

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 824**

51 Int. Cl.:

C12N 15/864 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2006** **E 14181383 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018** **EP 2816118**

54 Título: **Métodos para suministrar genes**

30 Prioridad:

31.05.2005 US 686324 P

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

18.01.2019

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
COLORADO, A BODY CORPORATE (100.0%)
1800 Grant Street, 8th Floor
Denver, CO 80203, US**

72 Inventor/es:

**WATKINS, LINDA MAY ROTHBLUM;
HUGHES, TRAVIS y
CHAVEZ, RAYMOND A.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones:

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

ES 2 696 824 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para suministrar genes

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere en general a métodos de suministro de genes. En particular, la presente invención se refiere a métodos de suministro de genes usando plásmidos que comprenden secuencias de repeticiones terminales invertidas de virus adenoasociado (VAA) para lograr la expresión sostenida del gen en una célula diana.

10

Antecedentes

La terapia génica usando células y virus modificados por ingeniería genética ha experimentado un desarrollo impresionante a lo largo de los últimos 40 años. Se han aplicado técnicas de terapia génica a diversos problemas médicos y se han usado en más de 350 ensayos clínicos (Wu *et al.*, *Met. Strat. Anesthes.* (2001) 94:1119-1132).

15

Se ha intentado la terapia génica usando diversas partículas de virus, incluyendo viriones de virus adenoasociado recombinante (VAAr) que codifican transgenes terapéuticos. Pueden construirse fácilmente vectores de VAA recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.173.414 y 5.139.941; las publicaciones internacionales n.ºs WO 92/01070 y WO 93/03769; Lebkowski *et al.*, *Molec. Cell. Biol.* (1988) 8:3988-3996; Vincent *et al.*, *Vaccines* 90 (1990) (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B.J. *Current Opinion in Biotechnology* (1992) 3:533-539; Muzyczka, N. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* (1992) 158:97-129; Kotin, R.M. *Human Gene Therapy* (1994) 5:793-801; Shelling y Smith, *Gene Therapy* (1994) 1:165-169; y Zhou *et al.*, *J. Exp. Med.* (1994) 179:1867-1875. Aunque se ha mostrado que tal suministro de genes mediado por viriones de VAA da lugar a expresión a largo plazo de transgenes en células diana, y beneficio terapéutico a largo plazo en modelos animales, las partículas de virus de VAAr pueden generar una respuesta inmunitaria adversa en sujetos humanos. Además, el límite de empaquetamiento para viriones de VAA es de aproximadamente 5000 bases, lo que limita el tamaño del constructo de transgén que puede suministrarse usando tales viriones.

20

25

30

Los vectores de terapia génica derivados de otros virus tienen desventajas también. Se han descrito varios sistemas de suministro de genes basados en retrovirus. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.219.740; Miller y Rosman, *BioTechniques* (1989) 7:980-990; Miller, A.D., *Human Gene Therapy* (1990) 1:5-14; Scarpa *et al.*, *Virology* (1991) 180:849-852; Burns *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90:8033-8037; y Boris-Lawrie y Temin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* (1993) 3:102-109. Sin embargo, la terapia génica mediada por viriones de retrovirus puede dar como resultado la integración del transgén en el cromosoma de la célula diana en una ubicación al azar, lo que podría crear una mutación indeseada.

35

40

También se han descrito varios vectores de adenovirus. A diferencia de los retrovirus que se integran en el genoma del huésped, los adenovirus persisten de manera extracromosómica minimizando por tanto los riesgos asociados con mutagénesis por inserción (Haj-Ahmad y Graham, *J. Virol.* (1986) 57:267-274; Bett *et al.*, *J. Virol.* (1993) 67:5911-5921; Mittereder *et al.*, *Human Gene Therapy* (1994) 5:717-729; Set *et al.*, *J. Virol.* (1994) 68:933-940; Barr *et al.*, *Gene Therapy* (1994) 1:51-58; Berkner, K.L. *BioTechniques* (1988) 6:616-629; y Rich *et al.*, *Human Gene Therapy* (1993) 4:461-476). Sin embargo, la terapia génica mediada por viriones de adenovirus está sujeta a una respuesta inmunitaria potencialmente grave en humanos.

45

Como alternativa a los vectores virales, también se ha usado ADN de plásmido (ADNp) como vector para suministro de genes, tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 6.413.942; 6.214.804; 5.580.859; 5.589.466; 5.763.270; y 5.693.622, cuyas divulgaciones se incorporan por el presente documento como referencia en su totalidad. Los plásmidos tienen una ventaja con respecto a los vectores virales porque la producción de cantidades suficientes de viriones a un título lo suficientemente alto es difícil y cara. Los plásmidos incluirán el gen de interés operativamente unido a elementos de control que dirigen la expresión del producto proteico *in vivo*. Tales elementos de control se conocen bien en la técnica. La expresión de transgenes depende de varias características del plásmido. La transcripción del transgén está controlada por las secuencias de potenciador/promotor, que actúan individualmente o en combinación, incorporadas en la secuencia del ADNp. La estabilidad del mensaje transcrito se potencia por la presencia de una señal de poliadenilación en el extremo 3' del transcrito, conocida como cola de poliA. Las secuencias de terminación de la transcripción también pueden ser de importancia, al igual que otros dominios reguladores, tales como sitios internos de entrada al ribosoma ("IRES"), y similares, que proporcionan conjuntamente la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No es necesario que todas estas secuencias de control estén siempre presentes con tal de que la secuencia codificante seleccionada sea capaz de replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped apropiada.

50

55

60

Sin embargo, la terapia génica mediada por plásmidos tiene normalmente solo una expresión de transgenes directa dirigida, en vez de sostenida, en células diana.

65

Existe la necesidad de métodos mejorados de terapia génica que sean capaces de dirigir la expresión de transgenes sostenida sin las consecuencias adversas y los gastos asociados con los métodos de terapia génica mediada por

viriones.

Sumario de la invención

5 La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que la expresión sostenida de un transgén puede lograrse mediante transfección de plásmidos usando un plásmido que codifica una o más secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de VAA. La ITR de VAA es igualmente eficaz si está ubicada en el sentido de 5' o en el sentido de 3' del transgén dentro de la secuencia de plásmido. La invención se define en las reivindicaciones.

10 En una realización el plásmido comprende exactamente dos secuencias de ITR de VAA. En otra realización el plásmido comprende una única secuencia de ITR de VAA.

15 El dolor puede tratarse satisfactoriamente en un modelo de dolor aceptable suministrando un gen que codifica la citocina antiinflamatoria IL-10 usando tales plásmidos. Tal tratamiento previene y revierte el dolor, tal como dolor neuropático, incluyendo alodinia mecánica, sin afectar a la receptividad del dolor basal a los estímulos mecánicos.

20 Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere al suministro de un transgén a una célula diana usando un plásmido que codifica uno o más ITR e IL-10, tal como se define adicionalmente en las reivindicaciones. En algunas realizaciones este suministro da como resultado la expresión sostenida del transgén en la célula diana. En algunas realizaciones el transgén es un transgén terapéutico. En realizaciones adicionales la expresión del transgén da como resultado una mejora en un estado patológico en un modelo de enfermedad. En realizaciones aún adicionales, la expresión del transgén da como resultado un efecto terapéutico.

25 En algunas realizaciones, la ITR se deriva de un virus seleccionado del grupo que consiste en un VAA, adenovirus, retrovirus y lentivirus. En una realización, la ITR es una ITR de VAA-2.

30 En otras realizaciones, la invención se refiere a un uso en un método de tratamiento de dolor neuropático, en un sujeto vertebrado que comprende administrar al sistema nervioso del sujeto un plásmido que codifica una o más ITR de VAA y que codifica interleucina-10 (IL-10), operativamente unida a elementos de control de la expresión, en condiciones que dan como resultado la expresión del agente *in vivo* para reducir el dolor. En una realización la una o más ITR son ITR de VAA.

En realizaciones aún adicionales, el sujeto vertebrado es un humano y la citocina antiinflamatoria es IL-10 humana.

35 La administración es mediante suministro intratecal.

40 En otra realización, el método comprende además administrar, a los cinco días o menos tras la primera dosis, tal como tres días o menos, una segunda dosis del plásmido que codifica una o más ITR y que codifica IL-10 operativamente unida a elementos de control de la expresión, en condiciones que dan como resultado la expresión del agente *in vivo* para mantener el dolor reducido. En una realización la una o más ITR son ITR de VAA.

En determinadas realizaciones, el sujeto vertebrado es un humano y la IL-10 es IL-10 humana.

45 En determinadas realizaciones de la invención, el gen de IL-10 se fusiona con una secuencia que codifica la porción de Fc de una IgG.

50 En otras realizaciones, la invención se refiere a una composición que comprende un plásmido que codifica una única ITR y que codifica además IL-10 operativamente unidas a elementos de control de la expresión, en condiciones que dan como resultado la expresión del agente terapéutico *in vivo* para reducir el dolor. En algunas realizaciones la ITR es una ITR de VAA.

55 En aún otras realizaciones, la invención se refiere a un uso en métodos de tratamiento de dolor neuropático usando una composición que comprende un plásmido que codifica una única ITR y que codifica además IL-10 operativamente unidas a elementos de control de la expresión, en condiciones que dan como resultado la expresión del agente terapéutico *in vivo* para reducir el dolor. En algunas realizaciones la única ITR es una ITR de VAA.

Estas y otras realizaciones de la invención sujeto se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la técnica en vista de la divulgación en el presente documento.

60 Breve descripción de las figuras

65 La figura 1 muestra que la IL-10 dirigida por ADN de plásmido de vector no viral (VNV) revierte completamente la alodinia mecánica inducida por CCI y que la administración intratecal repetida de IL-10 de plásmido induce efectos de alivio del dolor progresivamente más prolongados. Tras el nivel inicial (BL), se indujo CCI y se les administraron a las ratas inyecciones intratecales de o bien IL-10 de plásmido o bien GFP de plásmido como control a los puntos de tiempo indicados en la figura mediante flechas. Los cuadrados negros indican ratas con CCI a las que se les

administró IL-10 de plásmido; los cuadrados blancos indican ratas con CCI a las que se les administró el plásmido de control de GFP; los círculos negros indican ratas operadas de manera simulada a las que se les administró IL-10 de plásmido; los círculos blancos indican ratas operadas de manera simulada a las que se les administró plásmido de control de GFP.

La figura 2 muestra que dos dosis de IL-10 dirigida por ADN de plásmido suministradas con una separación de tres días inducen una atenuación prolongada de la alodinia mecánica inducida por CCI. Se inyectó IL-10 de plásmido por vía intratecal el día 10 tras CCI y tres días después. Los cuadrados negros indican los resultados usando IL-10 de plásmido mientras que los cuadrados blancos muestran los resultados de plásmido de control.

La figura 3 muestra que, cuando el plásmido de IL-10 del experimento descrito en la figura 2 se linealiza, ya no es eficaz en la atenuación de la alodinia mecánica inducida por CCI.

La figura 4 muestra que FcIL-10 es eficaz en la potenciación de la reversión de la alodinia mecánica cuando se administra conjuntamente con un vector de terapia génica, mostrado en el presente documento con un plásmido que codifica IL-10. Tras las pruebas de nivel inicial (BL), las ratas recibieron cirugía de CCI. Volvieron a someterse a prueba 3 y 10 días después para verificar que la CCI indujo dolor neuropático profundo en ambas medidas. Tras la prueba del día 10, se les inyectó a las ratas por vía i.t. un plásmido de control que no codificaba IL-10; más bien, codificaba una proteína intracelular inerte (GFP). La presencia de ADN de plásmido inerte no afectó a los comportamientos sometidos a prueba los días posteriores. Tras la prueba del día 13, se les inyectó a las ratas o bien: (a) solo plásmido que codifica IL-10 o bien (b) una cantidad igual de plásmido que codifica IL-10 más una variante estabilizada de IL-10 (FcIL-10) para someter a prueba si la presencia de FcIL-10 potenciaría la eficacia del vector. De hecho lo hace. Se revirtió la alodinia mecánica mediante IL-10 de plásmido solo durante aproximadamente 4 días. En cambio, el tratamiento conjunto con FcIL-10 potenció notablemente tanto el comienzo como la duración de la eficacia de IL-10 de plásmido sobre la alodinia mecánica.

Las figuras 5A, 5B y 5C muestran que dosis y combinaciones de dosis inferiores de terapia génica con IL-10 de plásmido revierten eficazmente la alodinia mecánica inducida por CCI. Tras las pruebas de nivel inicial (BL), las ratas recibieron cirugía de CCI. Volvieron a someterse a prueba 3 y 10 días después para verificar que la CCI indujo dolor neuropático profundo. Entonces se les inyectó a las ratas o bien: (a) 100 µg de plásmido que codifica IL-10 (día 10) seguido por 50 µg de plásmido que codifica IL-10 (día 13) (figura 5A); (b) 100 µg de plásmido que codifica IL-10 (día 10) seguido por 25 µg de plásmido que codifica IL-10 (día 13) (figura 5B); o (c) 50 µg de plásmido que codifica IL-10 (día 10) seguido por 50 µg de plásmido que codifica IL-10 (día 13) (figura 5C). Cada una condujo a la reversión de la alodinia mecánica a lo largo del tiempo.

La figura 6 muestra la respuesta al dolor para ratas con CCI y simulación en función del tratamiento con pIL-10, tal como se describe adicionalmente en el ejemplo 4.

La figura 7 muestra la expresión de IL-10 *in vitro* para células transformadas sin plásmido, un plásmido que codifica un gen indicador distinto de IL-10 y plásmidos que codifican IL-10 con 0, 1 o 2 ITR de VAA, tal como se describe adicionalmente en el ejemplo 4.

La figura 8 muestra la respuesta al dolor para ratas con CCI en función del tratamiento con pIL-10 o pIL-10 con ambas ITR delecionadas, tal como se describe adicionalmente en el ejemplo 4.

La figura 9 muestra la respuesta al dolor para ratas con CCI en función del tratamiento con pIL-10; pIL-10 con ambas ITR delecionadas; pIL-10 con la ITR en 3'; y pIL-10 con la ITR en 5' delecionada, tal como se describe adicionalmente en el ejemplo 4.

La figura 10 muestra una comparación de las secuencias de aminoácidos de formas secretadas maduras de IL-10 humana (hIL-10) (SEQ ID NO: 1), IL-10 de ratón (mIL-10) (SEQ ID NO: 2) y una forma viral de IL-10 (vIL-10) (SEQ ID NO: 3). Los residuos de aminoácido que se diferencian de la secuencia humana están en un recuadro.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de ADN de plásmido (ADNp) que contienen repeticiones terminales invertidas (ITR) como medio excepcionalmente eficaz mediante el cual pueden revertirse estados de dolor neuropático condiciones en ratas. Los ADNp que contienen dos regiones de ITR son los más eficaces, pero ADNp que contienen ITR individuales son también eficaces, con duraciones del efecto que duran más de 1 mes y a menudo tanto como 2 o más meses. Véase la figura 9. La eliminación de ambas ITR del ADNp hace que el ADNp sea ineficaz en el tratamiento del dolor. Véanse las figuras 8, 9. Esta prolongación de la eficacia terapéutica de los plásmidos debe ser beneficiosa en una variedad de estados a largo plazo o progresivamente degenerativos, ya se originen dentro del sistema nervioso central o de origen sistémico.

En los experimentos notificados en el presente documento, se usa una ITR de VAA, pero las ITR son una característica común de los genomas virales a través de múltiples linajes virales. Estas secuencias contienen

5 algunas actividades promotoras. Sus funciones primarias parecen ser el control de tanto la replicación como el empaquetamiento eficaces del genoma viral y la integración del genoma viral en el genoma de la célula huésped. El sorprendente resultado presentado en el presente documento es que una o más ITR de VAA son también necesarias y suficientes para la expresión génica sostenida a partir de vectores de terapia génica de plásmido *in vivo*.

10 Los ejemplos ilustrativos presentados en el presente documento se refieren al tratamiento de dolor neuropático, pero la invención puede aplicarse generalmente al tratamiento de cualquier trastorno en el que la expresión de transgenes sostenida pueda ser beneficiosa. Aunque los experimentos a modo de ejemplo divulgados en el presente documento implican el suministro intratecal de un transgén que codifica IL-10 al SNC, pueden usarse otros modos de suministro a los tejidos diana. En el documento WO 05/000215 se describe en mayor detalle un resumen del enfoque terapéutico general de la administración de IL-10 para el tratamiento de dolor neuropático.

15 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, métodos convencionales de química, bioquímica, técnicas de ADN recombinante e inmunología, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explicarán completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, *Fundamental Virology*, 2.^a edición, volumen. I y II (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds.); *Handbook of Experimental Immunology*, volúmenes I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2.^a edición, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

1. DEFINICIONES

25 En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan tal como se indica a continuación.

30 Debe indicarse que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una citocina antiinflamatoria” incluye una mezcla de dos o más de tales citocinas, y similares.

35 Por “dolor patológico” quiere decirse cualquier dolor que resulte de una patología, tal como alteraciones funcionales y/o cambios patológicos, heridas, lesiones, quemaduras y similares. Una forma de dolor patológico es “dolor neuropático”. El término “dolor neuropático” tal como se usa en el presente documento se refiere a dolor provocado por, pero sin limitarse a, una neuropatía, una encefalopatía y/o una mielopatía (es decir, alteraciones funcionales o estados patológicos del sistema nervioso periférico, el cerebro y la médula espinal, respectivamente). El dolor neuropático puede estar provocado por daños en los nervios, lesión tal como lesión de la médula espinal, neuritis, inflamación, heridas no inflamatorias, lesiones eléctricas, cefaleas, y similares. El dolor neuropático puede estar también provocado por complicaciones de diversas enfermedades, incluyendo sin limitación, enfermedades desmielinizantes, diabetes, enfermedades amiloideas, enfermedades porfíricas, enfermedad de Lyme, lepra, acromegalia, artritis reumatoide, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades metabólicas, cáncer e infección viral. Tal dolor puede estar provocado también por estados tóxicos, tales como pero sin limitarse a, estados tóxicos provocados por arsénico, isoniazida, plomo y nitrofurantoína. Los ejemplos de dolor neuropático incluyen, pero no se limitan a, hiperalgesia térmica o mecánica, alodinia térmica o mecánica, dolor diabético, dolor que surge de intestino irritable u otros trastornos de los órganos internos, dolor por endometriosis, dolor de extremidad fantasma, síndromes de dolor regional complejo, fibromialgia, dolor lumbar, dolor por cáncer, dolor que surge de infección, inflamación o traumatismo en los nervios periféricos o el sistema nervioso central, dolor por esclerosis múltiple, dolor por atrapamiento, dolor por infección por VIH, infección por virus del herpes, y similares.

50 “Hiperalgesia” significa una sensación de dolor anómalamente aumentada, tal como dolor que resulta de una susceptibilidad o sensibilidad excesiva.

55 “Hipalgesia” (o “hipoalgesia”) significa la disminución de la sensación de dolor.

“Alodinia” significa dolor que resulta de un estímulo no nocivo en la piel. Los ejemplos de alodinia incluyen, pero no se limitan a, alodinia por frío, alodinia táctil, y similares.

60 “Nocicepción” se define en el presente documento como sensación de dolor. “Nociceptor” en el presente documento se refiere a una estructura que media en la nocicepción. La nocicepción puede ser el resultado de un estímulo físico, tal como, un estímulo mecánico, eléctrico, térmico o químico. Los nociceptores están presentes en prácticamente todos los tejidos del cuerpo.

65 “Analgesia” se define en el presente documento como el alivio del dolor sin la pérdida de la consciencia. Un “analgésico” es un agente o fármaco útil para aliviar el dolor, de nuevo, sin la pérdida de la consciencia.

El término "sistema nervioso" incluye tanto el sistema nervioso central como el sistema nervioso periférico". El término "sistema nervioso central" o "SNC" incluye todas las células y tejidos del cerebro y la médula espinal de un vertebrado. El término "sistema nervioso periférico" se refiere a todas las células y tejidos de la porción del sistema nervioso fuera del cerebro y la médula espinal. Por tanto, el término "sistema nervioso" incluye, pero no se limita a, células neuronales, células gliales, astrocitos, células en el líquido cefalorraquídeo (LCR), células en los espacios intersticiales, células en las cubiertas protectoras de la médula espinal, células epidurales (es decir, células fuera de la duramadre), células en tejidos no neurales adyacentes a o en contacto con o inervadas por tejido neural, células en el epineurio, perineurio, endoneurio, funículos, fascículos, y similares.

El término "citocina antiinflamatoria" tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína que disminuye la acción o producción de una o más citocinas proinflamatorias o proteínas producidas por nervios, neuronas, células gliales, células endoteliales, fibroblastos, músculo, células inmunitarias u otros tipos de células. Tales citocinas y proteínas inflamatorias incluyen, sin limitación, interleucina-1 beta (IL-1 β), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y similares. Los ejemplos no limitativos de citocinas antiinflamatorias incluyen interleucina-10 (IL-10) incluyendo IL-10 viral, interleucina-4 (IL-4), interleucina-13 (IL-13), alfa-MSH, factor de crecimiento transformante-beta 1 (TGF- β 1), y similares. Está prevista IL-10 para su uso con la presente invención.

Por tanto, las proteínas de longitud completa y los fragmentos de las mismas, así como proteínas con modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (de naturaleza o bien conservativa o no conservativa), con respecto a la secuencia nativa, están previstas para su uso en el presente documento, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a amplificación por PCR. Por consiguiente, proteínas activas sustancialmente homólogas a la secuencia original, por ejemplo, proteínas con el 70...80...85...90...95...98...99 % etc. de identidad que conservan la capacidad de reducir el dolor, se contemplan para su uso en el presente documento.

Por "antagonista de citocina proinflamatoria" quiere decirse cualquier molécula que bloquee o antagonice la acción biológica de una citocina proinflamatoria, tal como uniéndose o interactuando con un receptor de citocina proinflamatoria reduciendo o inhibiendo de ese modo la producción de la citocina proinflamatoria. Los términos "antagonista", "inhibidor" y "bloqueante" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Los ejemplos no limitativos de tales antagonistas incluyen antagonista de receptor de interleucina-1 (IL-1ra); KINERET (IL-1ra recombinante, Amgen); receptor soluble de factor de necrosis tumoral (TNFsr); receptor de TNF soluble de tipo I (Amgen); receptor de TNF soluble pegilado de tipo I (TNF-R1 con PEG) (Amgen); receptores señuelo de TNF; ETANERCEPT (ENBREL, Amgen); INFlixIMAB (REMICADE, Johnson & Johnson); D2E7, un anticuerpo monoclonal anti-TNF humano (Knoll Pharmaceuticals, Abbott Laboratories); CDP 571 (un anticuerpo de IgG4 anti-TNF humanizado); CDP 870 (un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado anti-TNF alfa), ambos de Celltech; ONERCEPT, una proteína de unión a TNF recombinante (r-TBP-1) (Serono); receptor de IL1 de tipo 2 (Amgen), AMG719 (Amgen) y IL-1 TRAP (Regeneron).

Por tanto, las moléculas de longitud completa y los fragmentos de las mismas, así como proteínas con modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (de naturaleza o bien conservativa o bien no conservativa), con respecto a la secuencia nativa, están previstas para su uso en el presente documento, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a amplificación por PCR. Por consiguiente, proteínas activas sustancialmente homólogas a la secuencia original, por ejemplo, proteínas con el 70...80...85...90...95...98...99 % etc. de identidad que conservan la capacidad de reducir el dolor, se contemplan para su uso en el presente documento.

Por "un agente que actúa reduciendo las acciones de citocinas inflamatorias" quiere decirse un agente que induce la producción de citocinas antiinflamatorias. Tales agentes incluyen, sin limitación, IL-9, Hsp27 (véase la publicación de patente estadounidense n.º 2001/0049357).

El término "agente terapéutico" tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína que tiene la capacidad de disminuir el dolor tal como se mide en cualquiera de los modelos de dolor conocidos incluyendo los descritos adicionalmente en el presente documento, independientemente de si tal agente tiene o no algún efecto terapéutico en cualquier sujeto vertebrado particular.

Todos estos agentes, así como fragmentos activos, y análogos activos de los mismos, que conservan la capacidad de disminuir el dolor tal como se mide en cualquiera de los modelos de dolor conocidos incluyendo los descritos adicionalmente en el presente documento, están previstos para su uso con la presente invención.

Por tanto, las moléculas de longitud completa y los fragmentos de las mismas, así como proteínas con modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (de naturaleza o bien conservativa o bien no

conservativa), con respecto a la secuencia nativa, están previstas para su uso en el presente documento, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a amplificación por PCR. Por consiguiente, proteínas activas sustancialmente homólogas a la secuencia original, por ejemplo, proteínas con el 70...80...85...90...95...98...99 % etc. de identidad que conservan la capacidad de reducir el dolor, se contemplan para su uso en el presente documento.

El término “análogo” se refiere a derivados biológicamente activos de la molécula de referencia, o fragmentos de tales derivados, que conservan la capacidad de reducir el dolor. En general, el término “análogo” se refiere a compuestos que tienen una secuencia nativa de polipéptido y una estructura con una o más adiciones, sustituciones y/o deleciones de aminoácidos, en relación con la molécula nativa. Los análogos particularmente preferidos incluyen sustituciones que son de naturaleza conservativa, es decir, las sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Específicamente, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos -- aspartato y glutamato; (2) básicos -- lisina, arginina, histidina; (3) apolares -- alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados -- glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Fenilalanina, triptófano y tirosina se clasifican algunas veces como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, puede predecirse de manera razonable que un reemplazo aislado de leucina con isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o un reemplazo conservativo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Por ejemplo, el polipéptido de interés puede incluir hasta aproximadamente 5-10 sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, o incluso hasta aproximadamente 15-25 o 50 sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, o cualquier número entre 5-50, siempre que la función detectada de la molécula permanezca intacta.

“Homología” se refiere al porcentaje de identidad entre dos restos de polinucleótido o dos de polipéptido. Dos ADN, o dos secuencias de polipéptido son “sustancialmente homólogas” entre sí cuando las secuencias presentan al menos aproximadamente el 50 %, preferiblemente al menos aproximadamente el 75 %, más preferiblemente al menos aproximadamente el 80 %-85 %, preferiblemente al menos aproximadamente el 90 % y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 95 %-98 % de identidad de secuencia a lo largo de una longitud definida de las moléculas. Tal como se usa en el presente documento, sustancialmente homólogas también se refiere a secuencias que muestran identidad completa con la secuencia de ADN o polipéptido especificada.

En general, “identidad” se refiere a una correspondencia de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido exacta de dos secuencias de polinucleótidos o de polipéptido, respectivamente. El porcentaje de identidad puede determinarse mediante comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo entre la longitud de la secuencia más corta y multiplicando el resultado por 100. Pueden usarse programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en *Atlas of Protein Sequence and Structure* M.O. Dayhoff ed., 5 supl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Advances in Appl. Math.* 2:482-489, 1981 para el análisis de péptidos. Están disponibles programas para determinar la identidad de secuencias de nucleótidos en el Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se utilizan fácilmente con los parámetros por defecto recomendados por el fabricante y descritos en el Wisconsin Sequence Analysis Package al que se hizo referencia anteriormente. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos particular con respecto a una secuencia de referencia puede determinarse usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótido.

Otro método de establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es usar el paquete de programas MPSRCH registrado por la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir de este juego de paquetes, puede emplearse el algoritmo de Smith-Waterman en donde se usan parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por hueco abierto de 12, penalización por extensión de hueco de uno y un hueco de seis). A partir de los datos generados el valor de “coincidencia” refleja la “identidad de secuencia”. Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias se conocen generalmente en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineación es BLAST, usado con parámetros por defecto. Por ejemplo, pueden usarse BLASTN y BLASTP usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = convencional; filtro = ninguno; hebra = ambas; corte = 60; expectativa = 10; matriz = BLOSUM62; descripciones = 50 secuencias; clasificación mediante = HIGH SCORE; bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas se conocen bien en la técnica.

Alternativamente, la homología puede determinarse mediante hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido por digestión con nucleasa(s) específica(s)

monocatenaria(s), y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Pueden identificarse secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas en un experimento de hibridación de tipo Southern en, por ejemplo, condiciones rigurosas, tal como se define para ese sistema particular. La definición de condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la experiencia de la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente; ADN Cloning, citado anteriormente; *Nucleic Acid Hybridization*, citado anteriormente.

Por el término “variante degenerada” se pretende un polinucleótido que contiene cambios en la secuencia de ácido nucleico del mismo, que codifica un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido codificado por el polinucleótido del que se deriva la variante degenerada.

Una “secuencia codificante” o una secuencia que “codifica” un polipéptido seleccionado, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) para dar un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están determinados por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) terminal y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxilo) terminal. Una secuencia de terminación de la transcripción puede estar ubicada en 3' con respecto a la secuencia codificante.

Por “vector” quiere decirse cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que es capaz de replicarse cuando se asocia con los elementos de control apropiados y que puede transferir secuencias de genes a células. Por tanto, el término incluye la clonación y expresión de vehículos, así como vectores virales.

Por “vector recombinante” quiere decirse un vector que incluye una secuencia heteróloga de ácido nucleico que es capaz de producir expresión *in vivo*.

Por “virus recombinante” quiere decirse un virus que se ha alterado genéticamente, por ejemplo, mediante la adición o inserción de un constructo de ácido nucleico heterólogo dentro de la partícula.

El término “transfección” se usa para referirse a la captación de ADN foráneo por una célula, y una célula se ha “transfectado” cuando se ha introducido ADN exógeno dentro de la membrana celular. En la técnica se conocen generalmente varias técnicas de transfección. Véanse, por ejemplo, Graham *et al.* (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis *et al.* (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, y Chu *et al.* (1981) *Gene* 13:197. Tales técnicas pueden usarse para introducir con uno o más restos de ADN exógeno dentro de células huésped adecuadas.

El término “heterólogo” tal como se refiere a secuencias de ácido nucleico tales como secuencias codificantes y secuencias de control, indica secuencias que no están normalmente unidas entre sí, y/o no están asociadas normalmente con una célula particular. Por tanto, una región “heteróloga” de un constructo de ácido nucleico o un vector es un segmento de ácido nucleico dentro de o unido a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de un constructo de ácido nucleico podría incluir una secuencia codificante flanqueada por secuencias no encontradas en asociación con la secuencia codificante en la naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia codificante heteróloga es un constructo en el que la propia secuencia codificante no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). De manera similar, una célula transformada con un constructo que no está presente normalmente en la célula se consideraría heteróloga para los propósitos de esta invención. La variación alélica o acontecimientos de mutación que se producen de manera natural no dan lugar a ADN heterólogo, tal como se usa en el presente documento.

Una secuencia de “ácido nucleico” se refiere a una secuencia de ADN o ARN. El término aprehende secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN tales como, pero sin limitarse a 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroxil-metil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetil-aminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudo-uracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metil-citosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxi-amino-metil-2-tiouracilo, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutóxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

El término “secuencias de control” de ADN se refiere colectivamente a secuencias de promotor, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en el sentido de 5', orígenes de replicación, sitios internos de entrada al ribosoma (“IRES”), potenciadores, y similares, que proporcionan colectivamente la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No es necesario que todas estas secuencias de control estén presentes siempre con tal de que la secuencia codificante seleccionada pueda replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped apropiada.

El término “promotor” se usa en el presente documento en su sentido habitual para referirse a una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ADN, en la que la secuencia reguladora se deriva de un gen que es capaz de unirse a ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificante en el sentido de 3' (sentido 3'). Los promotores de la transcripción pueden incluir “promotores inducibles” (en los que la expresión de una secuencia de polinucleótido operativamente unida al promotor se induce mediante un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), “promotores reprimibles” (en los que la expresión de una secuencia de polinucleótido operativamente unida al promotor se induce mediante un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), y “promotores constitutivos”.

“Operativamente unido” se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados para realizar su función habitual. Por tanto, secuencias de control operativamente unidas a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. Las secuencias de control necesitan estar contiguas a la secuencia codificante, siempre que funcionen dirigiendo la expresión de las mismas. Por tanto, por ejemplo, secuencias intermedias no traducidas aunque transcritas pueden estar presentes entre una secuencia de promotor y la secuencia codificante y la secuencia de promotor puede considerarse todavía “operativamente unida” a la secuencia codificante.

Por “aislado” cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos, quiere decirse que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. Por tanto, una “molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido particular” se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido sujeto; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afectan de manera perjudicial a las características básicas de la composición.

Con el propósito de describir la posición relativa de secuencias de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico particular a lo largo de toda la presente invención, tal como cuando se describe una secuencia de nucleótidos particular como situada “en el sentido de 5'”, “en el sentido de 3'”, “3 prima (3'”) o “5 prima (5'”) en relación con otra secuencia, debe entenderse que es la posición de las secuencias en la hebra “sentido” o “codificante” de una molécula de ADN a la que está haciéndose referencia como convencional en la técnica.

Los términos “sujeto”, “individual” o “paciente” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un vertebrado, preferiblemente un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, roedores, simios, humanos, animales de granja, animales para deportes y mascotas.

Los términos “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” de una composición o agente, tal como se proporciona en el presente documento, se refieren a una cantidad no tóxica pero suficiente de la composición o agente para proporcionar la respuesta deseada, tal como una reducción o reversión del dolor. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad y estado general del sujeto, la gravedad del estado que está tratándose, y la macromolécula particular de interés, el modo de administración, y similares. Una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual puede determinarla un experto habitual en la técnica usando experimentación de rutina.

“Tratamiento” o “tratar” el dolor incluye: (1) prevenir el dolor, es decir provocar que no se desarrolle dolor o se produzca con menos intensidad en un sujeto que puede estar expuesto a o predispuesto al dolor pero que aún no experimenta o presenta dolor, (2) inhibir el dolor, es decir, detener el desarrollo o revertir el dolor o (3) aliviar el dolor, es decir, disminuir la cantidad de dolor experimentado por el sujeto.

Por “tratar el dolor existente” quiere decirse aliviar o revertir el dolor en un sujeto que ha estado experimentando dolor durante al menos 24 horas, tal como durante 24-96 horas o más, tal como 25...30...35...40...45...48...50...55...65...72...80...90...96...100, etc. horas. El término también pretende tratar el dolor que se ha producido a largo plazo, tal como durante semanas, meses o incluso años.

El término “sostenido” tal como se usa con referencia a la expresión de un transgén en una célula diana a partir de un plásmido que comprende una o más ITR, se refiere a un periodo de expresión más prolongado del que se lograría usando el mismo plásmido que carece de cualquier secuencia de ITR. Por ejemplo, en diversas realizaciones, expresión sostenida se refiere a la expresión de un transgén *in vivo* más de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70 o más días. En realizaciones de la invención relacionadas con el tratamiento de dolor neuropático, por ejemplo, la expresión sostenida puede medirse usando un modelo de dolor relevante tal como el modelo de rata con CCI y la prueba de filamento de von Frey, tal como se describe en más detalle en los ejemplos.

2. MODOS A MODO DE EJEMPLO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

En una realización a modo de ejemplo, la presente invención hace uso de citocinas antiinflamatorias, antagonistas de citocinas proinflamatorias y agentes que actúan reduciendo o previniendo la acción de citocinas inflamatorias para tratar el dolor, concretamente dolor neuropático. La citocina antiinflamatoria para su uso con la presente

invención es interleucina-10 (IL-10). Las moléculas nativas, así como fragmentos y análogos de las mismas, que conservan la capacidad para disminuir el dolor tal como se mide en cualquiera de los modelos de dolor conocidos incluyendo los descritos adicionalmente en el presente documento, están previstos para uso con la presente invención. Una molécula de IL-10 particularmente preferida para su uso en el presente documento incluye una fusión de IL-10 con la porción de Fc de una IgG, descrito en más detalle a continuación. Además, pueden usarse secuencias derivadas de cualquiera de numerosas especies con la presente invención, dependiendo del animal que va a tratarse.

Por ejemplo, varias secuencias relacionadas con IL-10, así como fragmentos de IL-10, variantes y agonistas, que funcionan reduciendo el dolor también encontrarán uso en el presente documento. Por ejemplo, se describen secuencias relacionadas con IL-10 en, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.ºs WO 00/65027; WO 98/28425; WO 95/24425 (sustancias de *Trichinella* inmunomoduladoras). La publicación internacional n.º WO 95/03411 describe secuencias de IL-10 acortadas, variantes y agonistas de IL-10 que tienen sustituciones o deleciones de aminoácidos en el extremo carboxilo y/o amino terminal de la secuencia humana madura; la patente estadounidense n.º 6.428.985 describe variantes de IL-10 con una sustitución de Ile en la posición 87 de la secuencia humana de IL-10 madura humana secuencia por Ala o Gly; la patente estadounidense n.º 6.159.937 describe un fragmento de IL-10 con la secuencia Ala-Tyr-Met-Thr-Met-Lys-Ile-Arg-Asn) (SEQ ID NO: 4); la publicación internacional n.º WO 97/26778 describe variantes de IL-10 con la secuencia X1-X2-X3-Thr-X4-Lys-X5-Arg-X6 (SEQ ID NO: 5) en donde X1=Ala o Gly; X2=Tyr o Phe; X3, X4 y X5 se seleccionan independientemente de Met, Ile, Leu y Val; y X6=Asp, Gln o Gly.

Se conocen bien secuencias de aminoácidos y nucleótidos de citocinas antiinflamatorias, antagonistas de citocinas proinflamatorias y agentes que actúan reduciendo o previniendo la acción de citocina inflamatorias, y variantes de los mismos, de varias especies animales. Por ejemplo, se ha aislado IL-10 de varias especies animales y virales. IL-10 para su uso en el presente documento incluye IL-10 de cualquiera de estas diversas especies. Los ejemplos no limitativos de IL-10 viral incluyen los homólogos de IL-10 aislados de los virus del herpes tales como de virus de Epstein-Barr (véanse, por ejemplo, Moore *et al.*, *Science* (1990) 248:1230-1234; Hsu *et al.*, *Science* (1990) 250:830-832; Suzuki *et al.*, *J. Exp. Med.* (1995) 182:477-486), citomegalovirus (véanse, por ejemplo, Lockridge *et al.*, *Virology* (2000) 268:272-280; Kottenko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97:1695-1700; publicación internacional n.º WO 01/16153) y virus del herpes equino (véase, por ejemplo, Rode *et al.*, *Virus Genes* (1993) 7:111-116), así como los homólogos de IL-10 del virus OrF (véanse, por ejemplo, Imlach *et al.*, *J. Gen. Virol.* (2002) 83:1049-1058 y Fleming *et al.*, *Virus Genes* (2000) 21:85-95). Véase, también, la figura 10 en el presente documento que representa la secuencia de aminoácidos de una forma madura, secretada de IL-10 viral. Los ejemplos representativos, no limitativos de otras secuencias de IL-10 para su uso con la presente invención incluyen las secuencias descritas en los números de registro del NCBI NM000572, U63015, AF418271, AF247603, AF247604, AF247606, AF247605, AY029171, UL16720 (todas secuencias humanas), y la figura 10 en el presente documento que representa la secuencia de aminoácidos de una forma secretada madura de IL-10 humana; NM012854, L02926, X60675 (rata); NM010548, AF307012, M37897, M84340 (todas secuencias de ratón), y la figura 10 en el presente documento que representa la secuencia de aminoácidos de una forma secretada madura de IL-10 de ratón; U38200 (equino); U39569, AF060520 (secuencias felinas); U00799 (bovino); U11421, Z29362 (secuencias ovinas); L26031, L26029 (secuencias de macaco); AF294758 (mono); U33843 (canino); AF088887, AF068058 (secuencias de conejo); AF012909, AF120030 (secuencias de marmota americana); AF026277 (zarigüeya); AF097510 (cobaya); U11767 (ciervo); L37781 (jerbo); AB107649 (llama y camello).

Los ejemplos no limitativos de secuencias de IL-1ra incluyen las secuencias descritas en los números de registro del NCBI NM173843, NM173842, NM173841, NM000577, AY196903, BC009745, AJ005835, X64532, M63099, X77090, X52015, M55646 (todas secuencias humanas); NM174357, AB005148 (secuencias bovinas); NM031167, S64082, M57525, M644044 (secuencias de ratón); D21832, 568977, M57526 (secuencias de conejo); SEG AB045625S, M63101 (secuencias de rata); AF216526, AY026462 (secuencias caninas); U92482, D83714 (secuencias equinas); AB038268 (delfín).

Los ejemplos no limitativos de secuencias de IL-4 incluyen las secuencias descritas en los números de registro del NCBI NM172348, AF395008, AB015021, X16710, A00076, M13982, NM000589 (todas secuencias humanas); BC027514, NM021283, AF352783, M25892 (secuencias de ratón); NM173921, AH003241, M84745, M77120 (secuencias bovinas); AY130260 (chimpancé); AF097321, L26027 (mono); AY096800, AF172168, Z11897, M96845 (secuencias ovinas); AF035404, AF305617 (secuencias equinas); AF239917, AF187322, AF054833, AF104245 (secuencias caninas); X16058 (rata); AF046213 (hámster); L07081 (cérvido); U39634, X87408 (felino); X68330, L12991 (secuencias porcinas); U34273 (cabra); AB020732 (delfín); L37779 (jerbo); AF068058, AF169169 (secuencias de conejo); AB107648 (llama y camello).

Los ejemplos no limitativos de secuencias de IL-13 incluyen las secuencias descritas en los números de registro del NCBI NM002188, U10307, AF377331, X69079 (todas secuencias humanas); NM053828, L26913 (secuencias de rata); AF385626, AF385625 (secuencias porcinas); AF244915 (canino); NM174089 (bovino); AY244790 (mono); NM008355 (ratón); AB107658 (camello); AB107650 (llama).

Los ejemplos no limitativos de secuencias de TGF-β1 incluyen las secuencias descritas en los números de registro

del NCBI NM000660, BD0097505, BD0097504, BD0097503, BD0097502 (todas secuencias humanas); NM021578, X52498 (secuencias de rata); AJ009862, NM011577, BC013738, M57902 (secuencias de ratón); AF461808, X12373, M23703 (secuencias porcinas); AF175709, X99438 (secuencias equinas); X76916 (ovino); X60296 (hámster); L34956 (canino).

5 Los ejemplos no limitativos de secuencias de alfa-MSH incluyen las secuencias descritas en el número de registro del NCBI NM 000939 (humano); NM17451 (bovino); NM 008895 (ratón); y M 11346 (*Xenopus*).

10 Los ejemplos no limitativos de secuencias de receptor de TNF para su uso con la presente invención incluyen las secuencias descritas en los números de registro del NCBI X55313, M60275, M63121, NM152942, NM001242, NM152877, NM152876, NM152875, NM152874, NM152873, NM152872, NM152871, NM000043, NM 001065, NM001066, NM148974, NM148973, NM148972, NM148971, NM148970, NM148969, NM148968, NM148967, NM148966, NM148965, NM003790, NM032945, NM003823, NM001243, NM152854, NM001250 (todas secuencias humanas); NM013091, M651122 (secuencias de rata).

15 Los ejemplos no limitativos de secuencias de IL-9 incluyen las secuencias descritas en los números de registro del NCBI NM000590 (humano) y NM008373 (ratón).

20 Pueden prepararse plásmidos que codifican la citocina antiinflamatoria deseada, antagonista de citocinas proinflamatorias y agentes que actúan reduciendo o previniendo la citocina inflamatoria para su uso con la presente invención usando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, pueden obtenerse plásmidos que codifican las moléculas descritas anteriormente usando métodos recombinantes, tales como examinando bibliotecas genómicas y de ADNc a partir de células que expresan el gen, o derivando el gen de un vector que se sabe que incluye el mismo. El gen de interés puede producirse también de manera sintética, en vez de clonarse, basándose en las secuencias conocidas. Las moléculas pueden diseñarse con codones apropiados para la secuencia particular. La secuencia completa se ensambla entonces a partir de oligonucleótidos solapantes preparados por métodos convencionales y se ensambla para dar una secuencia codificante completa. Véanse, por ejemplo, Edge, *Nature* (1981) 292:756; Nambair *et al.*, *Science* (1984) 223:1299; y Jay *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1984) 259:6311.

30 Por tanto, pueden obtenerse secuencias de nucleótidos particulares a partir de vectores que albergan las secuencias deseadas o sintetizarse completamente o en parte usando diversas técnicas de síntesis de oligonucleótidos conocidas en la técnica, tales como técnicas de mutagénesis dirigida al sitio y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuando sea apropiado. Véase, por ejemplo, Sambrook, citado anteriormente. Un método de obtención de secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias deseadas es apareando conjuntos complementarios de oligonucleótidos sintéticos solapantes producidos en un sintetizador de polinucleótidos convencional, automatizado, seguido por ligación con una ADN ligasa apropiada y amplificación de la secuencia de nucleótidos ligada por medio de PCR. Véase, por ejemplo, Jayaraman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:4084-4088. Adicionalmente, pueden usarse síntesis dirigida por oligonucleótidos (Jones *et al.*, *Nature* (1986) 54:75-82), mutagénesis dirigida por oligonucleótidos de regiones de nucleótidos preexistentes (Riechmann *et al.*, *Nature* (1988) 332:323-327 y Verhoeven *et al.*, *Science* (1988) 239:1534-1536) y relleno enzimático de oligonucleótidos con huecos usando ADN polimerasa de T4 (Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86:10029-10033) para proporcionar moléculas para su uso en los métodos sujeto.

45 Técnicas de suministro de genes

Los plásmidos de la presente invención, también denominados en el presente documento vectores no virales (VNV), pueden administrarse usando cualquiera de las diversas técnicas de suministro de plásmidos bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden introducirse vectores sin agentes de suministro, tal como se describe en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6.413.942, 6.214.804 y 5.580.859.

50 Alternativamente, los plásmidos que codifican el gen de interés pueden empaquetarse en liposomas antes del suministro al sujeto o a células derivadas del mismo, tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 5.580.859; 5.549.127; 5.264.618; 5.703.055. La encapsulación en lípidos se consigue generalmente usando liposomas que son capaces de unirse de manera estable o atrapar y retener ácido nucleico. La razón de ADN condensado con respecto a preparación de lípidos puede variar pero será generalmente de alrededor de 1:1 (mg de ADN:micromoles de lípido), o más de lípido. Para una revisión del uso de liposomas como portadores para el suministro de ácidos nucleicos, véanse, Hug y Sleight, *Biochim. Biophys. Acta.* (1991) 1097:1-17; Straubinger *et al.*, en *Methods of Enzymology* (1983), vol. 101, págs. 512-527. El ADN también puede suministrarse en composiciones de lípidos de la cóclea similares a las descritas por Papahadjopoulos *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta.* (1975) 394:483-491. Véanse, también, las patentes estadounidenses n.ºs 4.663.161 y 4.871.488.

65 Los plásmidos también pueden encapsularse, adsorberse a o asociarse con portadores particulados, bien conocidos en la técnica. Tales portadores presentan múltiples copias de una molécula seleccionada al sistema inmunitario y promueven el atrapamiento y la retención de moléculas en ganglios linfáticos locales. Las partículas pueden fagocitarse por macrófagos y pueden potenciar la presentación de antígenos a través de la liberación de citocinas. Los ejemplos de portadores particulados incluyen los derivados de polímeros de poli(metacrilato de metilo), así como

micropartículas derivadas de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glicolidas), conocidas como PLG. Véase, por ejemplo, Jeffery *et al.*, *Pharm. Res.* (1993) 10:362-368.

Además, el ADN de plásmido puede ir guiado por una señal de localización nuclear o modificación similar.

Adicionalmente, sistemas de suministro biolísticos que emplean portadores particulados tales como oro y tungsteno son adecuados para suministrar genes de interés. Las partículas se recubren con el gen que va a suministrarse y se aceleran hasta una alta velocidad, generalmente bajo una atmósfera reducida, usando una descarga de potencia de pistola a partir de una "pistola génica". Para una descripción de tales técnicas, y aparatos útiles por tanto, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.945.050; 5.036.006; 5.100.792; 5.179.022; 5.371.015; y 5.478.744.

Pueden usarse una amplia variedad de métodos para suministrar los vectores de plásmido. Tales métodos incluyen transfección mediada por DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polilisina o poliornitina, o precipitación usando otras sales inorgánicas insolubles, tales como fosfato de estroncio, silicatos de aluminio incluyendo bentonita y caolín, óxido crómico, silicato de magnesio, talco, y similares. Otros métodos de transfección útiles incluyen electroporación, sonoporación, fusión de protoplastos, suministro de peptoides o microinyección. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente, para una discusión de técnicas para transformar células de interés; y Feigner, P.L., *Advanced Drug Delivery Reviews* (1990) 5:163-187, para una revisión de sistemas de suministro útiles para la transferencia de genes. Se describen métodos de suministro de ADN usando electroporación en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.132.419; 6.451.002, 6.418.341, 6.233.483, la publicación de patente estadounidense n.º 2002/0146831; y la publicación internacional n.º WO/0045823.

También puede ser deseable fusionar el plásmido que codifica el gen de interés con moléculas de inmunoglobulina con el fin de proporcionar expresión sostenida. Una técnica conveniente es fusionar el plásmido que codifica el agente de interés con la porción de Fc de una IgG2a de ratón con una mutación no citolítica. Además, en una realización, un gen de IL-10 puede estar presente en forma de una proteína de fusión, fusionada a la porción de Fc de una IgG. Se ha mostrado que una técnica de este tipo proporciona expresión sostenida de citocinas, tales como IL-10, especialmente cuando se combina con electroporación. Véanse, por ejemplo, Jiang *et al.*, *J. Biochem.* (2003) 133:423-427; y Adachi *et al.*, *Gene Ther.* (2002) 9:577-583.

ITR de virus adenoasociado

Pueden obtenerse secuencias de ITR para su uso en la presente invención a partir de virus, incluyendo VAA. Se ha usado VAA con éxito para suministrar genes para terapia génica. El genoma de VAA es una molécula de ADN lineal, monocatenaria que contiene aproximadamente 4681 nucleótidos. El genoma de VAA comprende generalmente un genoma interno, no repetitivo flanqueado en cada extremo por repeticiones terminales invertidas (ITR). Las ITR tienen aproximadamente 145 pares de bases (pb) de longitud. Las ITR tienen múltiples funciones, incluyendo proporcionar orígenes de replicación de ADN, y señales de empaquetamiento para el genoma viral.

Se conocen las secuencias de nucleótidos de regiones de ITR de VAA. Véanse, por ejemplo, Kotin, R.M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Berns, K.I. "Parvoviridae and their Replication" en *Fundamental Virology*, 2.^a edición, (B.N. Campos y D.M. Knipe, eds.) para la secuencia de VAA-2. No es necesario que las ITR de VAA usadas en los vectores de la invención tengan una secuencia de nucleótidos de tipo natural, y puede estar alteradas, por ejemplo, mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos. Adicionalmente, pueden derivarse ITR de VAA de cualquiera de varios serotipos de VAA, incluyendo sin limitación, VAA-1, VAA-2, VAA-3, VAA-4, VAA-5, VAA-6, VAA-7 y VAA-8, etc. Las ITR de VAA también pueden derivarse de variantes de VAA aisladas de otras especies, tales como ratón, cabra y vaca. Además, no es necesario que las ITR de VAA en un vector de expresión de VAA sean idénticas o se deriven del mismo aislado o serotipo de VAA, siempre que funcionen tal como se prevé, es decir, permitiendo la escisión y el rescate de la secuencia de interés a partir de un genoma o vector de célula huésped, y permitiendo la integración de la molécula de ADN en el genoma de la célula receptora cuando están presentes productos del gen Rep de VAA en la célula.

En una realización, se obtienen secuencias de ITR de adenovirus. El ADN adenoviral ("Ad") contiene repeticiones terminales invertidas ("ITR") idénticas de aproximadamente 100 pares de bases dependiendo la longitud exacta del serotipo. Los orígenes virales de replicación están ubicados dentro de las ITR de manera exacta en los extremos del genoma. Se describen vectores de adenovirus "mínimos" en la patente estadounidense n.º 6.306.652. Tales vectores conservan al menos una porción del genoma viral que se requiere para la encapsidación del genoma dentro de partículas de virus (la señal de encapsidación), así como al menos una copia de al menos una parte funcional o un derivado de la ITR.

En aún otra realización, se usan repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus de leucemia murina en lugar de las secuencias de ITR en los plásmidos de la presente invención. Los retrovirus de leucemia murina incluyen un ARN monocatenario complejo con una proteína central nuclear y enzimas polimerasa (pol) encerradas por un núcleo de proteína (gag) y rodeadas por una envuelta de glicoproteína (env) que determinan el intervalo de huésped. La estructura genómica de los retrovirus incluye los genes de gag, pol y env encerrados en las repeticiones

terminales largas (LTR) en 5' y 3'.

Vectores de expresión de VAA recombinante

5 Se construyen plásmidos de vectores de expresión de VAA recombinante (VAAr) usando técnicas conocidas para al menos proporcionar como componentes operativamente unidos en la dirección de transcripción, elementos de control que incluyen una región de iniciación de la transcripción, el polinucleótido antiinflamatorio de interés y una región de terminación de la transcripción. Tales constructos pueden diseñarse usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.173.414 y 5.139.941; las publicaciones internacionales n.ºs WO 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y WO 93/03769 (publicada el 4 de marzo de 1993); Lebkowski *et al.* (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996; Vincent *et al.* (1990) *Vaccines 90* (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539; Muzyczka (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129; Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Shelling y Smith (1994) *Gene Therapy* 1:165-169; y Zhou *et al.* (1994) *J. Exp. Med.* 179:1867-1875.

15 Los elementos de control se seleccionan para que sean funcionales en una célula diana. En una realización, el constructo resultante que contiene los componentes operativamente unidos está limitado (en 5' y 3') por secuencias funcionales de ITR de VAA. En otras realizaciones, una de las ITR de VAA se elimina.

20 Se ha modificado por ingeniería genética VAA para suministrar genes de interés delecionando la porción no repetida interna del genoma de VAA (es decir, los genes *rep* y *cap*) e insertando un gen heterólogo (en este caso, el gen que codifica la citocina antiinflamatoria) entre las ITR. El gen heterólogo está normalmente unido funcionalmente a un promotor heterólogo (constitutivo, específico de células o inducible) capaz de dirigir la expresión génica en las células diana del paciente en condiciones apropiadas. Las secuencias de control heterólogas útiles incluyen generalmente las derivadas de secuencias que codifican genes de mamífero o virales. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, promotor de enolasa específico de neuronas, un promotor de GFAP, el promotor temprano de SV40, promotor de LTR de virus de tumor mamario de ratón; promotor tardío principal de adenovirus (MLP de Ad); un promotor del virus del herpes simple (VHS), un promotor de citomegalovirus (CMV) tal como la región promotora temprana inmediata de CMV (CMVIE), un promotor de virus del sarcoma de Rous (VSR), promotores sintéticos, promotores híbridos, y similares. Además, secuencias derivadas de genes no virales, tales como el gen de metalotioneína murina, también encontrarán uso en el presente documento. Tales secuencias de promotor están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Stratagene (San Diego, CA).

35 También pueden incluirse señales de terminación, tales como sitios de poliadenilación. Pueden producirse vectores de VAA recombinante que comprenden un transgén de interés, por ejemplo una secuencia que codifica una citocina antiinflamatoria, usando una variedad de técnicas reconocidas en la técnica en el campo de biología molecular.

40 Alternativamente, pueden cortarse ITR de VAA del genoma viral o de un vector de VAA que contiene las mismas y fusionarse en 5' y 3' de un constructo de ácido nucleico seleccionado que está presente en otro vector usando técnicas de ligación convencionales, tales como las descritas en Sambrook *et al.*, citado anteriormente. En aún otra alternativa, se fusiona una única ITR de VAA con o bien el extremo 5' o bien el 3' del constructo de ácido nucleico seleccionado. Por ejemplo, las ligaciones pueden lograrse en Tris-Cl 20 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, BSA 33 µg/ml, NaCl 10 mM-50 mM y o bien ATP 40 µM, 0,01-0,02 (Weiss) unidades de ADN ligasa de T4 a 0 °C (para la ligación de "extremos cohesivos") o bien ATP 1 mM, 0,3-0,6 (Weiss) unidades de ADN ligasa de T4 a 14 °C (para la ligación de "extremos romos"). Las ligaciones de "extremos cohesivos" intermoleculares se realizan habitualmente a concentraciones de ADN total de 30-100 µg/ml (concentración final total de 5-100 nM). Se han descrito vectores de VAA que contienen ITR en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.139.941. Varios vectores de VAA descritos en la misma están disponibles de la Colección americana de cultivos tipo ("ATCC") con los números de registro 53222, 53223, 53224, 53225 y 53226.

50 Transgenes a modo de ejemplo

Además de IL-10, la lista de posibles transgenes que van a suministrarse usando un plásmido que contiene ITR de la presente invención incluye, pero no se limita a: glucosa-6-fosfatasa, asociada con deficiencia de almacenamiento de glucógeno de tipo 1A; ADN que codifica fosfoenolpiruvato-carboxinasa, asociada con deficiencia de Pepck; ADN que codifica galactosa-1-fosfato uridil transferasa, asociada con galactosemia; ADN que codifica fenilalanina hidroxilasa, asociada con fenilcetonuria; ADN que codifica alfa-cetoácido de cadena ramificada deshidrogenasa, asociada con cetoaciduria de cadena ramificada; ADN que codifica fumarilacetoacetato hidrolasa, asociada con tirosinemia de tipo 1; ADN que codifica metilmalonil-CoA mutasa, asociada con acidemia metilmalónica; ADN que codifica acil-CoA de cadena media deshidrogenasa, asociada con deficiencia de acetil-CoA de cadena media; ADN que codifica ornitina transcarbamilasa, asociada con deficiencia de ornitina transcarbamilasa; ADN que codifica ácido argininosuccinico sintetasa, asociada con citrulinemia; ADN que codifica proteína receptora de lipoproteínas de baja densidad, asociada con hipercolesterolemia familiar; ADN que codifica UDP-glucouronosiltransferasa, asociada con enfermedad de Crigler-Najjar; ADN que codifica adenosina desaminasa (ADA), asociada con enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave; ADN que codifica hipoxantina guanina fosforribosil transferasa, asociada con gota y síndrome de Lesch-Nyan; ADN que codifica biotinidasa, asociada con deficiencia de biotinidasa;

ADN que codifica beta-glucocerebrosidasa, asociada con enfermedad de Gaucher; ADN que codifica beta-glucuronidasa, asociada con síndrome de Sly; ADN que codifica proteína de membrana de peroxisomas de 70 kDa, asociada con síndrome de Zellweger; ADN que codifica porfobilinógeno desaminasa, asociada con porfiria intermitente aguda; ADN que codifica alfa-1 antitripsina para el tratamiento de deficiencia de alfa-1 antitripsina (enfisema); ADN que codifica eritropoyetina (EPO) para el tratamiento de anemia debida a talasemia o a insuficiencia renal; ADN que codifica factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), ADN que codifica angiopoyetina-1 y ADN que codifica factor de crecimiento de fibroblastos para el tratamiento de enfermedades isquémicas; ADN que codifica trombosmodulina e inhibidor de la ruta de factor tisular (TFPI) para el tratamiento de vasos sanguíneos ocluidos tal como se observa en, por ejemplo, aterosclerosis, trombosis o embolias; ADN que codifica aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) y ADN que codifica tirosina hidroxilasa (TH) para el tratamiento de enfermedad de Parkinson; ADN que codifica el receptor beta adrenérgico, ADN que codifica antisentido a, o ADN que codifica una forma mutante de, fosfolamban, ADN que codifica la adenosina trifosfatasa-2 de retículo sarco(end)plasmático (SERCA2) y ADN que codifica la adenililo ciclasa cardiaca para el tratamiento de insuficiencia cardiaca congestiva; ADN que codifica un gen supresor de tumores tal como p53 para el tratamiento de diversos cánceres; ADN que codifica una citocina tal como una de las diversas interleucinas para el tratamiento de cánceres y trastornos inflamatorios e inmunitarios; ADN que codifica distrofina o minidistrofina y ADN que codifica utrofina o miniutrofina para el tratamiento de distrofias musculares; y ADN que codifica insulina para el tratamiento de diabetes.

La memoria descriptiva también se refiere a plásmidos que contienen ITR que comprenden un gen o genes que codifican proteínas de la coagulación sanguínea, genes que pueden suministrarse usando los métodos de la presente invención, a las células de un mamífero para el tratamiento de hemofilia u otro trastorno de la coagulación sanguínea. Por tanto, la invención incluye: suministro del gen de factor IX a un mamífero para tratamiento de hemofilia B, suministro del gen de factor VIII a un mamífero para el tratamiento de hemofilia A, suministro del gen de factor VII para el tratamiento de deficiencia de factor VII, suministro del gen de factor X para el tratamiento de deficiencia de factor X, suministro del gen de factor XI para el tratamiento de deficiencia de factor XI, suministro del gen de factor XIII para el tratamiento de deficiencia de factor XIII y suministro del gen de proteína C para el tratamiento de deficiencia de proteína C. Por tanto, la invención incluye plásmidos que contienen ITR que comprenden genes que codifican uno cualquiera de factor IX, factor VIII, factor X, factor VII, factor XI, factor XIII o proteína C.

Los transgenes de referencia a modo de ejemplo también incluyen, pero no se limitan a: sFLT-1; antagonista de receptor de interleucina-1 (IL-1ra); interleucina-4 (IL-4); interleucina-13 (IL-13); receptor soluble de factor de necrosis tumoral (TNFsr); alfa-MSH; factor de crecimiento transformante-beta 1 (TGF-beta 1); receptor de interleucina-1; receptor soluble de interleucina-1; receptor soluble de factor de necrosis tumoral; interferón-alfa; el inhibidor de osteoclastos osteoprotegerina; polipéptido de factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF); guanosina trifosfato ciclohidrolasa; 6-piruvoil-tetrahydropterina sintasa; dihidropteridina reductasa; arginina-vasopresina (AVP); Cox-1; E2F-1; E2F-2A; E2F-2B; PGIS; Cox-1(2A); Cox-2(2B); ENOS; TIMP-1; TIMP-2; y los genes implicados en defectos genéticos bien conocidos tales como fibrosis quística (CFTR), enfermedad de Hurler y enfisema.

Composiciones y suministro

A. Composiciones

Una vez producidos, los vectores de ADN de plásmido que codifican el transgén de interés se formularán para dar composiciones adecuadas para su suministro. En una realización dirigida al tratamiento de dolor neuropático, las composiciones comprenderán material genético suficiente como para producir una cantidad terapéuticamente eficaz de la citocina antiinflamatoria de interés, es decir, una cantidad suficiente para reducir o mejorar el dolor. Las composiciones también contendrán un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico que por sí mismo no induce la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, y que pueden administrarse sin excesiva toxicidad. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sorbitol, cualquiera de los diversos compuestos de TWEEN y líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Pueden incluirse en las mismas sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH, y similares, pueden estar presentes en tales vehículos. Una discusión concienzuda de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Una formulación particularmente útil comprende el vector de ADN de plásmido de interés en combinación con uno o más alcoholes dihidroxilados o polihidroxilados y, opcionalmente, un detergente, tal como un éster de sorbitano. Véase, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 00/32233.

Tal como resulta evidente para los expertos en la técnica en vista de las enseñanzas de esta memoria descriptiva, una cantidad eficaz puede determinarse empíricamente. Más adelante se detallan dosis representativas. La administración puede efectuarse en una dosis, de manera continua o intermitente a lo largo del transcurso del

tratamiento. Los expertos en la técnica conocen bien métodos de determinación de los medios y dosificaciones de administración más eficaces y variarán con el vector, la composición de la terapia, las células diana y el sujeto que está tratándose. Pueden llevarse a cabo administraciones individuales y múltiples seleccionando el nivel y patrón de dosis el médico encargado.

5 Tal como se muestra en los ejemplos a continuación, un modo particularmente eficaz para producir alivio a largo plazo del dolor implica administrar dos o más dosis de plásmido que contiene ITR que codifica IL-10 en intervalos cercanos, por ejemplo, con una separación de menos de 10 días, preferiblemente una separación de menos de 5 días, más preferiblemente una separación de menos de 4 días, tal como con 3...2...1...etc. y cualquier cantidad de tiempo dentro de intervalos establecidos.

15 Debe indicarse que el plásmido suministrado puede expresar más de un transgén. Por ejemplo, los vectores recombinantes pueden codificar más de una citocina antiinflamatoria. Alternativamente, pueden suministrarse también plásmidos diferenciados, expresando cada uno uno o más transgenes diferentes, al sistema nervioso tal como se describe en el presente documento. Por tanto, pueden suministrarse múltiples citocinas antiinflamatorias de manera simultánea o secuencial. Además, se pretende también que los vectores suministrados mediante los métodos de la presente invención se combinen con otras composiciones y terapias adecuadas. Por ejemplo, otros analgésicos y agentes de alivio del dolor, tales como antiprostaglandinas, incluyendo, sin limitación, inhibidores de ciclooxigenasa-2 (COX-2), inhibidores de 5-lipoxigenasa (5-LOX), y similares, pueden administrarse conjuntamente con las composiciones de la invención. Otros compuestos para el suministro incluyen agentes usados en el tratamiento de dolor neuropático tales como, pero sin limitarse a, antidepresivos tricíclicos (por ejemplo, amitriptilina, imipramina, desipramina), anticonvulsivos (por ejemplo, gabapentina, carbamazepina, fenitoína) y anestésicos locales (por ejemplo, mexiletina, lidocaína); y agentes usados en el tratamiento de dolor inflamatorio incluyendo, pero sin limitarse a, AINE (por ejemplo, ibuprofeno, naproxeno sódico, aspirina, diclofenaco sódico, indometacina, toletina), esteroides (por ejemplo, metilprednisona, prednisona), analgésicos (por ejemplo, paracetamol) y opiáceos (por ejemplo, tramadol, Demerol, Darvon, Vicodin, fentanilo).

B. Suministro

30 Los vectores de ADN de plásmido recombinantes de la presente invención pueden introducirse en un tejido diana mediante cualquier método conocido en la técnica.

35 En una realización dirigida al tratamiento de dolor neuropático, los plásmidos se dirigen preferiblemente al sistema nervioso, incluyendo cualquier célula o tejido del SNC o sistema nervioso periférico, o células o tejidos en proximidad estrecha al mismo. Por tanto, el suministro puede ser, por ejemplo, a cualquier tejido neural incluyendo, sin limitación, nervios periféricos, la retina, ganglios de la raíz dorsal, unión neuromuscular, así como el SNC, por ejemplo, a células gliales de la médula espinal diana, células en el líquido cefalorraquídeo (LCR), células en los espacios intersticiales, células en las cubiertas protectoras de la médula espinal, células epidurales (es decir, células fuera de la duramadre), células en tejidos no neurales adyacentes a o en contacto con o inervados por tejido neural.

40 Los vectores de ADN de plásmido recombinantes se introducen o bien *in vivo* o bien *in vitro* (también denominado *ex vivo*) para tratar un daño neuronal preexistente, neuropatías y otras causas de dolor neuropático tal como se definió anteriormente. Si transduce *in vitro*, la célula receptora deseada se extraerá del sujeto, se tratará con plásmidos de VAAr y se reintroducirá en el sujeto. Alternativamente, pueden usarse células singénicas o xenogénicas en donde esas células no generarán una respuesta inmunitaria inapropiada en el sujeto. Adicionalmente, pueden tratarse células progenitoras neurales *in vitro* y luego suministrarse al SNC.

45 Generalmente, se suministrará desde 1 μ l hasta 1 ml de composición, tal como dese 0,01 hasta aproximadamente 0,5 ml, por ejemplo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,3 ml, tal como 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, etc. y cualquier número dentro de estos intervalos, se suministrará de la composición.

50 Pueden suministrarse plásmidos recombinantes, o células tratadas con plásmido *in vitro*, directamente a tejido neural tal como nervios periféricos, la retina, ganglios de la raíz dorsal, unión neuromuscular, así como al SNC, por ejemplo, a células gliales de la médula espinal diana, células en el líquido cefalorraquídeo (LCR), células en los espacios intersticiales, células en las cubiertas protectoras de la médula espinal, células epidurales (es decir, células fuera de la duramadre), células en tejidos no neurales adyacentes a o en contacto con o inervados por tejido neural, y similares, mediante inyección en, por ejemplo, la región ventricular, así como en el cuerpo estriado (por ejemplo, el núcleo caudado o putamen del cuerpo estriado), médula espinal y unión neuromuscular, en el espacio intersticial, con una aguja, catéter o dispositivo relacionado, usando técnicas conocidas en la técnica, tal como mediante inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Stein *et al.*, *J Virol* 73:3424-3429, 1999; Davidson *et al.*, *PNAS* 97:3428-3432, 2000; Davidson *et al.*, *Nat.Genet.* 3:219-223, 1993; y Alisky y Davidson, *Hum. Gene Ther.* 11:2315-2329, 2000), suministro epidural, etc.

65 El método de la invención para seleccionar como diana el sistema nervioso, tal como glía de la médula espinal, es mediante suministro intratecal, en vez de en la propia médula espinal. Una ventaja de la terapia génica intratecal es que la vía intratecal imita la administración mediante punción lumbar (es decir, punción espinal) ya en uso rutinario

en humanos.

Otro método para el suministro es mediante administración en el espacio epidural. El espacio epidural ocupa el canal vertebral entre el periosteo que reviste el canal y la duramadre. Al espacio epidural se accede fácilmente a través de la zona lumbar. Generalmente, se inserta una aguja, catéter o similar en la línea central y se hace pasar a través de la piel, aponeurosis, ligamentos supraespinoso e intraespinoso, y el ligamento flavum antes de alcanzar el espacio extradural. Sin embargo, la administración también puede ser a través de la zona torácica. Se conocen bien en la técnica métodos para suministrar agentes por vía epidural. Véase, por ejemplo, *Textbook of Surgery*, (D.C. Sabiston, ed.) W.B. Saunders Company.

Aún otro modo de administración al SNC usa un sistema de suministro potenciado por convección (CED). De este modo, pueden suministrarse vectores de ADN de plásmido recombinantes a muchas células a lo largo de grandes zonas del SNC. Cualquier dispositivo de suministro potenciado por convección puede ser apropiado para el suministro de vectores recombinantes. En una realización preferida, el dispositivo es una bomba osmótica o una bomba de infusión. Están disponibles comercialmente tanto bombas osmóticas como de infusión de una variedad de proveedores, por ejemplo Alzet Corporation, Hamilton Corporation, Alza, Inc. (Palo Alto, California). Normalmente, se suministra un vector de ADN de plásmido recombinante por medio de dispositivos de CED tal como sigue. Se inserta un catéter, una cánula u otro dispositivo de inyección en el tejido del SNC en el sujeto elegido. Están disponibles mapas estereotácticos y dispositivos de posicionamiento, por ejemplo de ASI Instruments, Warren, MI. El posicionamiento también puede realizarse usando mapas anatómicos obtenidos mediante obtención de imágenes por CT y/o MRI para ayudar a guiar el dispositivo de inyección a la diana elegida. Además, debido a que los métodos descritos en el presente documento pueden ponerse en práctica de manera que zonas relativamente grandes del sujeto captan los vectores de ADN de plásmido recombinantes, son necesarias menos cánulas de infusión. Puesto que las complicaciones quirúrgicas están relacionadas con el número de penetraciones, este modo de suministro sirve para reducir los efectos secundarios observados con técnicas de suministro convencionales. Para una descripción detallada con respecto al suministro de CED, véase la patente estadounidense n.º 6.309.634.

Además, el gen que codifica el agente activo puede fusionarse con secuencias que codifican anticuerpos o péptidos para mejorar la estabilidad y prolongar la semivida, usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, el gen que codifica el agente activo puede fusionarse con secuencias que codifican moléculas de inmunoglobulina con el fin de proporcionar liberación sostenida. Una técnica conveniente es fusionar el gen que codifica el agente de interés con una secuencia que codifica la porción de Fc de una IgG tal como una IgG2a de humano o ratón con una mutación no citolítica. Véanse, por ejemplo, Jiang *et al.*, *J. Biochem.* (2003) 133:423-427; Adachi *et al.*, *Gene Ther.* (2002) 9:577-583; y la patente estadounidense n.º 6.410.008. Una quimera de IL-10 humana/Fc recombinante no lítica está disponible comercialmente de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Un modo particularmente eficaz para producir alivio a largo plazo del dolor implica administrar dos o más dosis de ADN de plásmido que codifica IL-10 y una o más ITR de VAA a intervalos cercanos, por ejemplo, una separación de menos de 10 días, preferiblemente una separación de menos de 5 días, más preferiblemente una separación de menos de 4 días, tal como con 3...2...1...etc. y cualquier cantidad de tiempo dentro de los intervalos establecidos.

Modelos de dolor

La capacidad de una citocina antiinflamatoria para tratar el dolor puede evaluarse mediante cualquiera de los modelos de dolor aceptados conocidos en la técnica. Los ejemplos de tales modelos son tal como sigue. No todos los modelos divulgados a continuación se usan en los experimentos notificados en el presente documento.

Modelo de retirada de la cola: La prueba de retirada de la cola (D'Amour *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. y Ther.* (1941) 72:74-79) es un modelo de dolor agudo. Una rata restringida de manera suave se coloca en una fase de prueba de manera que una fuente de luz enfocada incide sobre la superficie dorsal o ventral de la cola de la rata. Está presente un fotodetector en la fase de prueba ubicado opuesto a la fuente de luz. Para comenzar la prueba, la cola de la rata bloquea la luz, impidiendo así que la luz alcance el fotodetector. La medición de la latencia comienza con la activación de la fuente de luz. Cuando una rata mueve o retira su cola, el fotodetector detecta la fuente de luz y detiene la medición. La prueba mide el periodo de tiempo (duración) que la cola de la rata permanece inmóvil (latente). Las ratas se someten a prueba antes de la administración a las mismas de un compuesto de interés y luego a diversos tiempos tras tal administración.

Modelo de inmersión de cola de rata: El ensayo de inmersión de cola de rata es también un modelo de dolor agudo. Se sujeta con la mano sin apretar una rata mientras se cubre con una toalla de algodón fina doblada pequeña con su cola expuesta. Se sumerge la punta de la cola en un baño de agua (por ejemplo 52 °C) hasta una profundidad de dos pulgadas. La rata responde o bien meneando la cola o bien retirando la cola del agua; cualquier respuesta se puntúa como criterio de comportamiento. Las ratas se someten a prueba para determinar una puntuación de latencia de respuesta de la cola (TRL) antes de la administración a las mismas de un compuesto de interés y luego vuelven a someterse a prueba para determinar la TRL a diversos tiempos tras tal administración.

Modelo de hiperalgesia de la zarpa inducida por carragenanos: La prueba de hiperalgesia de la zarpa por

carragenanos es un modelo de dolor inflamatorio. Se realiza una inyección subcutánea de carragenanos en las zarpas izquierdas de las ratas. Las ratas se tratan con un agente seleccionado antes, por ejemplo, 30 minutos, de la inyección de carragenanos o después, por ejemplo, dos horas después, de la inyección de carragenanos. Se somete a prueba la sensibilidad a la presión de las zarpas para cada animal con un analgesímetro tres horas después de la inyección de carragenanos. Véase Randall *et al.*, *Arch. Int. Pharmacodyn.* (1957) 111:409-419.

Los efectos de los agentes seleccionados sobre el edema de la zarpa inducido por carragenanos también pueden examinarse. Esta prueba (véase Vinegar *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1969) 166:96-103) permite una evaluación de la capacidad de un compuesto para revertir o prevenir la formación de edema provocado por inyección de carragenanos en la zarpa. La prueba de edema de la zarpa se lleva a cabo usando un petismómetro para mediciones de las zarpas. Tras la administración de un agente seleccionado, se inyecta una disolución de carragenanos por vía subcutánea en la almohadilla lateral del pie en la superficie plantar de la zarpa de la extremidad izquierda. A las tres horas tras el tratamiento con carragenanos, se mide el volumen de la zarpa tratada (izquierda) y la zarpa sin tratar (derecha) usando un petismómetro.

Modelo de respuesta de comportamiento a formol: La prueba de formol es un modelo de dolor agudo, persistente. La respuesta al tratamiento con formol es bifásica (Dubuisson *et al.*, *Pain* (1977) 4:161-174). La respuesta de fase I es indicativa de una respuesta nociceptiva pura al irritante. Se cree que la fase 2, que comienza normalmente de 20 a 60 minutos tras la inyección de formol, refleja un aumento de la sensibilización de la médula espinal.

Prueba de filamento de von Frey: El efecto de compuestos sobre la alodinia mecánica puede determinarse mediante la prueba de filamento de von Frey en ratas con una ligación estrecha del nervio espinal L-5: un modelo de neuropatía periférica dolorosa. El procedimiento quirúrgico se realiza tal como describen Kim *et al.*, *Pain* (1992) 50:355-363. Se usa una serie calibrada de filamentos de von Frey para evaluar la alodinia mecánica (Chaplan *et al.*, *J. Neurosci. Methods* (1994) 53:55-63). Se aplican filamentos de rigidez creciente perpendiculares a la superficie plantar media en la distribución del nervio ciático de la zarpa trasera izquierda. Los filamentos se bajan lentamente hasta que se produce flexión y se mantienen entonces durante 4-6 segundos. El orden de aplicación de los filamentos y el número de ensayos se determinan mediante el método hacia arriba y hacia abajo de Dixon (Chaplan *et al.*, citado anteriormente). El estremecimiento y lamido de la zarpa y la retirada de la zarpa en el lado ligado se consideran respuestas positivas.

Lesión de constricción crónica: Las respuestas de alodinia al calor y frío pueden evaluarse tal como se describe a continuación en ratas que tienen una lesión por constricción crónica (CCI). Se produce una mononeuropatía unilateral en ratas usando el modelo de lesión por constricción crónica descrito en Bennett *et al.*, *Pain* (1988) 33:87-107. Se produce CCI en ratas anestesiadas tal como sigue. El aspecto lateral de cada extremidad trasera de la rata se afeita y se lava con Nolvasan. Usando técnicas asépticas, se hace una incisión en el aspecto lateral de la extremidad trasera al nivel del muslo medio. Se disecciona de manera roma el bíceps femoral para exponer el nervio ciático. En la extremidad trasera derecha de cada rata, se hacen cuatro ligaduras atadas sin apretar (por ejemplo, intestino crómico 4.0; Eticon, Johnson and Johnson, Somerville, NJ) alrededor del nervio ciático separadas aproximadamente 1-2 mm. En el lado izquierdo de cada rata, se realiza una disección idéntica excepto porque el nervio ciático no se liga (simulación). Se cierra el músculo con un patrón de sutura continua con, por ejemplo, vicrilo 4-0 (Johnson and Johnson, Somerville, NJ) y la piel superpuesta se cierra con grapas para heridas. Las ratas se etiquetan en la oreja para propósitos de identificación y se devuelven al alojamiento de animales.

2. Parte experimental

Lo siguiente son ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen para propósitos ilustrativos solo, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ningún modo.

Materiales y métodos

Sujetos

Se usaron ratas Sprague-Dawley macho adultas libres de patógenos (300-450 g; Harlan Labs, Madison, WI) en todos los experimentos. Las ratas se alojaron en sales de temperatura y luz controladas con dieta de roedores convencional y agua disponible a voluntad. Se realizaron las pruebas de comportamiento durante el ciclo de luz.

Plásmidos

En los experimentos descritos en los ejemplos 1-4, se subclonó ADN de plásmido que codifica IL-10 (pTR2-CB-rIL-10) o GFP (pTR2-CB-GFP-TK-NEO (UF11)) y se purificó de manera similar a procedimientos descritos previamente (Sambrook, J, Fritsch, E.R., Maniatis, T. *Molecular cloning*, 2.^a ed., Cold Spring Harbor Press, págs. 1.38-1.39, 1989). Tras los procedimientos de aislamiento, se dializaron los plásmidos (ADNp) durante 1 h frente a DPBS (1x) y dos veces cada uno durante 2 h frente a DPBS-sacarosa al 3 %. Se almacenaron las preparaciones de ADNp dializadas como alícuotas de 300 μ l a -80 °C. Se determinó la concentración de las preparaciones de ADNp-IL10 y ADNp-UF11 mediante absorción a 260 nm y fueron de 4,2 μ g/ml y 5,6 μ g/ul respectivamente. Se les administraron a

los animales 100 µg de ADNp durante cada día de inyección. Hubo un total de cuatro inyecciones durante el experimento de 77 días.

Medidas de comportamiento

5 *Prueba de von Frey.* La prueba de von Frey (Chaplan *et al.*, *J. Neurosci Met.* (1994) 53:55-63) se realizó dentro de la zona de inervación ciática y safena de las zarpas traseras tal como se describió previamente (Milligan *et al.*, *Brain Res.* (2000) 861:105-116; Chacur *et al.*, *Pain* (2001) 94:231-244; Gazda *et al.*, *J. Peripheral Nerv. Sys.* (2001) 6:111-129; Milligan *et al.*, *J. Neurosci.* (2001) 21:2808-2819. En resumen, se aplicó al azar una serie logarítmica de 10 monofilamentos de Semmes-Weinstein calibrados (cerdas de von Frey; Stoelting, Wood Dale, IL) a las zarpas traseras derecha e izquierda para determinar la rigidez umbral de intensidad de estímulo requerida para provocar una respuesta de retirada de la zarpa. El logaritmo de la rigidez de las cerdas se determina mediante log₁₀ (miligramos × 10). Los 10 estímulos tenían los siguientes valores de logaritmo de la rigidez (los valores en miligramos se facilitan entre paréntesis): 3,61 (407 mg), 3,84 (692 mg), 4,08 (1202 mg), 4,17 (1479 mg), 4,31 (2041 mg), 4,56 (3630 mg), 4,74 (5495 mg), 4,93 (8511 mg), 5,07 (11,749 mg) y 5,18 (15,136 mg). La gama de monofilamentos usados en estos experimentos (0,407-15,136 g) produce una pendiente graduada logarítmicamente cuando se interpola un umbral de respuesta del 50 % de intensidad de estímulo [expresada como log₁₀ (miligramos × 10)] (Chaplan *et al.*, *J. Neurosci Met.* (1994) 53:55-63). Se hicieron las evaluaciones antes de (nivel inicial) y a tiempos específicos tras la administración de fármaco periciática e intratecal, tal como se detalla a continuación para cada experimento. Se realizaron pruebas de comportamiento ciegas con respecto a la administración de fármaco. Se usaron las pruebas de comportamiento para calcular el umbral de retirada de la zarpa del 50 % (umbral absoluto), mediante ajuste de una función psicométrica integral gaussiana usando un método de ajuste de probabilidad máxima (Harvey, *Behav. Res. Met. Instrum. Comput.* (1986) 18:623-632; Treutwein y Strasburger, *Percept. Psychophys.* (1999) 61:87-106), tal como se describió en detalle previamente (Milligan *et al.*, *Brain Res.* (2000) 861:105-116). Este método de ajuste permite análisis estadísticos paramétricos (Milligan *et al.*, *Brain Res.* (2000) 861:105-116).

30 *Prueba de Hargreaves.* Se evaluaron los umbrales para la respuesta de comportamiento a estímulos térmicos aplicados a cada zarpa trasera usando la prueba de Hargreaves (Hargreaves *et al.*, *Pain* (1998) 32:77-88), tal como se describió previamente (Milligan *et al.*, *Brain Res.* (2000) 861:105-116). En resumen, se calcularon los valores de retirada de la zarpa de nivel inicial (BL) a partir de un promedio de 3-6 latencias de retirada consecutivas de las zarpas traseras tanto derecha como izquierda durante un periodo de 1 h. Se ajustó el voltaje a la fuente de calor para producir latencias de BL que oscilaban entre 8-12 s y se impuso un tiempo de corte de 20 s para evitar daño tisular. Este procedimiento iba seguido por inyecciones intratecales y un transcurso temporal de evaluaciones de comportamiento tras el fármaco, tal como se describe a continuación. Las pruebas de comportamiento se realizaron ciegas con respecto a la administración de fármaco. El orden de pruebas de las zarpas varió al azar.

Cirugía y microinyecciones

40 *Lesión por constricción crónica (CCI).* Se creó una CCI al nivel del muslo medio de la pata trasera izquierda tal como se describió previamente (Bennett y Xie, *Pain* (1988) 33:87-107). Se ataron sin apretar cuatro suturas de intestino crómico quirúrgico estériles, absorbibles (cuticular 4-0, intestino crómico, 27", FS-2 cortante; Eticon, Somerville, NJ) alrededor del nervio ciático aislado de manera suave bajo anestesia con isoflurano (Phoenix Pharm., St. Joseph, MO). Los nervios ciáticos de ratas operadas de manera simulada se expusieron de manera idéntica pero no se ligaron. Se verificaron las colocaciones de las suturas en el sacrificio mediante inspección visual. Solo se analizaron datos de sitios confirmados.

50 *Microinyección intratecal de plásmido de VAA en la médula espinal lumbosacra.* Se empleó un método de aplicación con catéter agudo bajo anestesia con isoflurano breve (al 2 % en volumen en oxígeno). En este caso, se marcó un catéter de PE-10 de 25 cm, unido a una aguja estéril de calibre 30, de 0,5 pulgadas acoplada a una jeringa Hamilton de vidrio de 50 µl, con tinta permanente negra a 7,7-7,8 cm desde el extremo abierto y se colocó en un recipiente estéril, seco hasta el momento de la inyección. Se anestesiaron las ratas ligeramente, se afeitó la zona pélvica dorsal inferior y se limpió ligeramente con alcohol al 70 %. Se insertó una aguja estéril de calibre 18 con el centro de plástico retirado entre las vértebras lumbares L5 y L6. Se insertó el extremo abierto del catéter de PE-10 en la aguja de calibre 18 y se enroscó hasta la marca de 7,7 cm permitiendo la colocación de la punta del catéter de PE-10 intratecal al nivel de la intumescencia lumbosacra. Se inyectaron los plásmidos con un lavado de solución salina isotónica estéril al 0,9 % previo y posterior de 1 µl durante 1 min. Se retiró inmediatamente el catéter de PE-10 y se retiró la aguja de calibre 18 del espacio intervertebral L5-L6. Este método de inyección agudo tardó 2-3 min en completarse, y las ratas mostraron recuperación completa de la anestesia en el plazo de 10 min. No se observó comportamiento motor anómalo en el 100 % de las inyecciones.

Análisis de datos

65 Se calcularon todas las comparaciones estadísticas usando el programa Statview 5.0.1 para Macintosh. Se analizaron los datos de la prueba de von Frey como el umbral del 50 % interpolado (umbral absoluto) en log en base 10 de la intensidad de estímulo (rigidez de monofilamentos × 10). Las medidas de nivel inicial para las pruebas tanto

de von Frey como de Hargreaves, y los efectos de respuesta a la dosis, se analizaron mediante ANOVA de una vía. Se analizaron las medidas de transcurso temporal para cada prueba de comportamiento mediante ANOVA de medidas repetidas seguido por comparaciones a posteriori de diferencias significativas mínimas protegidas de Fisher, cuando sea apropiado.

5

Ejemplo 1

Reversión del dolor neuropático por lesión por constricción crónica (CCI) con ADN de plásmido inyectado por vía intratecal que codifica IL-10

10

Con el fin de determinar si el efecto de IL-10 podría estar provocado por el suministro usando un vector no viral (VNV), se realizó el siguiente experimento. Se inyectaron 100 µg de ADN de plásmido (“desnudo”) (ADNp) que codifica o bien IL-10 de rata o bien GFP (como control) por vía intratecal 10 días, 15 días (cinco días después de la primera inyección), 24 días (nueve días después de la segunda inyección) y 67 días (43 días después de la tercera inyección) más tarde. Tal como se muestra en la figura 1, la primera inyección revirtió completamente pero solo brevemente el dolor patológico en las ratas. La segunda inyección, administrada tras regresar al nivel inicial, revirtió de nuevo completamente el dolor, pero durante un tiempo más prolongado. La tercera inyección, administrada tras regresar al nivel inicial, revirtió de nuevo completamente el dolor pero durante un periodo de tiempo incluso más prolongado. Notablemente, la cuarta inyección, administrada tras restablecerse completamente la alodinia durante seis días (días 38-43 en la figura 1), revirtió de nuevo completamente el dolor. El plásmido de control no tuvo efecto en las ratas con CCI u operadas de manera simulada. Dado que dosis iguales del plásmido de GFP de control no tenían efecto sobre la CCI, los resultados parecen específicos para IL-10.

15

20

25

Estos datos plantean la cuestión de lo que podría suceder si el intervalo entre inyecciones para administraciones de plásmidos sucesivas se acortara adicionalmente. Por tanto, se inyectaron 100 µg de ADNp que codifica IL-10 de rata por vía intratecal 10 días tras la alodinia mecánica inducida por CCI (día 10). Esto indujo reversión completa de la alodinia hacia el día 12 (figura 2). Se administró una segunda inyección intratecal de 100 µg del plásmido el día 13, mientras que la potenciación del dolor por CCI permanecía completamente revertida, en contraposición al experimento mostrado en la figura 1 y descrito anteriormente en donde la segunda inyección de plásmido se administró tras haberse vuelto a producir la alodinia. Tal como se muestra en la figura 2, cuando la segunda inyección de plásmido se administró mientras que la potenciación del dolor por CCI permanecía completamente revertida, la eficacia de la segunda inyección se potenció notablemente.

30

35

Como control adicional, se cortaron enzimáticamente los plásmidos de control de GFP y de IL-10 para linealizarlos. Se sabe que los plásmidos linealizados son mucho más susceptibles a la degradación enzimática y muestran poca a ninguna actividad. Tal como se esperaba, una dosis igual de plásmido linealizado no tuvo efecto sobre CCI (figura 3).

40

Ejemplo 2

40

FcIL-10 potencia la eficacia de la terapia génica

El presente experimento ilustra la eficacia terapéutica de IL-10 suministrada de manera estrecha en el tiempo con un vector de terapia génica. Tras las pruebas de nivel inicial (BL), las ratas recibieron cirugía de CCI. Volvieron a someterse a prueba 3 y 10 días después para verificar que la CCI indujo dolor neuropático profundo (figura 4). Tras la prueba del día 10, se les inyectó a las ratas por vía i.t. un plásmido de control que no codificaba IL-10; en vez de eso, codificaba una proteína intracelular inerte (GFP). Puede observarse que la presencia de ADN de plásmido inerte no afectó a los comportamientos sometidos a prueba los días posteriores. Tras la prueba del día 13, se les inyectó a las ratas o bien: (a) solo plásmido que codifica IL-10 o bien (b) una cantidad igual de plásmido que codifica IL-10 más una variante estabilizada de IL-10 (FcIL-10) para someter a prueba si la presencia de FcIL-10 potenciaría la eficacia del vector. De hecho lo hizo. Se revirtió la alodinia mecánica mediante IL-10 de plásmido solo durante aproximadamente 4 días (véase el efecto de la primera inyección de IL-10 de plásmido mostrada en la figura 1). En cambio, el tratamiento conjunto con FcIL-10 potenció notablemente el comienzo y la duración de la eficacia de IL10 de plásmido sobre la alodinia mecánica.

55

Ejemplo 3

Eficacia de dosis inferiores y combinaciones de dosis de terapia génica con IL-10 de plásmido

60

Tras las pruebas de nivel inicial (BL), las ratas recibieron cirugía de CCI. Volvieron a someterse a prueba 3 y 10 días después para verificar que la CCI indujo dolor neuropático profundo en la prueba de von Frey (alodinia mecánica). Entonces se les inyectaron a las ratas o bien: (a) 100 µg de plásmido que codifica IL-10 (día 10) seguido por 50 µg de plásmido que codifica IL-10 (día 13) (figura 5A); (b) 100 µg de plásmido que codifica IL-10 (día 10) seguido por 25 µg de plásmido que codifica IL-10 (día 13) (figura 5B); o bien (c) 50 µg de plásmido que codifica IL-10 (día 10) seguido por 50 µg de plásmido que codifica IL-10 (día 13) (figura 5C). Tal como se muestra en las figuras, cada una

65

condujo a reversión de la alodinia mecánica a lo largo del tiempo.

Ejemplo 4

5 El efecto de ITR de VAA sobre la reversión del dolor neuropático por CCI usando ADN de plásmido inyectado por vía intratecal que codifica IL-10

10 Con el fin de determinar el efecto de ITR de VAA sobre la eficacia del suministro de plásmidos de IL-10, se realizan experimentos de manera análoga a los descritos en el ejemplo 1. En resumen, se usan ratas Sprague-Dawley macho adultas libres de patógenos (300-400 g) (Harlan Labs) en los experimentos. Se realiza la CCI atando cuatro ligaduras sin apretar de intestino de vaca crómico alrededor del nervio ciático de la rata. Se realiza cirugía simulada en las otras ratas, y es similar a la cirugía de CCI excepto porque no se colocan ligaduras alrededor del nervio ciático. Se consigue la inyección intratecal de plásmidos (ADNp) usando punciones lumbares agudas. Se inserta temporalmente un catéter de inyección bajo anestesia con isoflurano breve (al 1-2 % en oxígeno). Se hace avanzar un catéter de PE-10 a través de una aguja de calibre 18 hasta el extremo al nivel de la intumescencia lumbosacra. Se retira inmediatamente el catéter de PE-10 tras la inyección de ADNp.

20 Una consecuencia del dolor neuropático es que los estímulos que no son normalmente dolorosos se vuelven dolorosos. Un aumento drástico en la sensibilidad al contacto ligero puede cuantificarse registrando las respuestas de retirada de las zarpas posteriores a partir de fibras de von Frey calibradas de rigidez variable. Una rata que no está experimentando dolor neuropático responde a un estímulo >5 gramos, mientras que una rata que está experimentando dolor neuropático responde a un estímulo de <1,5 gramos.

25 Los resultados de varios experimentos se presentan en las figuras 6-9. En las figuras 6, 8 y 9, se suministra ADN de plásmido mediante inyecciones intratecales a los 10 y 13 días tras la lesión por constricción crónica de las ratas, con 100 µg administrados el día 10 y 25 µg el día 13.

30 Los datos presentados en la figura 6 demuestran que inyecciones intratecales (es decir, inyecciones en el líquido cefalorraquídeo que rodea a la médula espinal) de ADN de plásmido que codifica IL-10 (pIL-10) y dos ITR de VAA-2 (una en el sentido de 5' y una en el sentido de 3' del transgén de IL-10) da como resultado una reversión del dolor sostenida en ratas con lesión por constricción crónica (CCI). En pIL-10, las ITR de VAA-2 están ubicadas en 5' del potenciador de CMV y el promotor de β-actina de pollo (ITR en 5') y en 3' de la secuencia de cola de poli A de SV40 (ITR en 3'). Experimentos de control muestran que pIL-10 no cambia la respuesta al dolor normal en ratas sin CCI, y que la alodinia persiste a lo largo de todo el transcurso del experimento cuando no se administra pIL-10.

35 Los datos presentados en la figura 7 demuestran que un pIL-10 es capaz de dirigir la expresión génica en células HEK 293 *in vitro* independientemente de la presencia o ausencia de ITR de VAA-2. Tomados en combinación con los datos de las figuras 6, 8 y 9, estos datos demuestran que la expresión *in vitro* de transgenes a partir de plásmidos que contienen 0, 1 (o bien en el sentido de 5' o bien en el sentido de 3') o 2 ITR de VAA-2 no se correlacionan con la eficacia *in vivo*.

40 Los datos presentados en la figura 8 muestran que inyecciones intratecales de pIL-10 pero que carecen de ITR no dan como resultado reversión del dolor en ratas con CCI, mientras que inyecciones intratecales de pIL-10 dan como resultado reversión del dolor durante más de 70 días.

45 Los datos presentados en la figura 9 muestran que ADN de plásmido que codifica dos ITR de VAA-2 y plásmidos que codifican una única ITR (o bien en el sentido de 5' o bien en el sentido de 3' del transgén de IL-10) son eficaces en la reversión del dolor durante al menos 70 días, mientras que plásmidos similares que carecen de ITR no revierten el dolor.

50 Tomados conjuntamente, los resultados presentados en las figuras 6-9 muestran que aunque los plásmidos que carecen de ITR de VAA pueden dirigir la expresión de IL-10 en células HEK 293 *in vitro*, se requiere al menos una ITR de VAA para lograr la reversión sostenida de la alodinia en una rata con CCI *in vivo*, y que la reversión de la alodinia por plásmidos con una única ITR de VAA es eficaz si la ITR está en 5' o en 3' del gen de IL-10.

55 Estos sorprendentes resultados muestran que una única ITR de VAA, en la ubicación o bien en 5' o bien en 3', es necesaria y suficiente para producir vectores de expresión de IL-10 capaces de producir reversión del dolor. Al intentar explicar este sorprendente resultado, y sin pretender estar limitado por la teoría, se observa que informes publicados sugieren que las ITR de VAA pueden tener actividad promotora y potenciadora de la transcripción. Flotte *et al.* (1992) *Am J Respir Cell Mol Biol.* 7:349-56; Flotte *et al.* (1993) *J Biol Chem.* 268: 3781-90.

60 Aunque se han descrito realizaciones preferidas de la invención sujeto en algún detalle, se entiende que pueden hacerse algunas variaciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en el presente documento.

65

Lista de secuencias

<110> Watkins, Linda May Rothblum
 <110> Travis Hughes
 <110> Raymond A. Chavez

5 <120> MÉTODOS PARA SUMINISTRAR GENES

<130> 0800-0059.40

<150> 60/686.324

10 <151> 31-05-2005

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.2

15

<210> 1

<211> 160

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 1

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
 1 5 10 15

Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
 20 25 30

Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
 35 40 45

Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
 50 55 60

Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
 85 90 95

Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
 100 105 110

Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
 115 120 125

Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
 130 135 140

Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
 145 150 155 160

25 <210> 2

<211> 160

<212> PRT

ES 2 696 824 T3

<213> Artificial

<220>

<223> IL-10 de ratón (mIL-10)

5

<400> 2

Ser Arg Gly Gln Tyr Ser Arg Glu Asp Asn Asn Cys Thr His Phe Pro
1 5 10 15

Val Gly Gln Ser His Met Leu Leu Glu Leu Arg Thr Ala Phe Ser Gln
20 25 30

Val Lys Thr Phe Phe Gln Thr Lys Asp Gln Leu Asp Asn Ile Leu Leu
35 40 45

Thr Asp Ser Leu Met Gln Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
50 55 60

Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Val Glu Val Met Pro Gln Ala
65 70 75 80

Glu Lys His Gly Pro Glu Ile Lys Glu His Leu Asn Ser Leu Gly Glu
85 90 95

Lys Leu Lys Thr Leu Arg Met Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
100 105 110

Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Ser Asp Phe
115 120 125

Asn Lys Leu Gln Asp Gln Gly Val Tyr Lys Ala Met Asn Glu Phe Asp
130 135 140

Ile Phe Ile Asn Cys Ile Glu Ala Tyr Met Met Ile Lys Met Lys Ser
145 150 155 160

10

<210> 3

<211> 145

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Forma viral de IL-10 (vIL-10)

<400> 3

Gln Cys Asp Asn Phe Pro Gln Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Tyr o Phe
5
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Met, Ile, Leu o Val
10
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Met, Ile, Leu o Val
15
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = Met, Ile, Leu o Val
20
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa = Asp, Gln o Gly
25
<400> 5
Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Lys Xaa Arg Xaa
1 5

1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de ADN de plásmido que comprende un polinucleótido que codifica al menos una repetición terminal invertida (ITR) de virus adenoasociado (VAA) y que codifica también una molécula de IL-10 operativamente unidas a elementos de control de la expresión que controlan la expresión de dicha molécula de IL-10 *in vivo*, para su uso en el tratamiento de dolor neuropático en un sujeto mamífero, en la que dicha molécula de ADN de plásmido se administra por vía intratecal al sistema nervioso central de dicho sujeto.
- 10 2. Molécula de ADN de plásmido para su uso según la reivindicación 1, en la que el polinucleótido codifica dos ITR de VAA.
- 15 3. Molécula de ADN de plásmido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la molécula de ADN de plásmido está adaptada para su administración usando suministro mediado por liposomas.
- 20 4. Composición que comprende la molécula de ADN de plásmido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o sustancias auxiliares.
- 25 5. Composición según la reivindicación 4, en la que el excipiente puede seleccionarse del grupo que comprende un sorbitol, un compuesto de TWEEN, agua, solución salina, glicerol o etanol; en la que la sal farmacéuticamente aceptable puede seleccionarse del grupo que comprende sales de ácido mineral, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos; y en la que la sustancia auxiliar se selecciona del grupo que comprende agentes humectantes o emulsionantes y sustancias de tamponamiento del pH.
- 30 6. Composición según la reivindicación 4 o 5, en la que el excipiente comprende una sal de ácido mineral.
7. Composición según la reivindicación 6, en la que la sal de ácido mineral es un fosfato.
8. Composición según la reivindicación 4 o 5, en la que el excipiente comprende la sal de un ácido orgánico.

Figura 1

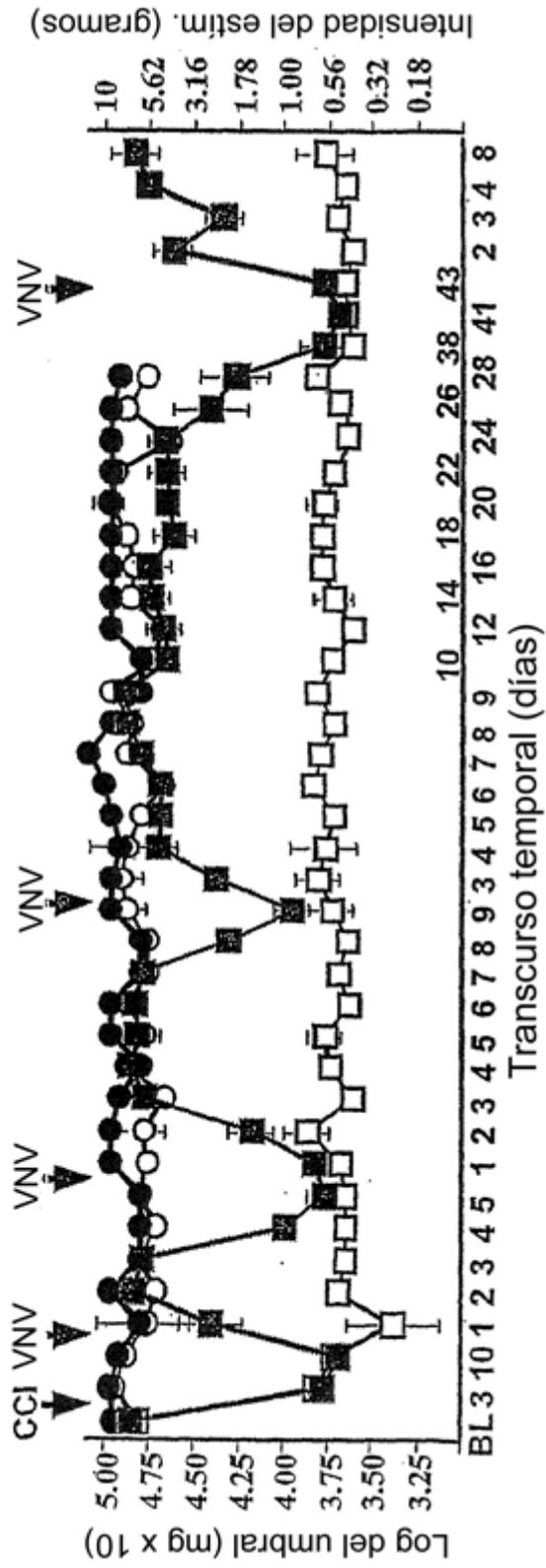
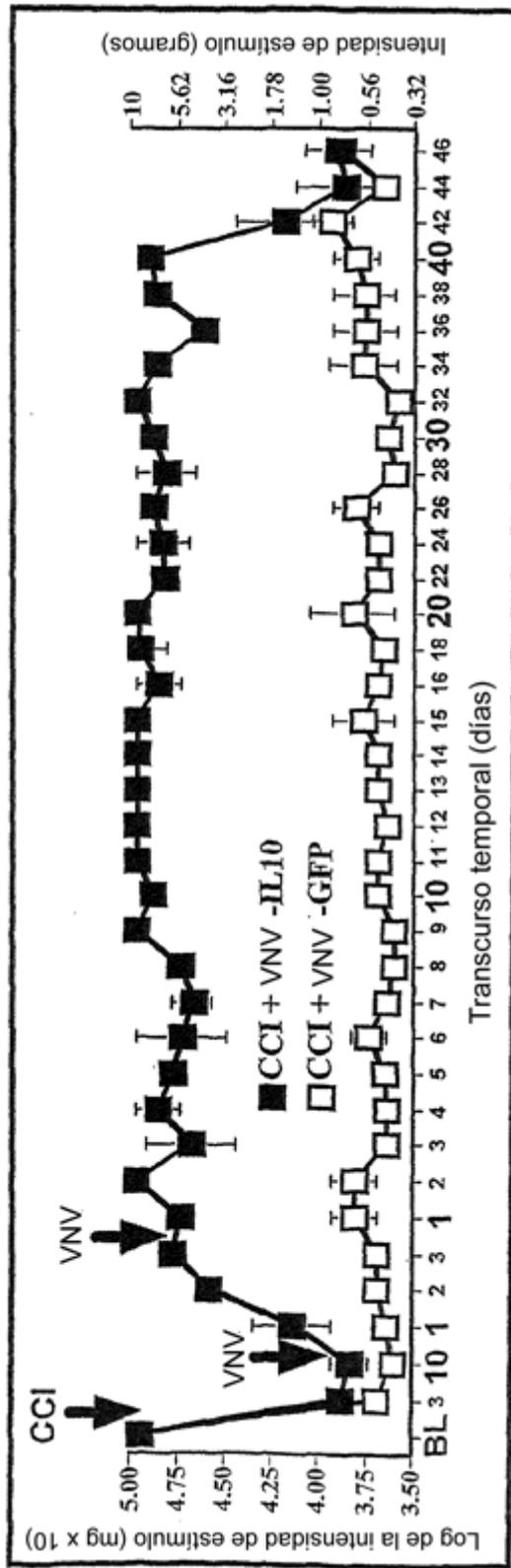


Figura 2



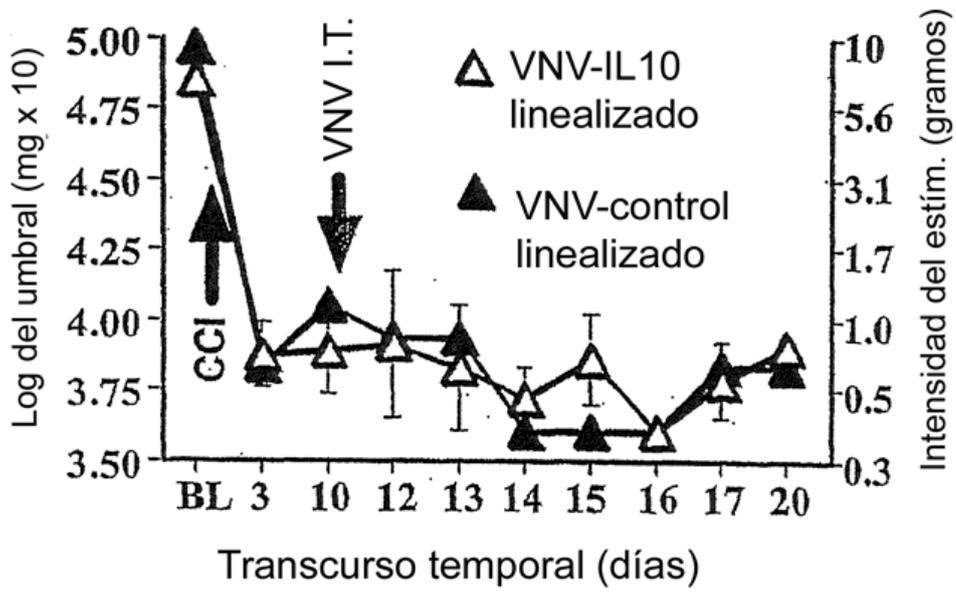
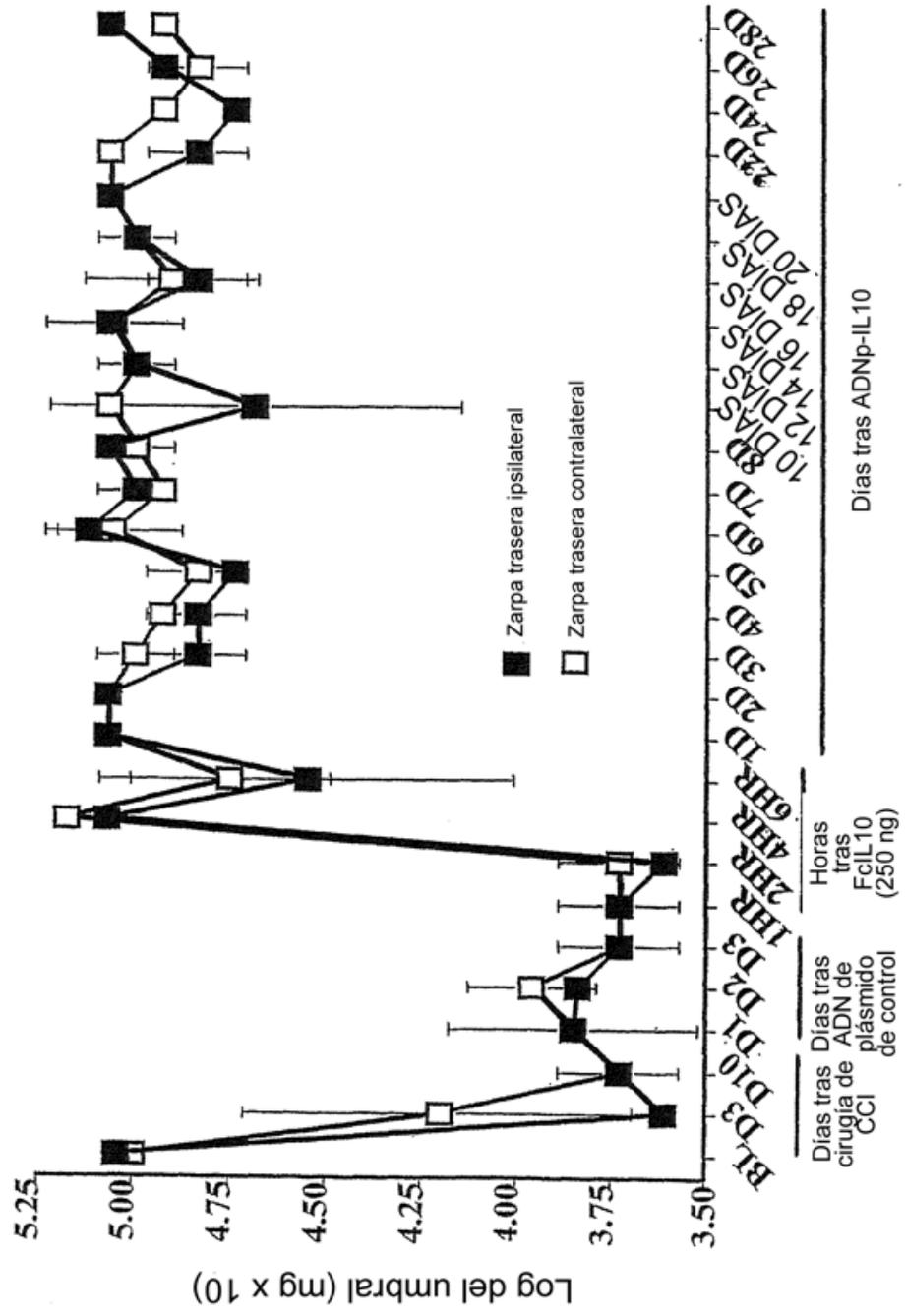


Figura 3

Figura 4



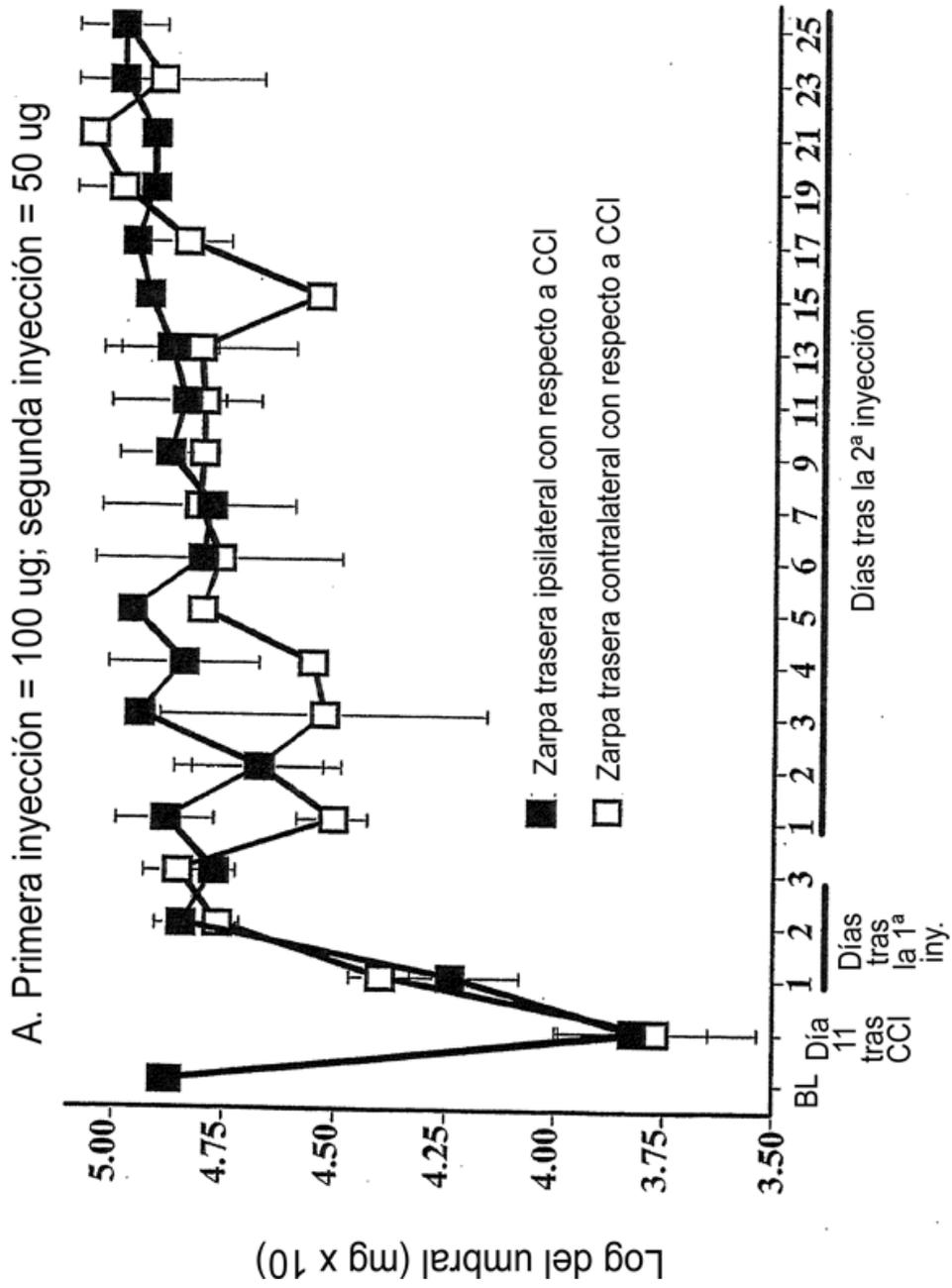


Figura 5A

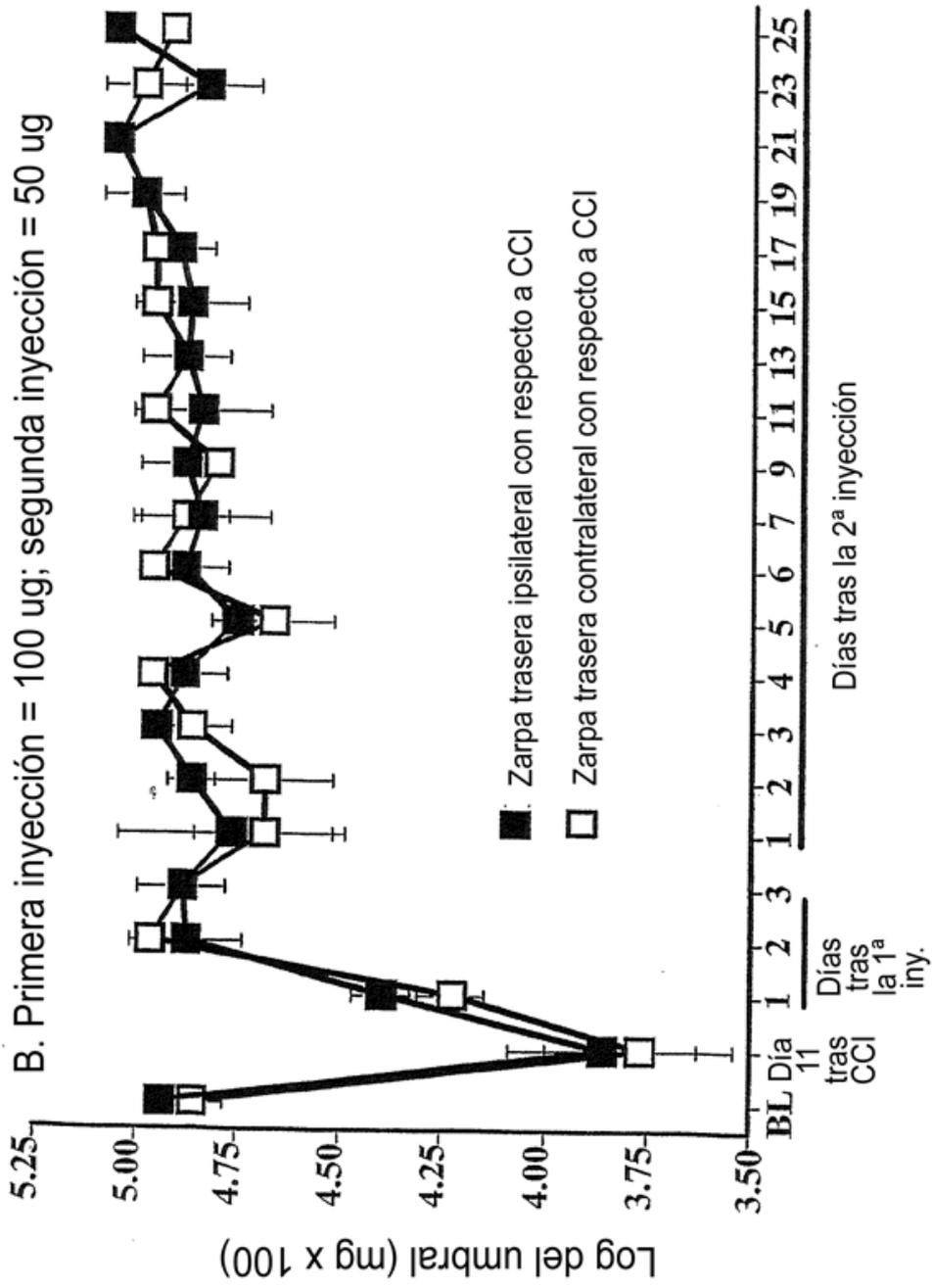


Figura 5B

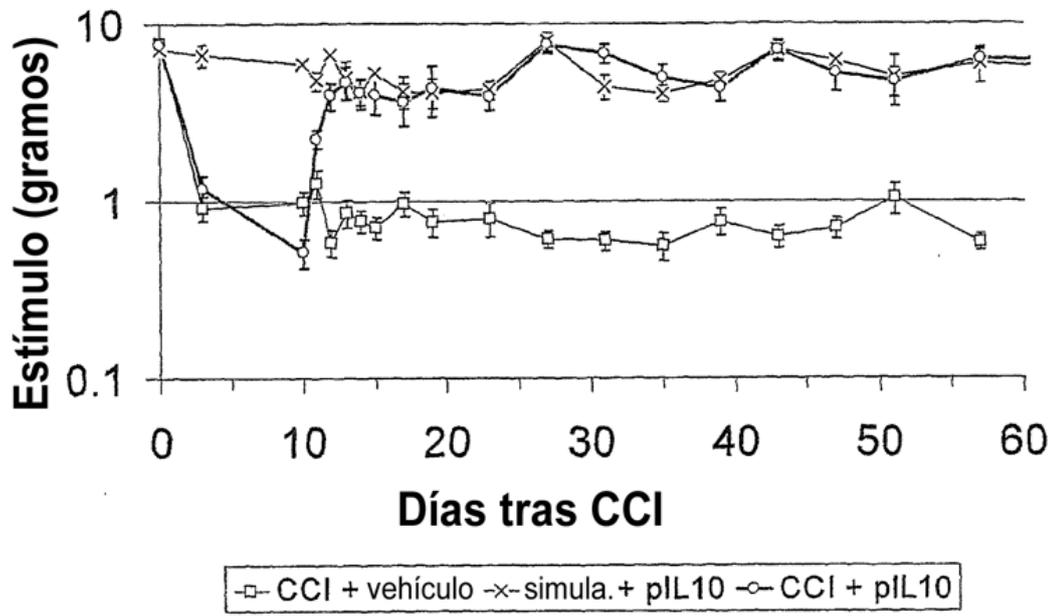


Figura 6

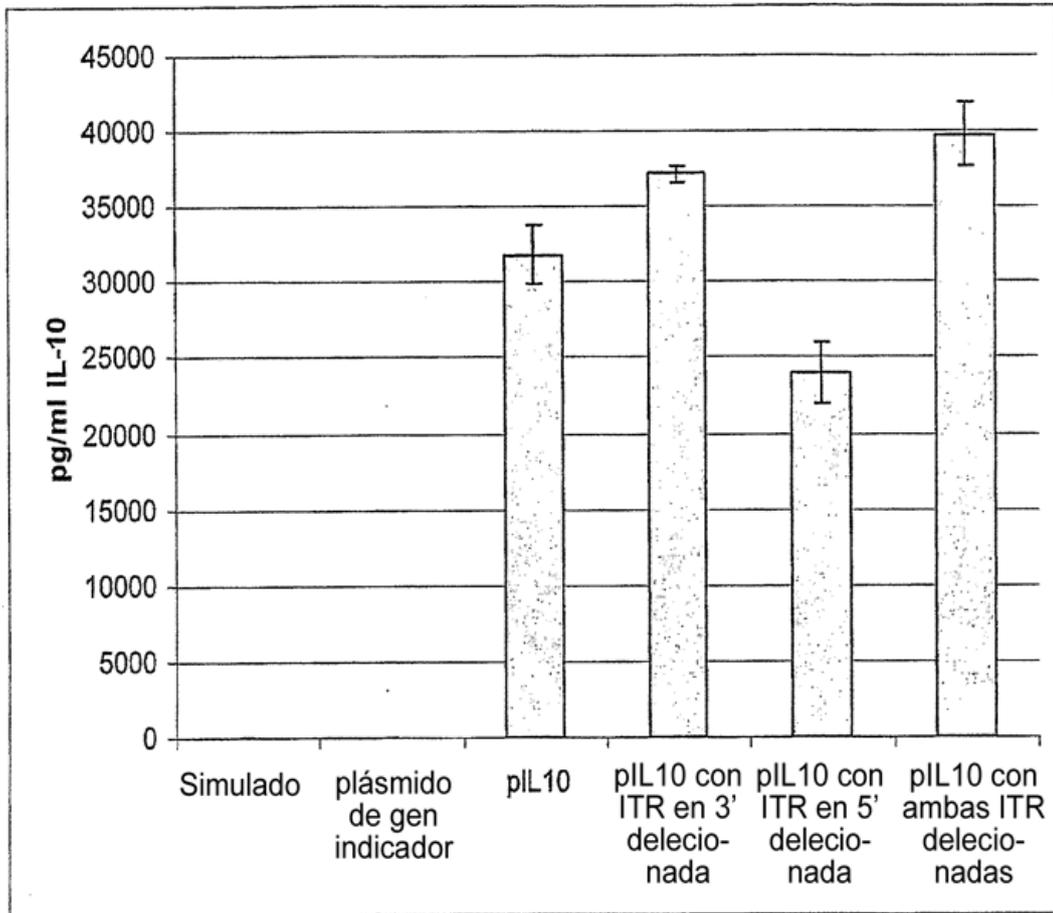


Figura 7

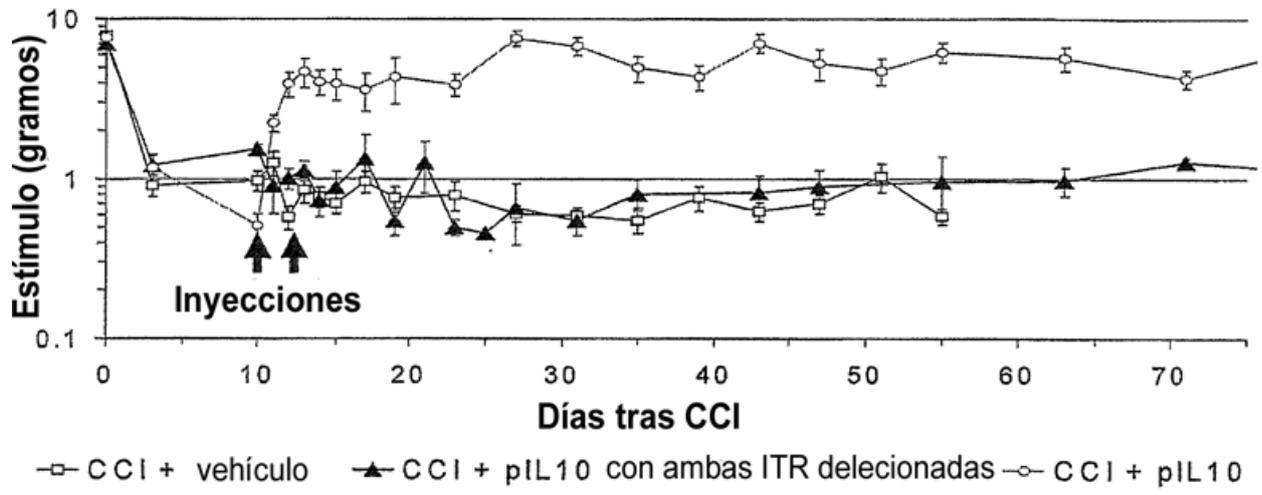


Figura 8

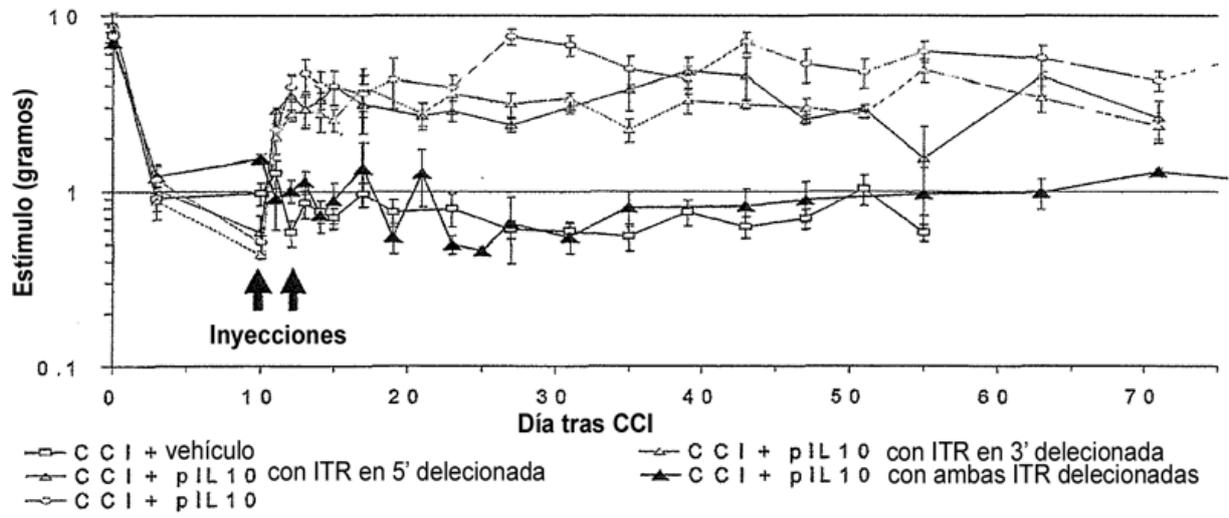


Figura 9

```

hIL-10  SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVK
mIL-10  SRGQYSREDNNCTHFVVGQSHMLLELRTAFSQVK
vIL-10  -----QCDFP-----QMLRDLRDAFSRVK
      1          10          20          30

TFFQMKDQLDNL LLKESLLED FKG YLGCQALSEMI
TFFQT KDQLDN ILL TD SL MQDFKGYLGCQALSEMI
TFFQT KD EVDNLLKESLLED FKG YLGCQALSEMI
      40          50          60

QFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENL KTLRLR
QFYL VEVMPQAEKHGPEIK EHLNSLGEK LKTLRMR
QFYLEEVMPQAENQDPEAKD HVNSLGENL KTLRLR
      70          80          90          100

LRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKA
LRRCHRFLPCENKSKAVEQVKSDFNKLQDQGVYKA
LRRCHRFLPCENKSKAVEQIKNAFNKLQEKGIYKA
      110          120          130

MSEFDIFIN YIEAYMTMKIRN
MNEFDIFIN CIEAYM MIK MKS
MSEFDIFIN YIEAYMT IKA R
      140          150          160

```

Figura 10