagcatccg gacccccctg      720
agatgcggcg tgcattcccgg acccggcacc ttctgttca tgggctggtc cagattcggc      780
gaggcccggc tgggctgcgc tccccggttc caggaattca gacgggccta cgaggccgcc      840
agggccgctc atctgcaccc ctgcgaggtg gccctgcatt ga      882
    
```

- 15 <210> 11
- <211> 270
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 20 <220>
- <223> Secuencia consenso
  
- <220>
- <221> misc\_feature

<222> (5)..(5)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

5 <221> misc\_feature  
 <222> (25)..(25)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

10 <221> misc\_feature  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

15 <221> misc\_feature  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

20 <221> misc\_feature  
 <222> (33)..(33)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

25 <221> misc\_feature  
 <222> (49)..(49)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

30 <221> misc\_feature  
 <222> (52)..(53)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

35 <221> misc\_feature  
 <222> (56)..(56)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

40 <221> misc\_feature  
 <222> (58)..(58)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

45 <221> misc\_feature  
 <222> (63).. (63)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

50 <221> misc\_feature  
 <222> (76)..(77)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

55 <221> misc\_feature  
 <222> (79)..(79)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>



- <221> misc\_feature
- <222> (88)..(90)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 5 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (96)..(96)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 10 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (114)..(114)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 15 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (124)..(124)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 20 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (128)..(128)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 25 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (131)..(131)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 30 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (133)..(133)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 35 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (135)..(136)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 40 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (140)..(140)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 45 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (142)..(142)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 50 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (159)..(159)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- 55 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (170)..(170)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (175)..(175)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (178)..(178)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 10  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (189)..(190)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 15  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (193)..(193)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (197)..(197)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (201)..(202)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (204)..(204)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 35  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (206)..(208)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (210)..(211)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (213)..(213)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 50  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (216)..(216)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 55  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (222)..(222)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (227)..(227)  
5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (240)..(240)  
10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (251)..(251)  
15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (253)..(253)  
20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (255)..(255)  
25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (258)..(260)  
30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (263)..(263)  
35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (267)..(267)  
40 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (270)..(270)  
45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <400> 11

ES 2 584 068 T3

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



## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma, comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos seleccionada de  
5 entre el grupo que consiste en:
- i. La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
  - ii. Una variante de secuencia biológicamente activa de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, donde la variante tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3; y
  - 10 iii. Un fragmento biológicamente activo de al menos 50 aminoácidos contiguos de a) o b) donde el fragmento es al menos el 70% idéntico a la SEQ ID NO: 3.
2. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho polipéptido tiene al menos el  
15 70% de identidad de secuencia con una proteína que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 3, más preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 85%, más preferentemente el 90%, más preferentemente el 95%, más preferentemente el 98%.
3. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el  
20 polipéptido neurotrófico comprende la secuencia consenso de la SEQ ID NO: 11.
4. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el  
polipéptido neurotrófico tiene residuos de cisteína en posiciones 7, 28, 59, 95, 148, 151, 161, 219, 243 y 265 con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.
- 25 5. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho tratamiento da como resultado sustancialmente inversión completa de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo o dolor fantasma en al menos un subconjunto de los sujetos tratados.
6. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho  
30 polipéptido es para uso en un método de tratamiento de alodinia y/o hiperalgesia.
7. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha alodinia es alodinia térmica, tal como alodinia por frío o por calor, o alodinia mecánica.
- 35 8. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho tratamiento es para dolor espontáneo.
9. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha hiperalgesia es hiperalgesia térmica, tal como hiperalgesia por frío o por calor, o hiperalgesia mecánica.  
40
10. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sujeto a tratar no experimenta pérdida de peso.
11. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el sujeto a  
45 tratar es un mamífero, preferentemente un primate, más preferentemente un ser humano.
12. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polipéptido se administra mediante administración sistémica, tal como mediante inyección parenteral, preferentemente inyección subcutánea o inyección intratecal.  
50
13. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tratamiento se administra en dosis de 1 µg/kg - 10.000 µg/kg, tal como 1 µg/kg - 7.500 µg/kg, tal como 1 µg/kg - 5.000 µg/kg, tal como 1 µg/kg - 2.000 µg/kg, tal como 1 µg/kg - 1.000 µg/kg, tal como 1 µg/kg - 700 µg/kg, tal como 5  
55 µg/kg-500 µg/kg, tal como de 10 µg/kg a 100 µg/kg de peso corporal.
14. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha administración se repite diariamente.
15. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha

administración se repite al menos 1-3 veces por semana, tal como 2-5 veces por semana, tal como 3-6 veces por semana.

16. Una molécula de ácido nucleico aislada para uso en un método de tratamiento de alodinia, 5 hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido, tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
17. Un vector para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma, comprendiendo dicho vector un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de 10 las reivindicaciones 1 a 15.
18. Una línea celular aislada para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia y/o dolor espontáneo, transformada o transducida con el vector de la reivindicación 17.
- 15 19. Una cápsula biocompatible implantable para uso en un método de tratamiento de alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo y/o dolor fantasma mediante administración de meteorina biológicamente activa secretada a un sujeto, comprendiendo dicha cápsula:
- i. Una membrana externa biocompatible y un núcleo interno,
  - 20 ii. comprendiendo dicho núcleo interno células de acuerdo con la reivindicación 18.
20. Un polipéptido de meteorina neurotrófico para uso en un método de tratamiento dolor neuropático en un sujeto humano que lo necesita, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido neurotrófico que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de 25 identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, donde dicha administración es tres veces por semana o de forma más infrecuente.
21. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 20, donde dicha administración es administración semanal o más infrecuente.
- 30 22. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 20, donde dicha administración es administración quincenal o más infrecuente.
23. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 20, donde el efecto terapéutico de dicho 35 tratamiento mejora al menos un síntoma de dolor neuropático durante todo el periodo entre administraciones del polipéptido.
24. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 23, donde dicho síntoma se selecciona de entre el grupo que consiste en alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo, dolor fantasma, sensaciones de escozor, 40 hormigueo, electricidad, sensación parestésica, parestesia, disestesia, rigidez, entumecimiento en las extremidades, sensaciones de distorsión corporal, e hiperpatía.
25. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 20, donde dicho tratamiento no mantiene niveles medibles de dicho polipéptido en el suero de dicho sujeto durante todo el periodo entre administraciones del 45 polipéptido.
26. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 25, donde los niveles de dicho polipéptido en el suero de dicho sujeto caen por debajo de 10 ng/ml entre administraciones del polipéptido.
- 50 27. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 26, donde dicho polipéptido tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con una proteína que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 3, más preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 85%, más preferentemente el 90%, más preferentemente el 95%, más preferentemente el 98%.
- 55 28. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 20 a 27, donde el polipéptido neurotrófico comprende la secuencia consenso de la SEQ ID NO: 11.
29. El polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 20 a 28, donde el polipéptido neurotrófico tiene residuos de cisteína en posiciones 7, 28, 59, 95, 148, 151, 161, 219, 243 y 265 con

respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.



Figura 1

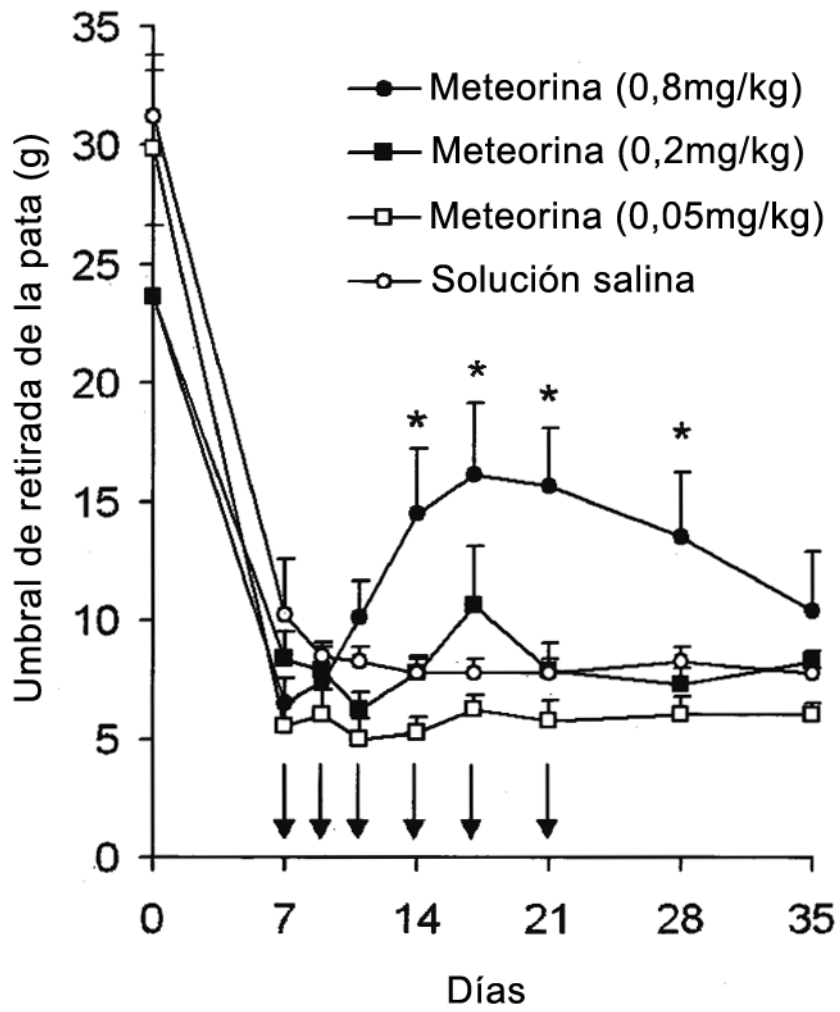


Figura 2

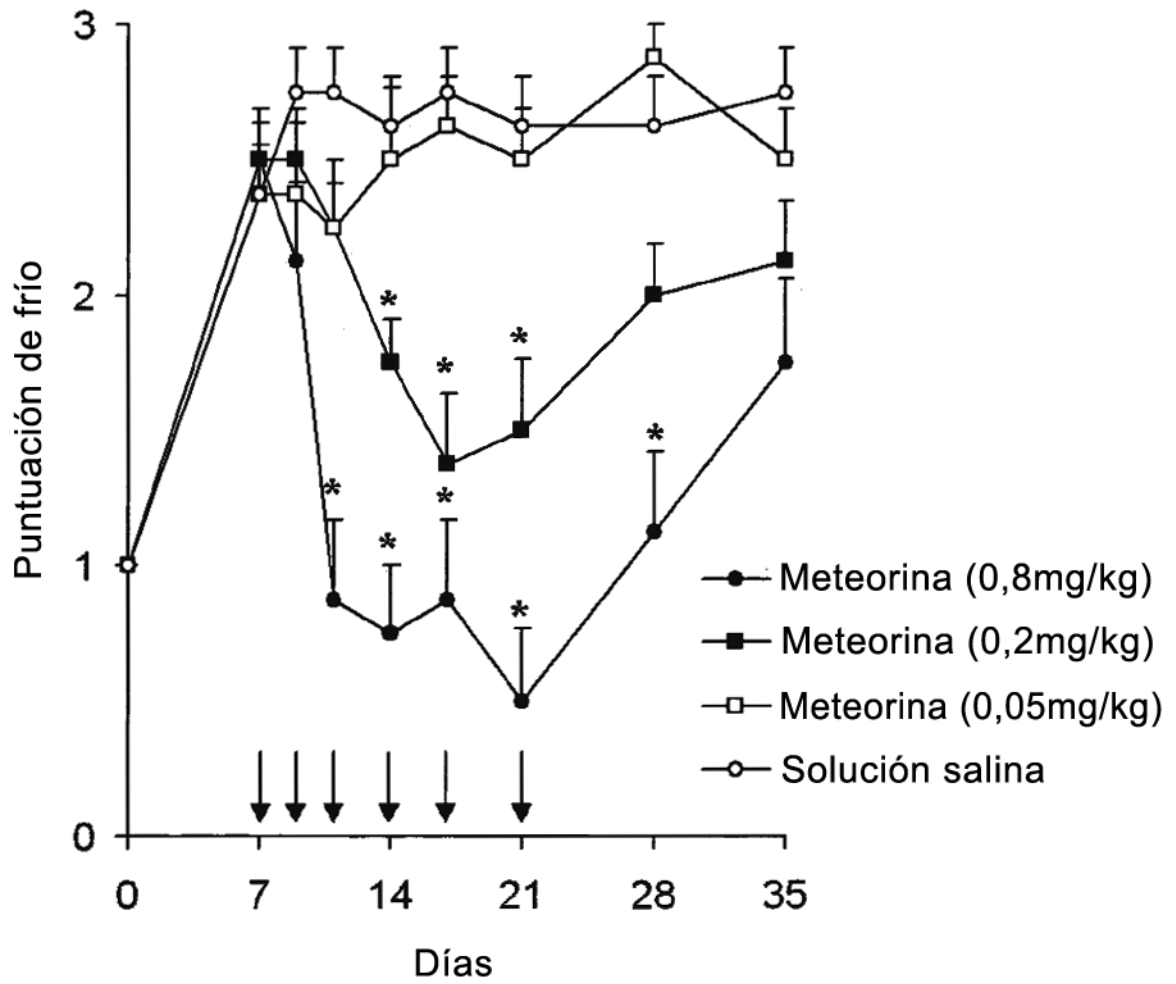


Figura 3

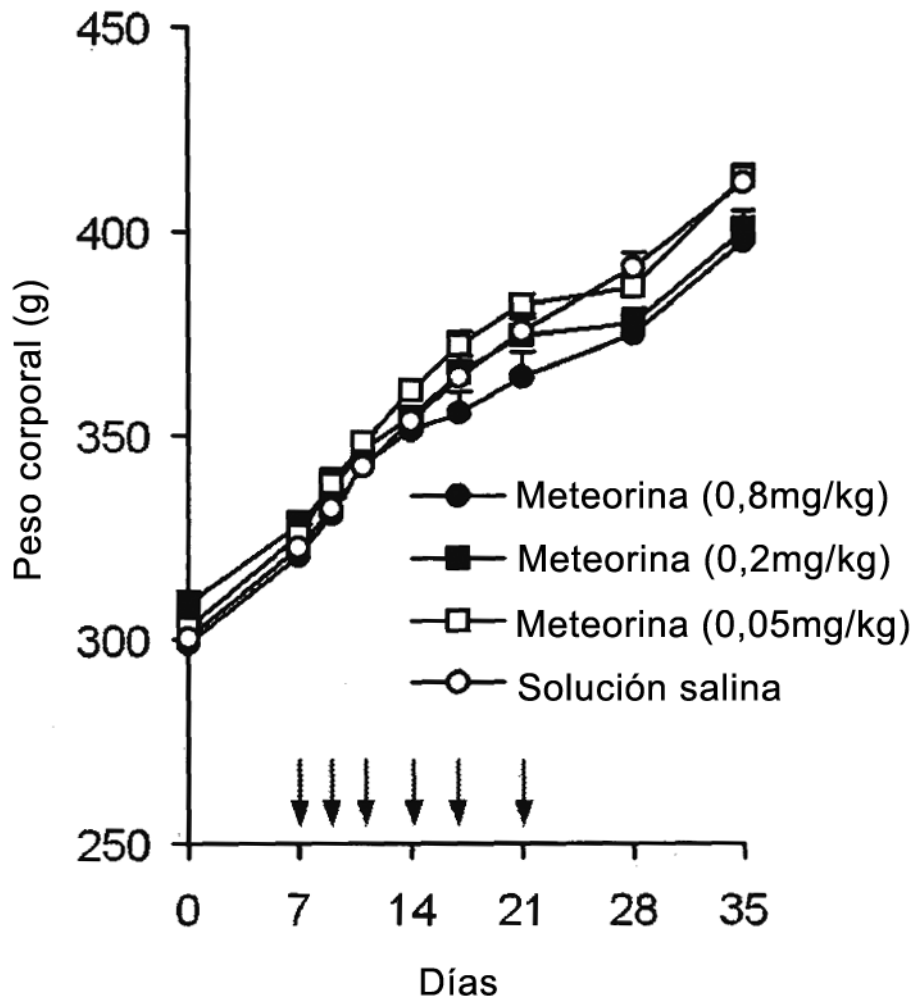


Figura 4

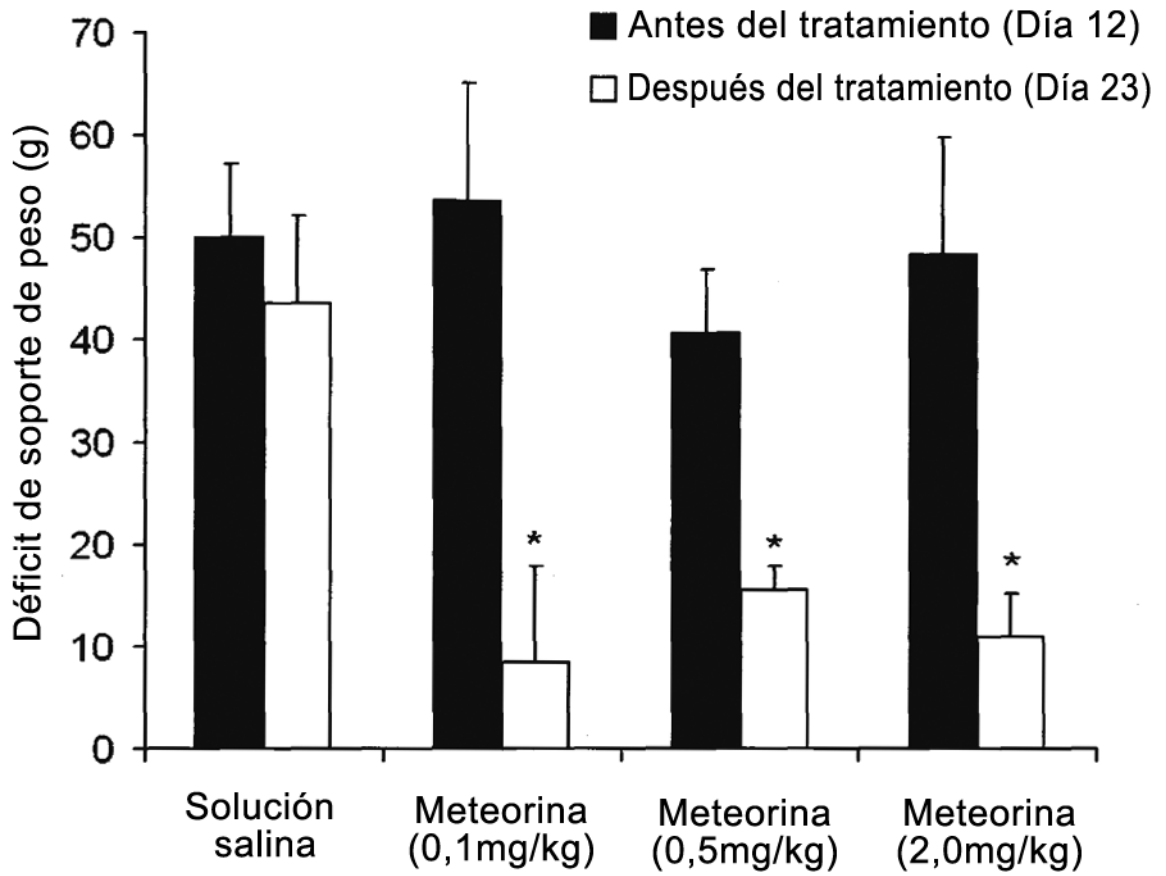
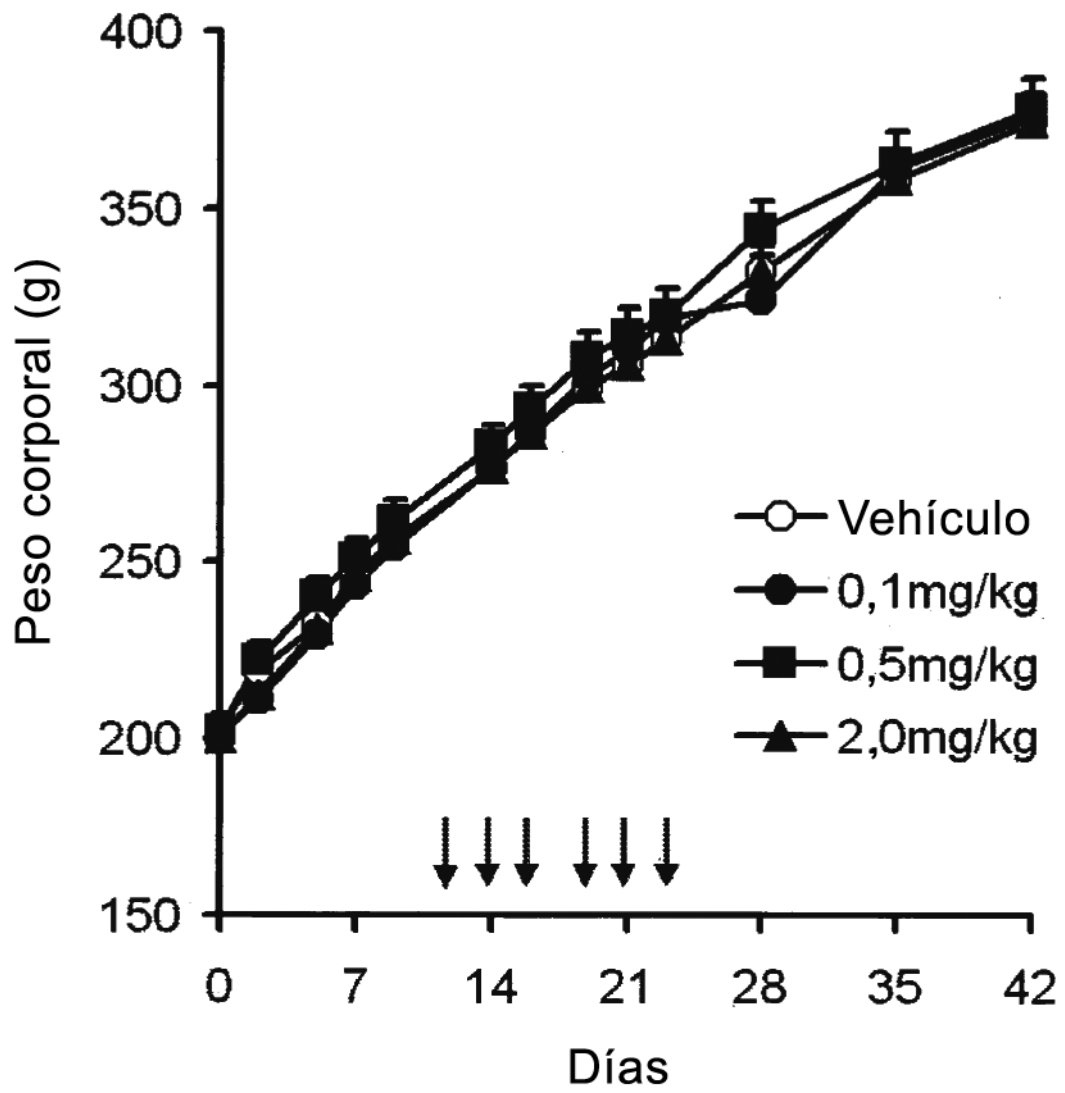


Figura 5



**Figura 6a**

```

Ratón      --MLVATLLCALCCGLLAASAHAGYSEDRCSWRGSGLTQEPGSGVQLTLDCTEGAIEWLY 58
Rata       --MLVAALLCALCCGLLAASARAGYSEDRCSWRGSGLTQEPGSGVQLTLDCTEGAIEWLY 58
Ser humano MGFPAALLCALCCGLLAPAARAGYSEERCSSWRGSGLTQEPGSGVQLALACAEGAVEWLY 60
           : .*:*****. :*:*****:*****:*****: * *:***:***

Ratón      PAGALRLTLGGSDPGTRPSIVCLRPERPFAGAQVFAERMTGNLELLLAEGPDLAGGRMR 118
Rata       PAGALRLTLGGSDPGTRPSIVCLRPERPFAGAQVFAERMAGNLELLLAEGQGLAGGRMR 118
Ser humano PAGALRLTLGGPDRARPGIACLRPVRPFAGAQVFAERAGGALELLLAEGPGPAGGRMR 120
           *****.* * :*. * .***** ***** * ***** . *****:*

Ratón      WGPRERRALFLQATPHRDISRRVAAFRFELHEDQRAEMSPQAQGLGVDGACRPCSDAELL 178
Rata       WGPRERRALFLQATPHRDISRRVAAFQFELHEDQRAEMSPQAQGFVDGACRPCSDAELL 178
Ser humano WGPRERRALFLQATPHQDISRRVAAFRFELREDGRPELPPQAHGLGVDGACRPCSDAELL 180
           *****:*****:***:* * .*: .***:*:*****:*****

Ratón      LAACTSDFVIHGTHGVHDVDELQESVITVVVARVIRQTLPLFKESGSEGGQGRASIRTL 238
Rata       LTACTSDFVIHGTHGVHDVDELQESVITVVATRVIQTLPLFKESGSEGRGQASVRTLL 238
Ser humano LAACTSDFVIHGTHGVHDVDELQESVITVVAARVLRQTPPLFQAGRSGDQGLTSIRTP 240
           *:***** * * . * *****. :*:*** * * : * * .: * :*: * *

Ratón      RCGVHPGPGTFLFMGWSRFGEAWLGCAPRFQEF SRVSAALTHLNPCEMALD 291
Rata       RCGVHPGPGTFLFMGWSRFGEAWLGCAPRFQEF SRVSAALAAHLNPCEMALD 291
Ser humano RCGVHPGPGTFLFMGWSRFGEARLGCAPRFQEFRRAYEAARAHLHPCEVALH 293
           *****:*****:***** ***** * . * * .: * :*: * * .
    
```

**Figura 6b**

```

Ratón      GYSEDRCSWRGSGLTQEPGSGVQLTLDCTEGAIEWLYPAGALRLTLGGSDPGTRPSIVCL 60
Rata       GYSEDRCSWRGSGLTQEPGSGVQLTLDCTEGAIEWLYPAGALRLTLGGSDPGTRPSIVCL 60
Ser humano GYSEERCSSWRGSGLTQEPGSGVQLALACAEGAVEWLYPAGALRLTLGGPDRARPGIAC 60
           ****:*****:*****: * *:***:*****:*****.* * :*. * .**

Ratón      RPERPFAGAQVFAERMTGNLELLLAEGPDLAGGRMRWGPRERRALFLQATPHRDISRRV 120
Rata       RPTRPFAGAQVFAERMAGNLELLLAEGQGLAGGRMRWGPRERRALFLQATPHRDISRRV 120
Ser humano RPVRPFAGAQVFAERAGGALELLLAEGPGPAGGRMRWGPRERRALFLQATPHQDISRRV 120
           ** ***** * ***** . *****:*****:*****:*****

Ratón      AAFRFELHEDQRAEMSPQAQGLGVDGACRPCSDAELLLAACTSDFVIHGTHGVHDVDEL 180
Rata       AAFQFELHEDQRAEMSPQAQGFVDGACRPCSDAELLTACTSDFVIHGTHGVHDVDEL 180
Ser humano AAFRFELREDGRPELPPQAHGLGVDGACRPCSDAELLLAACTSDFVIHGTHGVHDVDEL 180
           ***:***.* * .: .***:*:*****:*****:***** ***** * * **

Ratón      QESVITVVVARVIRQTLPLFKESGSEGGQGRASIRTLRRCGVHPGPGSFLFMGWSRFGEAW 240
Rata       QESVITVVATRVIQTLPLFKESGSEGRGQASVRTLLRRCGVHPGPGSFLFMGWSRFGEAW 240
Ser humano QESVITVVAARVLRQTPPLFQAGRSGDQGLTSIRTPRRCGVHPGPGTFLFMGWSRFGEAW 240
           *****.:***:*** * * : * * .: * :*: * * *****:*****:*****

Ratón      LGCAPRFQEF SRVSAALTHLNPCEMALD 270
Rata       LGCAPRFQEF SRVSAALAAHLNPCEMALD 270
Ser humano LGCAPRFQEFRRAYEAARAHLHPCEVALH 270
           ***** * . * * .: * :*: * * .
    
```

**Figura 6c**

Consenso GYSEXRCSWRGSGLTQEPGSVGQLXLXCXEGAXEWLYPAGALRLTLGGXDPXXRPXIXCL 60  
Consenso RPXRPFAGAQVFAERXXGXLELLLAEGXXXAGGRCXRWGPRERRALFLQATPHXDISRRV 120  
Consenso AAFXFELXEDXRREXXPQAXGXGVDGACRPCSDAELLXACTSDFVIHGXIHGVMXDXEL 180  
Consenso QESVITVVXXRVXRQTXPLFXXGXSGXXGXSRXRTLRCGVXPGPGXFLFMGWSRFGAX 240  
Consenso LGCAPRFQEFXXRYXAAXXXHLXPCEXALX 270

Figura 7

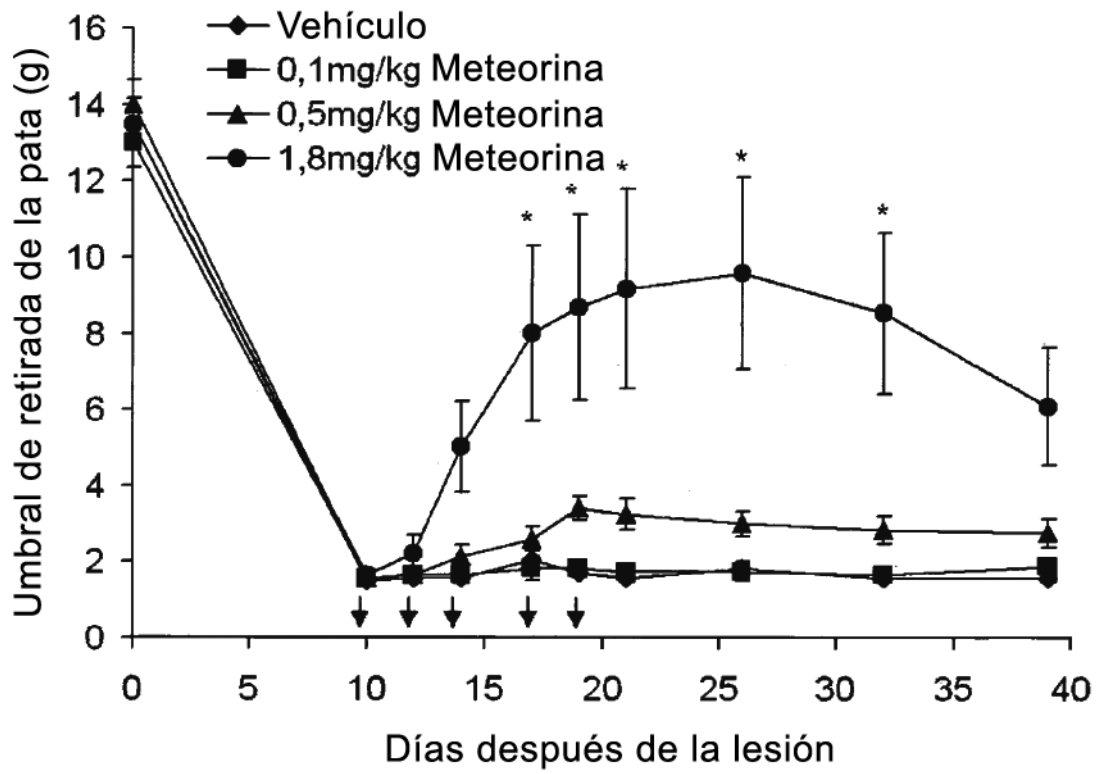




Figura 8

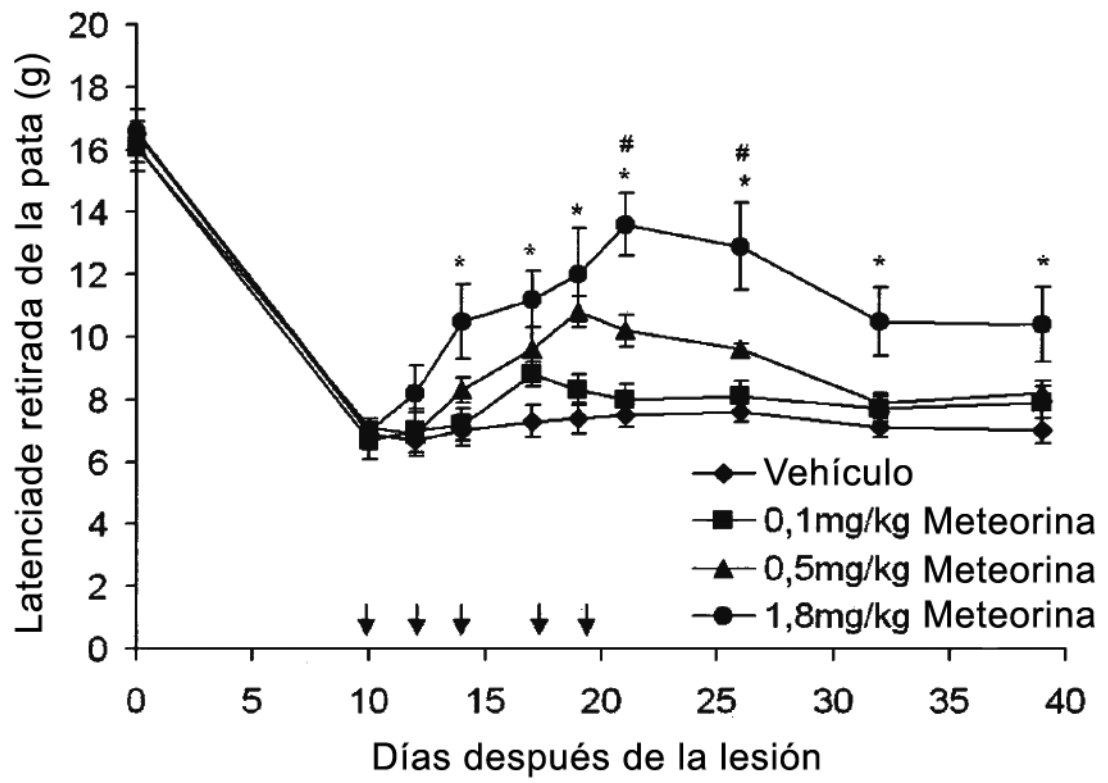


Figura 9

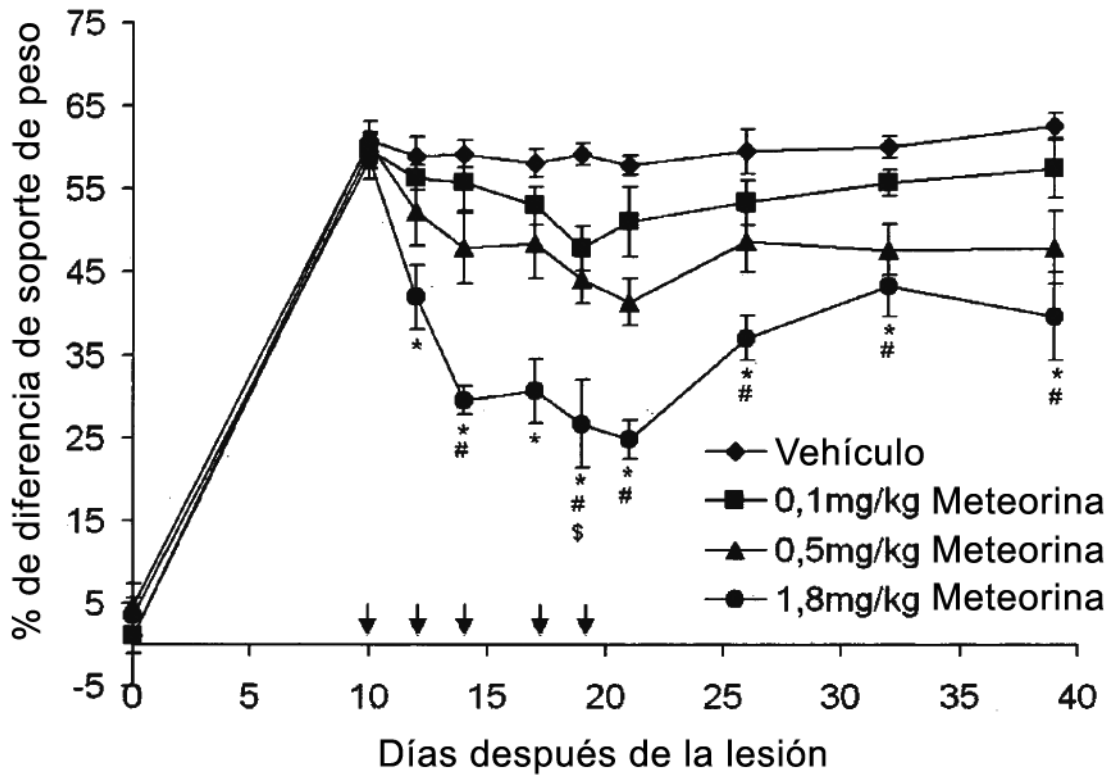


Figura 10

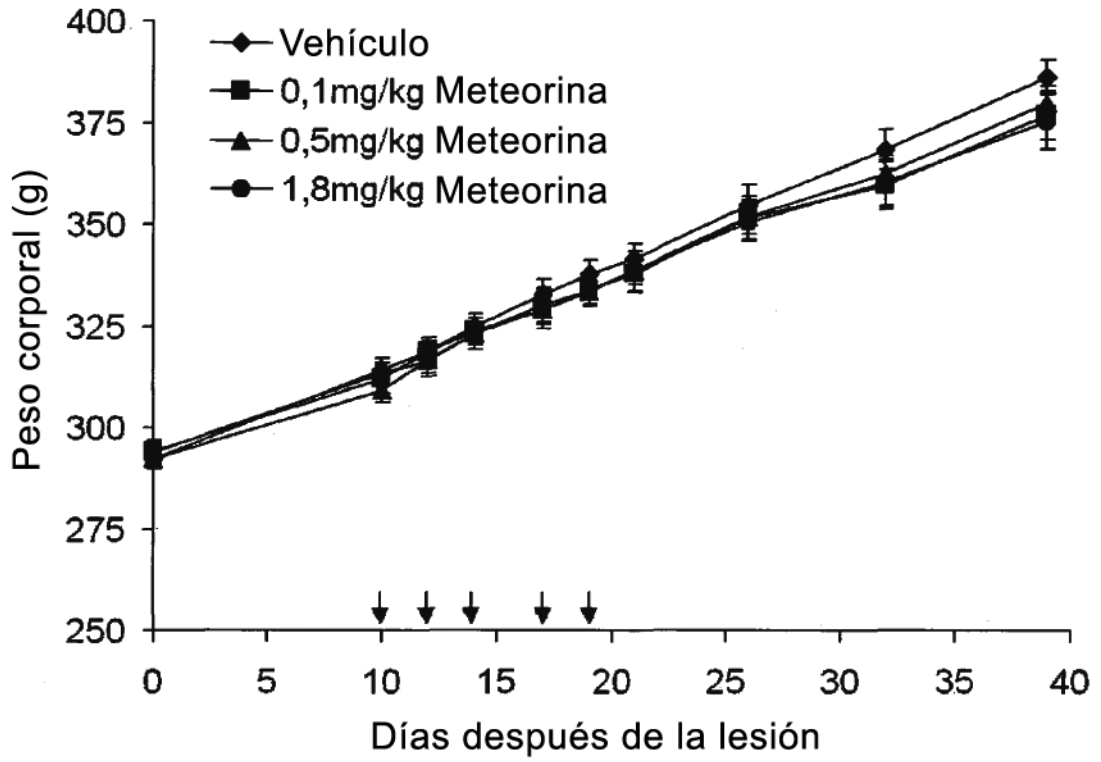


Figura 11

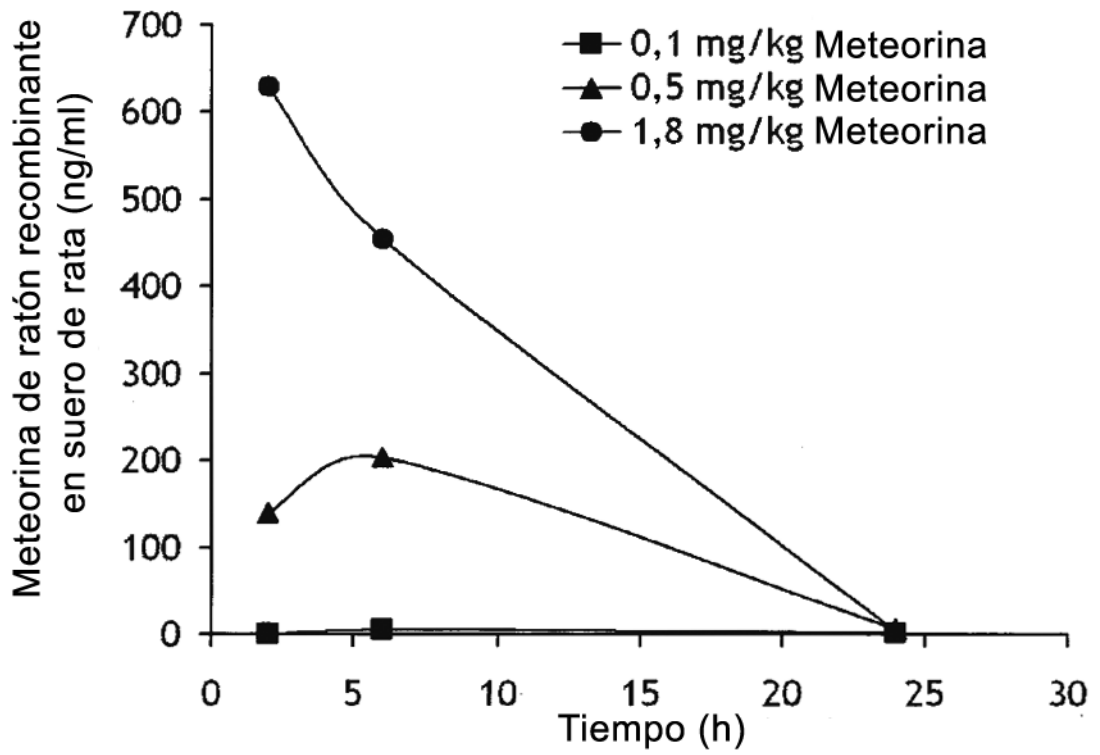


Figura 12

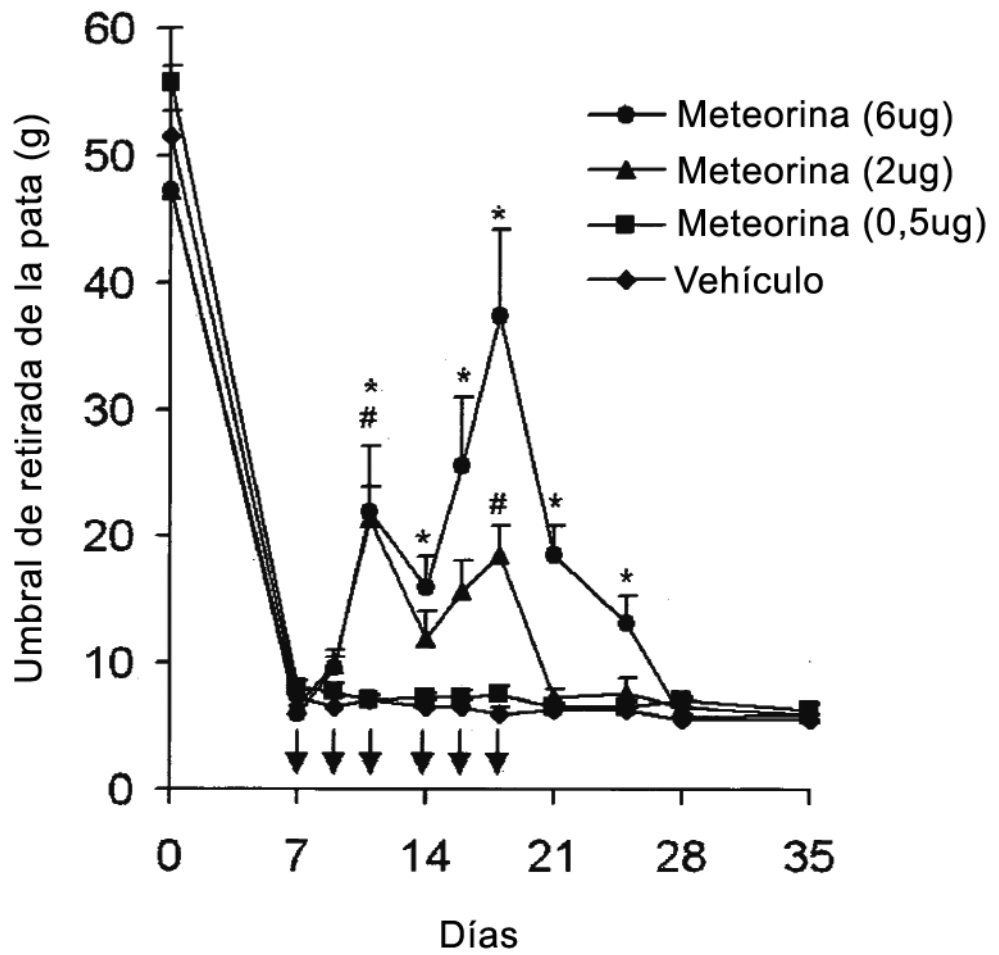


Figura 13

