(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 450 065**

(51) Int. Cl.:

A01N 43/04 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2007** **E 07752090 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013** **EP 1993590**

(54) Título: **Composiciones y métodos para la administración de proteínas de la familia de ligandos del GDNF**

(30) Prioridad:

01.03.2006 US 778509 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2014

(73) Titular/es:

BIOGEN IDEC MA INC. (100.0%)
14 CAMBRIDGE CENTER
CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02142, US

(72) Inventor/es:

ROSSOMANDO, ANTHONY y
PEPINSKY, R. BLAKE

(74) Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 450 065 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

Composiciones y métodos para la administración de proteínas de la familia de ligandos del GDNF

Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a química de proteína, biología molecular y neurobiología.

Antecedentes

[0002] El factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF, por sus siglas en inglés) se identificó inicialmente como un factor crítico para la supervivencia de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo. El patrón de los siete restos de cisteína dentro de su secuencia de aminoácidos estaba en consonancia con el del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta, por sus siglas en inglés), lo que indica que el GDNF (y proteínas relacionadas) puede considerarse como una subclase de esta "superfamilia" (Lin *et al.*, 1993, Science, 260: 1130). Después de la caracterización del GDNF se realizó la identificación de los factores de crecimiento relacionados, Neurturina (Kotzbauer *et al.*, 1996, Nature, 384: 467), Persefina (Milbrandt *et al.*, Neuron, 20: 245) y Neublastina (conocida también como Artemina y Enovina) (Baloh *et al.*, 1998, Neuron, 21: 1291; Masure *et al.*, 1999, Eur J Biochem, 266: 892), que en conjunto comprenden la familia de factores neurotróficos de ligandos del GDNF

[0003] Estudios en ratones con GDNF desactivado (*knock-out*) sugieren que el GDNF realiza una función principal en el desarrollo del sistema nervioso entérico y la regulación de la organogénesis renal (Moore *et al.*, 1996, Nature, 382: 76). La Neurturina se caracterizó primero en estudios cuyo objeto era examinar factores de crecimiento recombinantes expresados en células de ovario de hámster Chino (CHO, por sus siglas en inglés) transfectadas cuando se descubrió que uno de estos factores potenciaba la supervivencia de neuronas simpáticas cultivadas a partir de ganglios cervicales superiores de ratones neonatales incluso en presencia de antisuero contra NGF (Kotzbauer *et al.*, citado anteriormente). Estudios de clonación de expresión conducen a la caracterización de la Persefina que, al igual que GDNF, promueven la supervivencia de neuronas motoras cultivadas y de neuronas dopaminérgicas del cerebro central y promueven la regeneración de neuronas motoras axotomizadas en ratas neonatales (Milbrandt *et al.*, citado anteriormente). El miembro de la familia de ligandos del GDNF descubierto más recientemente es Neublastina, que promueve el crecimiento y supervivencia de neuronas del sistema nervioso central y periférico (Baudet *et al.*, 2000, Development, 127: 4335; Masure *et al.*, citado anteriormente; Rosenblad *et al.*, 2000, Mol. Cell Neurosci., 15(2): 199).

[0004] Todos los miembros de la familia de ligandos del GDNF actúan a través de sistemas receptores complejos ternarios que contienen la tirosina quinasa receptora RET como un componente de señalización normal (Baloh *et al.*, 1998, Neuron, 21: 1291; Mason, *et al.*, 2000, Pharm Acta Helv, 74: 261; Masure *et al.*, 2000, J Biol Chem, 275: 39427). La especificidad se confiere por la unión de los ligandos a un solo receptor de la familia GDNF alfa (GFRalfa). Los receptores GFRalfa1 a GFRalfa4 son proteínas ancladas de glucosil-fosfatidil inositol (GPI) que, cuando se unen al ligando de GDNF preferido, activan RET. GDNF se une preferencialmente a GFR alfa 1, Neurturina a GFR alfa 2, Neublastina a GFR alfa 3 y Persefina a GFR alfa 4.

Sumario

[0005] La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la coadministración de heparina con una proteína de la familia de ligandos del GDNF administrada sistémicamente (Neublastina) aumenta la exposición en suero de la proteína administrada.

[0006] Se divulgan métodos para aumentar la exposición en suero de una proteína de la familia de ligandos del GDNF administrando a un sujeto mediante administración sistémica una composición farmacéutica que contiene (i) una proteína de la familia de ligandos del GDNF, y (ii) una cantidad de heparina o sulfato de heparán que aumenta la exposición en suero de la proteína de la familia de ligandos del GDNF administrada en el sujeto.

[0007] Como se usa en el presente documento, una "proteína de la familia de ligandos del GDNF" se refiere a un polipéptido de Neublastina, un polipéptido de GDNF, un polipéptido de Neurturina, o un polipéptido de Persefina.

[0008] Como se usa en el presente documento, "una cantidad de heparina o sulfato de heparán que aumenta la exposición en suero de la proteína de la familia de ligandos del GDNF administrada" se refiere a una cantidad que da como resultado niveles en suero de la proteína después de administración que supera los niveles en suero que resultan cuando la proteína de la familia de ligando del GDNF se administra, mediante la misma vía de administración en ausencia de heparina o sulfato de heparán.

[0009] La "administración sistémica" se refiere a una vía de administración que da como resultado que la proteína administrada se desplaza a través de la corriente sanguínea y alcanza células a lo largo del organismo. La administración sistémica no abarca medios localizados de administración tal como administración intracerebral,

administración intraventricular, o administración intracerebroventricular.

[0010] La invención se refiere a usos para el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso administrando a un sujeto que tiene un trastorno en el sistema nervioso, mediante administración sistémica, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que contiene (i) una proteína de la familia de ligandos del GNDF y (ii) una cantidad de heparina o sulfato de heparán que aumenta la exposición en suero de la proteína de la familia de ligandos del GDNF administrada en el sujeto. El trastorno del sistema nervioso puede ser, por ejemplo, dolor neuropático o pérdida de sensibilidad al dolor asociada con una neuropatía. Ejemplos adicionales de trastornos del sistema nervioso que pueden tratarse de acuerdo con los métodos se detallan a continuación.

[0011] En algunas realizaciones de los usos descritos en el presente documento, la administración sistémica es administración intravenosa. En algunas realizaciones, la administración sistémica es administración subcutánea.

[0012] En algunas realizaciones de los usos descritos en el presente documento, la proteína de la familia de ligandos del GDNF es un polipéptido de Neublastina. El polipéptido Neublastina puede, por ejemplo, contener una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80% con los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº: 1, en el que, cuando el polipéptido se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFRalfa3 y RET. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 90%, 95% o 98% con los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 90%, 95% o 98% con la SEC ID Nº: 1. En algunas realizaciones, el polipéptido Neublastina contiene o consiste en los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº: 1, los aminoácidos 10-113 de la SEC ID Nº: 1 o la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 1.

[0013] En algunas realizaciones de los usos descritos en el presente documento, la proteína de la familia de ligandos del GDNF es un polipéptido de GDNF. El polipéptido de GDNF puede, por ejemplo, contener una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80% con la SEC ID Nº: 2, en el que cuando el polipéptido se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFRalfa1 y RET. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 90%, 95% o 98% con la SEC ID Nº: 2. En algunas realizaciones, el polipéptido de GDNF contiene o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 2.

[0014] En algunas realizaciones de los usos descritos en el presente documento, la proteína de la familia de ligandos de GDNF es un polipéptido de Neurturina. El polipéptido de Neurturina puede, por ejemplo, contener una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80% con la SEC ID Nº: 3, en el que cuando el polipéptido se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFRalfa2 y RET. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 90%, 95% o 98% con la SEC ID Nº: 3. En algunas realizaciones, el polipéptido de Neurturina contiene o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 3.

[0015] En algunas realizaciones de los usos descritos en el presente documento, la proteína de la familia de ligandos de GDNF es un polipéptido de Persefina. El polipéptido de Persefina puede, por ejemplo, contener la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80% con la SEC ID Nº: 4, en el que cuando el polipéptido se dimeriza, se une a un complejo que contiene GFRalfa4 y RET. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 90%, 95% o 98% con la SEC ID Nº: 4. En algunas realizaciones, el polipéptido de Persefina contiene o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4.

[0016] En algunas realizaciones de los usos descritos en el presente documento, la proteína de la familia de ligandos del GDNF no está conjugada con un polímero (por ejemplo, un polialquilenglicol tal como polietilenglicol). Por ejemplo, el polipéptido de Neublastina puede ser un polipéptido de Neublastina conjugado no polimérico.

[0017] A menos que se defina de otra manera, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la realización práctica o en el ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales ejemplares. En caso de conflicto, la presente solicitud, incluyendo definiciones, se controlarán.

[0018] Otras características y ventajas de la invención serán obvias a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

[0019]

La Figura 1 es un alineamiento de los polipéptido de pre pro Neublastina de tipo silvestre de ser humano (SEC ID Nº: 5), de ratón (SEC ID Nº: 6) y de rata (SEC ID Nº: 7). Las líneas verticales a la derecha y a la izquierda indican, respectivamente, el inicio de las formas de 113 aminoácidos y de 104 aminoácidos. El motivo de unión

a heparina RRXR se indica en un recuadro.

La Figura 2 es un alineamiento de polipéptido pre pro GDNF de tipo silvestre de ser humano (SEC ID Nº: 8), de ratón (SEC ID Nº: 9) y rata (SEC ID Nº: 10). La secuencia de aminoácidos en el inicio de la forma madura de la proteína se indica en negrita y subrayada.

La Figura 3 es un alineamiento de los polipéptidos pre pro Neurturina de tipo silvestre de ser humano (SEC ID Nº: 11), de ratón (SEC ID Nº: 12) y rata (SEC ID Nº: 13). El resto de aminoácido en el inicio de la forma madura de la proteína se indican en negrita y subrayado.

La Figura 4 es un alineamiento de los polipéptidos pre pro Persefina de tipo silvestre de ser humano (SEC ID Nº: 14), de ratón (SEC ID Nº: 15) y rata (SEC ID Nº: 16). El resto de aminoácido en el inicio de la forma madura de la proteína se indica en negrita y subrayado.

Descripción detallada

[0020] La familia de proteínas de ligandos del GDNF contiene los siguientes miembros: Neublastina, GDNF, Neurturina y Persefina. La presente invención proporciona métodos para aumentar la exposición en suero de una proteína de la familia de ligandos de GDNF administrada sistémicamente (o una variante de la misma biológicamente activa) mediante coadministración de heparina o sulfato de heparán con la proteína. Como se describe en el ejemplo adjunto, la coadministración de heparina con Neublastina se encontró que aumentaba el área bajo la curva y potenciaba la semivida de la proteína administrada sistémicamente.

Polipéptidos de Neublastina

[0021] La Neublastina humana de tipo silvestre madura tiene una longitud de 113 aminoácidos y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: AGGPGSRARAAGARGCRLRS QLVPVRALGLG HRSDELVRFRFCSGS CRRARSPHDLSLAS LLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTR YEAVSFMDVNSTWRTVDRL SATACGCLG (SEC ID Nº: 1). Los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 1 o variantes biológicamente activas de las mismas pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento. Un polipéptido de Neublastina variante puede contener una o más adiciones, sustituciones y/o deleciones, como se detalla en las siguientes secciones. Los polipéptidos de Neublastina de tipo silvestre y variantes de los mismos biológicamente activas se denominan en su conjunto en el presente documento “polipéptidos de Neublastina”.

[0022] Un polipéptido de Neublastina variante puede variar en longitud con respecto al polipéptido de tipo silvestre correspondiente. Aunque el polipéptido de Neublastina humana maduro (SEC ID Nº: 1) consiste en los 113 aminoácidos carboxiterminales de la pre pro Neublastina (SEC ID Nº: 5), no todos los 113 aminoácidos se requieren para conseguir una actividad biológica útil de Neublastina. Se permite el truncamiento aminoterminal. Por tanto, un polipéptido de Neublastina variante puede contener, por ejemplo, los aminoácidos 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 o 113 carboxiterminales de la SEC ID Nº: 1 (es decir su longitud puede ser de 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 o 113 aminoácidos).

[0023] Un polipéptido de Neublastina variante también puede variar en secuencia con respecto al polipéptido de tipo silvestre correspondiente. En particular, pueden introducirse determinadas sustituciones de aminoácidos en la secuencia de Neublastina sin pérdida apreciable de una actividad biológica de Neublastina. En realizaciones ejemplares, un polipéptido de Neublastina variante contiene (i) una o más sustituciones de aminoácidos y (ii) al menos una identidad del 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% con la SEC ID Nº: 1 (o una identidad del 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% con los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº: 1). Un polipéptido de Neublastina variante difiere en la secuencia con respecto a la SEC ID Nº: 1 (o difiere en la secuencia con respecto a los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº: 1) puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos (conservativas o no conservativas), una o más deleciones y/o una o más inserciones.

[0024] La Figura 1 es un alineamiento de polipéptidos pre pro Neublastina de tipo silvestre de ser humano, ratón y rata. Las líneas verticales en la Figura 1 indican el inicio de la forma de 113 aminoácidos madura (línea vertical izquierda) y la forma de 104 aminoácidos (línea vertical a la derecha) de Neublastina. El motivo de unión a heparina RRXR se indica en un recuadro. Este alineamiento de origen natural, formas bioactivas de Neublastina indica restos ejemplares específicos (es decir, aquellos que no estén conservados entre las formas humana de ratón y de rata) que pueden sustituirse sin eliminar la bioactividad.

[0025] Puede determinarse el porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos usando el programa BLAST 2.0. Puede realizarse comparación de secuencias usando un alineamiento sin huecos y usando parámetros predeterminados (matriz Blossom 62, penalización de existencia de huecos de 11, penalización de huecos por restos de 1 y proporción lambda de 0,85). El algoritmo matemático utilizado en los programas BLAST se describe en Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Research 25: 3389-3402.

[0026] Una sustitución conservativa es la sustitución de un aminoácido por otro con características similares. Las

sustituciones conservativas incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, alanina y glicina; leucina, valina e isoleucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina y glutamina; serina, cisteína y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Los aminoácidos hidrófobos no polares incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Una sustitución de un miembro de los grupos polares básicos o ácidos anteriormente mencionados por otro miembro del mismo grupo puede considerarse una sustitución conservativa.

[0027] Las sustituciones no conservativas incluyen aquellas en las que (i) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva (por ejemplo, Arg, His o Lys) se sustituye por, o mediante, un resto electronegativo (por ejemplo, Glu o Asp), (ii) un resto hidrófilo (por ejemplo, Ser o Thr) se sustituye por o mediante, un resto hidrófobo (por ejemplo, Ala, Leu, He, Phe o Val), (iii) una cisteína o prolina se sustituye por, o mediante, cualquier otro resto, o (iv) un resto que tiene una cadena lateral hidrófoba o aromática voluminosa (por ejemplo, Val, He, Phe o Trp) se sustituye por, o mediante, uno que tiene una cadena lateral más pequeña (por ejemplo, Ala, Ser) o no tiene cadena lateral (por ejemplo, Gly).

[0028] Cuando un polipéptido de Neublastina variante biológicamente activo se dimeriza, se une a un complejo ternario que contiene GFRalfa3 y RET. Para evaluar la actividad biológica de un polipéptido de Neublastina variante puede utilizarse cualquier método para detectar la unión a este complejo. En el documento WO00/01815 se describen ensayos ejemplares para detectar la capacidad de unión al complejo ternario de un polipéptido de Neublastina variante.

[0029] También puede evaluarse un polipéptido de Neublastina variante para evaluar su capacidad para desencadenar la cascada de señalización de la Neublastina. Por ejemplo, puede utilizarse el ensayo de Activación de Receptor Quinasa (KIRA) para evaluar la capacidad de un polipéptido de Neublastina variante para inducir la autofosforilación de RET (véase también Sadick *et al.*, 1996, Anal. Biochem., 235(2): 207).

Polipéptidos de GDNF

[0030] El GDNF humano maduro de tipo silvestre tiene una longitud de 134 aminoácidos y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: PDKQMAVLPRRERNRQAAAANPENSRGKGR RGQRGKNRGCV LTAIHLNVTD LGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILK NLSRNRRLVSDKVGQACCRPIAF DDDLSFLDDNLVYHI RKHSAKRCGCI (SEC ID Nº: 2). Los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 2 o variantes biológicamente activas de los mismos pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento. Un polipéptido GDNF variante puede contener una o más adiciones, sustituciones y/o deleciones, como se detalla en las siguientes secciones. Los polipéptidos de GDNF de tipo silvestre y variantes biológicamente activas de los mismos pueden denominarse en su conjunto en el presente documento “polipéptidos GDNF”.

[0031] Un polipéptido GDNF variante puede variar en longitud con respecto al polipéptido de tipo silvestre correspondiente. Aunque el polipéptido GDNF humano maduro (SEC ID Nº: 2) consiste en 134 aminoácidos carboxiterminales de GDNF pre pro (SEC ID Nº: 8), no todos los 134 aminoácidos se requieren para conseguir la actividad biológica de GDNF (por ejemplo se permite el truncamiento aminoterminal).

[0032] Un polipéptido de GDNF variante también puede variar en secuencia del polipéptido de tipo silvestre correspondiente. En particular, pueden introducirse determinadas sustituciones de aminoácidos en la secuencia de GDNF sin pérdida apreciable de actividad biológica de GDNF. En realizaciones ejemplares, un polipéptido de GDNF variante (i) contiene una o más sustituciones de aminoácidos y (ii) tiene una identidad de al menos el 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% a la SEC ID Nº: 2. Un polipéptido GDNF variante difiere en la secuencia de la SEC ID Nº: 2 puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos (conservativas o no conservativas), o una o más deleciones y/o una o más inserciones.

[0033] La Figura 2 es un alineamiento de los polipéptidos pre pro GDNF de tipo silvestre de ser humano, de ratón y rata. El resto de aminoácido subrayado e indicado en negrita en la Figura 2 indica el inicio de la forma madura de 134 aminoácidos de GDNF. Este alineamiento de formas bioactivas de origen natural de GDNF indica restos específicos ejemplares (es decir, aquellos que no estén conservados entre las formas humana de ratón y rata) que pueden sustituirse sin eliminar la bioactividad.

[0034] Cuando un polipéptido GDNF variante biológicamente activo se dimeriza, se une a un complejo ternario que contiene GFRalfa1 y RET. Puede usarse cualquier método para detectar la unión a este complejo para evaluar la actividad biológica de un polipéptido GDNF variante. En el documento WO00/01815 se describen ensayos ejemplares para detectar la capacidad de unión al complejo ternario de un polipéptido GDNF variante.

[0035] También puede evaluarse el polipéptido de GDNF variante con respecto a su capacidad para desencadenar la cascada de señalización de GDNF. Por ejemplo, puede usarse el ensayo KIRA para evaluar la capacidad de un

polipéptido GDNF variante para inducir la autofosforilación RET (véase también Sadick *et al.*, 1996, Anal. Biochem., 235(2): 207).

Polipéptidos de Neurturina

[0036] La Neurturina humana madura de tipo silvestre tiene una longitud de 102 aminoácidos y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: ARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYASDETVLF RYCAGACEAAARVY DLGLRRLRQRRRLRRERVRAQPC CRPTAYEDEVSFLD AHSRYHTVHELSARECACV (SEC ID Nº: 3). Los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 3 o variantes biológicamente activas de los mismos pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento. Un polipéptido de Neurturina variante puede contener una o más adiciones, sustituciones y/o deleciones, como se detalla en las siguientes secciones. Los polipéptidos de Neurturina de tipo silvestre y variantes biológicamente activas de los mismos se denominan conjuntamente en el presente documento “polipéptidos de Neurturina”.

[0037] Un polipéptido de Neurturina variante puede variar en longitud con respecto al polipéptido de tipo silvestre correspondiente. Aunque el polipéptido de Neurturina humano maduro (SEC ID Nº: 3) consiste en 102 aminoácidos carboxiterminales de pre pro Neurturina (SEC ID Nº: 11), no todos los 102 aminoácidos se requieren para conseguir la actividad biológica de la Neurturina útil (por ejemplo es permisible el truncamiento aminoterminal).

[0038] Un polipéptido de Neurturina variante también puede variar en secuencia con respecto al polipéptido de tipo silvestre correspondiente. En particular, pueden introducirse determinadas sustituciones de aminoácidos en la secuencia de Neurturina sin pérdida apreciable de una actividad biológica de Neurturina. En realizaciones ejemplares, un polipéptido de Neurturina variante (i) que contiene una o más sustituciones de aminoácidos y (ii) tiene una identidad de al menos el 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% con la SEC ID Nº: 3. Un polipéptido de Neurturina variante diferente en la secuencia de la SEC ID Nº: 3 puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos (conservativas o no conservativas), o una o más deleciones y/o una o más inserciones.

[0039] La Figura 3 es un alineamiento de los polipéptidos de pre pro Neurturina de tipo silvestre de ser humano, de ratón y rata. Los restos de aminoácidos subrayados e indicados en negrita en la Figura 3 indican el inicio de la forma madura de 102 aminoácidos de la Neurturina. Esta alineación de formas bioactivas de origen natural de la Neurturina indican restos ejemplares específicos (es decir, aquellos que no estén conservados entre las formas humana, de ratón y de rata) que pueden sustituirse sin eliminar la bioactividad.

[0040] Cuando un polipéptido de Neurturina variante biológicamente activo se dimeriza, se une a un complejo ternario que contiene GFRalfa2 y RET. Para evaluar la actividad biológica de un polipéptido de Neurturina variante puede utilizarse cualquier método para detectar la unión a este complejo. En el documento WO00/01815 se describen ensayos ejemplares para detectar la capacidad de unión del complejo ternario de un polipéptido Neurturina variante.

[0041] También puede evaluarse el polipéptido de Neurturina variante con respecto a su capacidad para desencadenar la cascada de señalización de Neurturina. Por ejemplo, puede utilizarse el ensayo KIRA para evaluar la capacidad de un polipéptido de Neurturina variante para inducir autofosforilación RET (véase también Sadick *et al.*, 1996, Anal. Biochem., 235(2): 207).

Polipéptidos de Persefina

[0042] La Persefina humana madura de tipo silvestre tiene longitud de 96 aminoácidos y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: ALSGPCQLWSLTLSVAEL GLGYASEEKVIFR YCAGSCPRGARTQHGLA LARLQGQGRAHGG PCCRPTRYTDVAFLDDRHRWQ RLPQLSAAACGCGG (SEC ID Nº: 4). Los polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 4 o variantes biológicamente activas de los mismos pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento. Un polipéptido de Persefina variante puede contener una o más adiciones, sustituciones y/o deleciones, como se detalla en las siguientes secciones. Los polipéptidos de Persefina de tipo silvestre y variantes biológicamente activas de los mismos se denominan conjuntamente en el presente documento “polipéptidos de Persefina”.

[0043] Un polipéptido de Persefina variante puede variar en longitud a partir del polipéptido de tipo silvestre correspondiente. Aunque el polipéptido de Persefina humano maduro (SEC ID Nº: 4) consiste en 96 aminoácidos carboxiterminales de pre pro Persefina (SEC ID Nº: 14), para conseguir la actividad biológica de Persefina útil no se requieren los 96 aminoácidos (por ejemplo, es permisible el truncamiento aminoterminal).

[0044] Un polipéptido de Persefina variante también puede variar en secuencia con respecto al polipéptido de tipo silvestre correspondiente. En particular, pueden introducirse diversas sustituciones de aminoácidos en la secuencia de Persefina sin pérdida apreciable de actividad biológica de Persefina. En realizaciones ejemplares, un polipéptido de Persefina variante (i) contiene una o más sustituciones de aminoácidos y (ii) tiene una identidad de al menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% con la SEC ID Nº: 4. Un polipéptido de Persefina variante difiere en

secuencia de la SEC ID Nº: 4 puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos (conservativas o no conservativas) o una o más deleciones y/o una o más inserciones.

[0045] La Figura 4 es un alineamiento de los polipéptidos de pre pro Persefina de tipo silvestre de ser humano, de ratón y de rata. El resto de aminoácido subrayado y en negrita en la Figura 4 indica el inicio de la forma madura de 96 aminoácidos de Persefina. Este alineamiento de formas bioactivas de origen natural de la Persefina indica restos ejemplares específicos (es decir, aquellos que no están conservados entre las formas de ser humano, de ratón y rata) que pueden sustituirse sin eliminar la bioactividad.

[0046] Cuando un polipéptido de Persefina variante biológicamente activo se dimeriza, se une a un complejo ternario que contiene GFRalfa4 y RET. Para evaluar la actividad biológica de un polipéptido de Persefina variante puede utilizarse cualquier método para detectar la unión a este complejo. En el documento WO00/01815 se describen ensayos ejemplares para detectar la capacidad de unión del complejo ternario de un polipéptido de Persefina variante.

[0047] Un polipéptido de Persefina variante también puede evaluarse con respecto a su capacidad para desencadenar la cascada de señalización de Persefina. Por ejemplo, puede utilizarse el ensayo KIRA para evaluar la capacidad de un polipéptido de Persefina variante para inducir la autofosforilación RET (véase también Sadick *et al.*, 1996, Anal. Biochem., 235(2): 207).

Preparación de proteínas de la familia de ligandos del GDNF

[0048] Una proteína de la familia de ligandos del GDNF (por ejemplo, un polipéptido de Neublastina, un polipéptido de GDNF, un polipéptido de Neurturina, o un polipéptido de Persefina descritos en el presente documento) puede opcionalmente contener secuencias de aminoácidos heterólogas además de una proteína de familia de ligandos del GDNF. “Heterólogo”, como se usa en el presente documento cuando hace referencia a una secuencia de aminoácidos, se refiere a una secuencia que se origina de una fuente exógena a la célula huésped particular o, si procede de la misma célula huésped, está modificada con respecto a su forma original. Las secuencias heterólogas ejemplares incluyen una secuencia señal heteróloga (por ejemplo, una secuencia señal de albúmina de rata nativa, una secuencia señal de rata modificada, o una secuencia señal de hormona de crecimiento humano) o una secuencia utilizada para la purificación de una proteína de la familia del ligandos del GDNF (por ejemplo, una etiqueta de histidina).

[0049] Las proteínas de la familia de ligandos del GDNF pueden aislarse utilizando métodos conocidos en la técnica. Las proteínas de la familia de ligandos del GDNF de origen natural pueden aislarse a partir de fuentes de células o tejidos utilizando técnicas de purificación de proteínas convencionales. Como alternativa, las proteínas de la familia de ligandos del GDNF mutadas pueden sintetizarse químicamente utilizando técnica de síntesis peptídica convencionales. La síntesis de secuencias cortas de aminoácidos está bien establecida en la técnica de péptidos (véase, por ejemplo, Stewart, *et al.*, Solid Phase Peptide Synthesis (2ª ed., 1984).

[0050] En algunas realizaciones, las proteínas de la familia de ligandos del GDNF se produce mediante técnicas de ADN recombinantes. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de la familia de ligandos del GDNF puede insertarse en un vector, por ejemplo como un vector de expresión, y el ácido nucleico puede introducirse en una célula. Como células adecuadas se incluyen, por ejemplo, células de mamífero (tales como células de ser humano o células CHO), células fúngicas, células de levadura, células de insecto y células bacterianas (por ejemplo, *E. coli*). Cuando se expresa una célula recombinante, la célula se cultiva preferentemente en condiciones que permitan la expresión de una proteína de la familia de ligandos GDNF. La proteína de la familia de ligandos del GDNF puede recuperarse de una suspensión celular si se desea. Como se usa en el presente documento, recuperarse significa que el polipéptido mutado se retira de aquellos componentes de una célula o de medio de cultivo en el cual está presente antes del proceso de recuperación. El proceso de recuperación puede incluir una o más etapas de replegamiento o purificación. Por ejemplo en la Solicitud de Patente PCT Número PCT/US2005/029638 se describen métodos y tampones para inducir el plegamiento de una proteína de la familia de ligandos de GDNF desnaturalizada.

[0051] Las proteínas de la familia de ligandos del GDNF variantes pueden construirse usando cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica. Un método de este tipo es la mutagénesis dirigida, en la que un nucleótido específico (o, si se desea una pequeña cantidad de nucleótidos específicos) se cambia para cambiar un solo aminoácido (o, si se desea, una pequeña cantidad de restos de aminoácidos predeterminados) en la proteína de la familia de ligandos del GDNF variante codificada. En el mercado existen muchos kits de mutagénesis dirigida. Un kit de este tipo es el “Kit de Mutagénesis Dirigida Transformer” comercializado por Clontech Laboratories (Palo Alto, CA).

Composiciones farmacéuticas

[0052] Una proteína de la familia de ligandos del GDNF (por ejemplo, un polipéptido de Neublastina, un polipéptido de GDNF, un polipéptido de Neurturina, o un polipéptido de Persefina descritos en el presente documento) puede incorporarse en una composición farmacéutica que contenga una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de familia de ligandos del GDNF en una cantidad de heparina o sulfato de heparán que aumente la exposición en suero de la proteína de familia de ligandos del GDNF administrada en un sujeto tratado.

[0053] La heparina y sulfato de heparán son glucosaaminoglucanos alfa beta unidos relacionados químicamente compuestos por secuencias alternas de glucosamina y ácido urónico. El tamaño de la cadena individual puede alcanzar 100 kDa, pero normalmente se encuentra por debajo de 50 kDa.

[0054] La heparina o sulfato de heparán utilizados en la composición farmacéutica puede no conjugarse o conjugarse con otra entidad molecular (por ejemplo, la heparina puede estar presente en forma de un proteoglucano en el que la heparina está conjugada con una proteína). Dicha conjugación es aceptable, siempre que no elimine la capacidad de la heparina o del sulfato de heparán para aumentar la exposición en suero de la proteína de la familia de ligandos del GDNF administrada en un sujeto tratado. En algunas realizaciones, la heparina o sulfato de heparán se une covalentemente a la proteína de la familia de ligandos del GDNF.

[0055] Una proteína de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán pueden coadministrarse simultáneamente en una sola composición farmacéutica o puede administrarse por separado mediante administraciones simultáneas o secuenciales. Si se administran secuencialmente, o bien heparina o sulfato de heparán o la proteína de la familia de ligandos del GDNF puede administrarse primero.

[0056] Además de una proteína de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán, una composición farmacéutica también puede contener uno o más adyuvantes, excipientes, transportadores y/o diluyentes. Diluyentes transportadores y excipientes aceptables típicamente no afectan adversamente a la homeostasis del receptor (por ejemplo equilibrio hidrolítico). Transportadores aceptables incluyen sales biocompatibles, inertes o bioabsorbibles, agentes tamponantes, oligo o polisacáridos, polímeros, agentes mejoradores de viscosidad, conservantes y similares. Un transportador ejemplar es solución salina fisiológica (NaCl 0,15 M, pH 7,0 a 7,4). Otro transportador ejemplar es fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 100 mM. Otros detalles sobre técnicas de formulación y administración de composiciones farmacéuticas pueden encontrarse en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

[0057] También puede administrarse una composición farmacéutica que contenga una proteína de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán mediante administración sistémica. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de tal manera que sean adecuadas para administración parenteral y/o no parenteral. Las modalidades de administración específicas incluyen administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, oral, rectal, bucal, nasal, intraarticular, intraarterial, subaracnoidea, bronquial, linfática, vaginal e intrauterina.

[0058] La administración puede ser por inyecciones periódicas de una embolada de una composición farmacéutica o puede realizarse mediante una administración continua por administración intravenosa o intraperitoneal a partir de un depósito que es externo (por ejemplo, una bolsa IV) o interno (por ejemplo un implante bioerosionable). Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 4.407.957, 5.798.113 y 5.800.828.

[0059] Ejemplos de sistemas de administración parenteral incluyen partículas del copolímero de etilen vinil acetato, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, administración de bombas, administración de células encapsuladas, administración liposómica, inyección administrada mediante aguja, inyección sin aguja, nebulizador, aerosol, electroporación y parche transdérmico.

[0060] Las formulaciones adecuadas para administración parenteral convenientemente contienen una preparación acuosa estéril de la proteína de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán, que preferentemente es isotónica con la sangre del receptor (por ejemplo, solución salina fisiológica). Las formulaciones pueden presentarse en forma de dosis unitarias o multidosis.

[0061] Una formulación ejemplar contiene una proteína de la familia de ligandos del GDNF descrita en el presente documento, heparina o sulfato de heparán y los siguientes componentes tampón: succinato sódico (por ejemplo, 10 mM); NaCl (por ejemplo, 75 mM); y L-arginina (por ejemplo, 100 mM).

[0062] Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades individuales tales como cápsulas, obleas, comprimidos o pastillas para chupar, conteniendo cada una de ellas una cantidad predeterminada de la proteína de la familia de ligandos de GDNF y heparina o sulfato de heparán; o una suspensión en un licor acuoso o un líquido no acuoso tal como un jarabe, un elixir o una emulsión o un brebaje.

[0063] Las cantidades terapéuticamente eficaces de una composición farmacéutica pueden administrarse a un sujeto que lo necesite en un régimen de dosificación que considere un experto en la técnica. Por ejemplo, una composición puede administrarse a un sujeto, por ejemplo, sistémicamente a una dosificación de 0,0 µg/kg a 1000 µg/kg de peso corporal del sujeto por dosis. En otro ejemplo, la dosificación es de 1 µg/kg a 100 µg/kg de peso corporal del sujeto por dosis. En otro ejemplo, la dosificación es de 1 µg/kg a 30 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis, por ejemplo, de 3 µg/kg a 10 µg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis.

[0064] Para optimizar la eficacia terapéutica, una proteína de la familia de ligando del GDNF se administra primero a regímenes de dosificación diferentes. La dosis unitaria y el régimen dependen de factores que incluyen, por ejemplo, la especie de mamífero, su estado inmunitario, el peso corporal del mamífero. Típicamente, los niveles de proteína en tejidos se controlan usando análisis de exploración apropiados como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento determinado.

[0065] La frecuencia de dosificación de una proteína de la familia de ligandos de GDNF se encuentra dentro de la habilidad y criterio clínico de los médicos. Típicamente, el régimen de administración se establece mediante ensayos clínicos que pueden establecer parámetros de administración óptimos. Sin embargo, el facultativo puede variar dichos regímenes de administración de acuerdo con la edad, salud, peso, sexo y estado médico del sujeto. La frecuencia de dosificación puede variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

Usos para el tratamiento

[0066] Una proteína de la familia de ligandos del GDNF (por ejemplo, un polipéptido de Neublastina, un polipéptido de GDNF, un polipéptido de Neurturina, o un polipéptido de Persefina descritos en el presente documento) es útil para modular el metabolismo, crecimiento, diferenciación o supervivencia de una célula nerviosa o neuronal. En particular, una proteína de la familia de ligandos del GDNF (con heparina o sulfato de heparán) puede usarse para tratar o aliviar un trastorno o enfermedad de un animal vivo, por ejemplo, un ser humano, cuyo trastorno o enfermedad es sensible a la actividad de un agente neurotrófico.

[0067] Las proteínas de la familia de ligandos del GDNF descritas en el presente documento (y composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas) pueden usarse en el tratamiento o prevención de un trastorno del sistema nervioso en un sujeto (tal como un ser humano), administrando a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de la familia de ligandos del GDNF (con heparina o sulfato de heparán) o una composición que contenga una proteína de la familia de ligandos del GDNF y heparina sulfato de heparán.

[0068] El trastorno del sistema nervioso puede ser un trastorno del sistema nervioso periférico, tal como neuropatía periférica, o un síndrome de dolor neuropático, o un trastorno del sistema nervioso central.

[0069] Una proteína de la familia de ligandos del GDNF (administrada con heparina o sulfato de heparán) es útil para el tratamiento de un defecto de una neurona, incluyendo neuronas lesionadas y neuronas traumatizadas. Los nervios periféricos que sufren traumatismo incluyen, pero sin limitación nervios de la médula o de la médula espinal. Las proteínas de la familia de ligandos de GDNF (administradas con heparina o sulfato de heparán) son útiles en el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, lesión neuronal isquémica cerebral, neuropatía, por ejemplo neuropatía periférica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Las proteínas de la familia de ligandos del GDNF (administradas con heparina o sulfato de heparán) pueden usarse en el tratamiento de memoria alterada, por ejemplo memoria alterada asociada con demencia.

[0070] En algunas realizaciones, pueden tratarse enfermedades neuronales motoras tales como esclerosis lateral amiotrófica (“ELA”) y atrofia muscular espinal. En otras realizaciones, las proteínas de la familia de ligandos del GDNF (administradas con heparina o sulfato de heparán) pueden usarse para potenciar la recuperación nerviosa después de lesión traumática.

[0071] En algunas realizaciones, las proteínas de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán (y composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas) se usan en el tratamiento de diversos trastornos oculares, incluyendo pérdida del fotorreceptor en la retina en pacientes que padecen degeneración macular, retinitis pigmentosa, glaucoma, y enfermedades similares.

[0072] En algunas realizaciones, las proteínas de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán (y composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas) se usan para el tratamiento de dolor neuropático, para el tratamiento de alodinia táctil, para reducir la pérdida de sensibilidad al dolor asociado con neuropatía, para tratar infecciones virales y neuropatías asociadas con virus y para tratar neuropatía diabética dolorosa. Los métodos se analizan con detalle en las siguientes subsecciones.

1. Tratamiento del dolor neuropático

[0073] Las proteínas de la familia de ligandos del GDNF descritas en el presente documento (y composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas) pueden usarse para el tratamiento del dolor neuropático en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una proteína de la familia de ligandos del GDNF (con heparina y sulfato de heparán) sola, o también administrando al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto inductor de analgesia seleccionado del grupo que consiste en opioides, antiarrítmicos, analgésicos tópicos, anestésicos locales, anticonvulsivos, antidepresivos, corticoesteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID). En una realización, el compuesto inductor de analgesia es un anticonvulsivo. En otra realización, el compuesto inductor de analgesia es gabapentina (ácido (1-aminometil)ciclohexano-acético) o pregabalina (ácido S-(+)-4-amino-3-(2-metil-propil)butanoico).

[0074] Las proteínas de la familia de ligandos del GDNF descritas en el presente documento (y composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas) pueden usarse en el tratamiento de dolor asociado con neuropatías periféricas. Entre las neuropatías periféricas que pueden tratarse se encuentran neuropatías inducidas por traumatismo, por ejemplo, las producidas por lesión física o patología, lesión física cerebral, lesión física en la médula espinal, ictus asociado con daño cerebral, y trastornos neurológicos relacionados con neurodegeneración.

[0075] Las proteínas de la familia de ligandos del GDNF descritas en el presente documento y la heparina o sulfato de heparán (y composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas) pueden usarse en el tratamiento de diversas neuropatías periféricas, incluyendo: (a) neuropatías inducidas por traumatismo, (b) neuropatías inducidas por quimioterapia, (c) neuropatías inducidas por toxinas (incluyendo, pero sin limitación, neuropatías inducidas por alcoholismo, intoxicación por vitamina B6, intoxicación por hexacarbono, aminodarona, cloranfenicol, disulfiram, isoniacina, oro, litio, metronidazol, misonidazol, nitrofurantoina), (d) neuropatías inducidas por fármacos, incluyendo dolor neuropático inducido por fármacos terapéuticos (tales como los ocasionados por agentes anticancerígenos, particularmente agentes anticancerígenos seleccionados del grupo que consiste en taxol, taxotere, cisplatino, nocodazol, vincristina, vindesina y vinblastina; y ocasionados por agentes antivirales, particularmente agentes antivirales seleccionados del grupo que consiste en ddl, DDC, d4T, foscarnet, dapsona, metronidazol e isoniacid), (e) neuropatías inducidas por déficit de vitaminas (incluyendo, pero sin limitación, déficit de vitamina B12, déficit de vitamina B6, y déficit de vitamina E), (f) neuropatía idiopáticas, (g) neuropatías diabéticas, (h) lesión nerviosa inducida por patógenos (i) lesión nerviosa inducida por inflamación, (j) neurodegeneración (k) neuropatía hereditaria (incluyendo, pero sin limitación, ataxia de Friedreich, polineuropatía amiloidea familiar, enfermedad de Tangier, enfermedad de Fabry), (l) trastornos metabólicos (incluyendo, pero sin limitación, insuficiencia renal e hipotiroidismo) (m) neuropatías infecciosas y virales (incluyendo, pero sin limitación, dolor neuropático asociado con lepra, enfermedad de Lyme, dolor neuropático asociado con infección por un virus, particularmente un virus seleccionado del grupo que consiste en un herpes virus (por ejemplo herpes zoster que puede conducir a neuralgia postherpética), un virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y un papiloma virus, (n) neuropatías autoinmunitarias (incluyendo, pero sin limitación, síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, gamopatía monoclonal de significado indeterminado y polineuropatía), (o) neuralgia trigeminal y síndromes de atrapamiento (incluyendo, pero sin limitación, túnel Carpiano) y (p) otros síndromes de dolor neuropático incluyendo neuralgia postraumática, dolor por miembro fantasma, dolor por esclerosis múltiple, síndrome de dolor regional complejo (incluyendo, pero sin limitación, distrofia simpática refleja, causalgia), dolor asociado con neoplasia, neuropatía vasculítica/angiopática y ciática. El dolor neuropático puede manifestarse como alodinia, hiperalgesia, dolor espontáneo o dolor fantasma.

2. Tratamiento de alodinia táctil

[0076] Las proteínas de la familia de ligandos de GDNF descritas en el presente documento y heparina o sulfato de heparán (y composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas) pueden usarse en el tratamiento de alodinia táctil en un sujeto. El término “alodinia táctil” se refiere típicamente a la afección en un sujeto en el que el dolor se suscita por estimulación de la piel (por ejemplo tacto) que normalmente es inocuo.

[0077] En algunas realizaciones, la alodinia táctil se trata administrando al sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína de la familia de ligandos de GDNF y heparina o sulfato de heparán. En una realización relacionada, la alodinia táctil puede tratarse administrando a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de la familia de ligandos de GDNF (con heparina o sulfato de heparán) solo, o administrando al sujeto una cantidad eficaz de una proteína de la familia de ligandos de GDNF, heparina o sulfato de heparán, y una cantidad eficaz de un compuesto inductor de analgesia seleccionado del grupo que consiste en opioides, antiarrítmicos, analgésicos tópicos, anestésicos locales, anticonvulsivos, antidepresivos, corticoesteroides y NSAID. En una realización, el compuesto inductor de analgesia es un anticonvulsivo. En otra realización preferida, el compuesto inductor de analgesia es gabapentina (ácido (1-aminometil)ciclohexano-acético) o pregabalina (ácido S-(+)-4-amino-3-(2-metil-propil)butanoico).

[0078] En algunas realizaciones, una proteína de la familia de ligandos de GDNF o heparina o sulfato de heparán se administra en asociación con un agente terapéutico, incluyendo, pero sin limitación, un agente anticancerígeno o un agente antiviral. Como agentes anticancerígenos se incluyen, pero sin limitación, taxol, taxotere, cisplatino,

nocodazol, vincristina, vindesina y vinblastina. Como agentes antivirales se incluyen, pero sin limitación, ddl, DDC, d4T, foscarnet, dapsona, metronidazol e isoniacid.

3. Tratamiento para la reducción de pérdida de sensibilidad al dolor

[0079] En otra realización, las proteínas de la familia de ligandos del GDNF descritas en el presente documento y heparina o sulfato de heparán (y composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas) pueden usarse para reducir la pérdida de sensibilidad al dolor en un sujeto que padece una neuropatía. En una realización, la neuropatía es neuropatía diabética. En algunas realizaciones, la pérdida de sensibilidad al dolor es una pérdida en cuanto a la sensibilidad al dolor térmico. Estos métodos incluyen tratamiento tanto profiláctico como terapéutico.

[0080] En el tratamiento profiláctico, una proteína de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán se administra a un sujeto que está en riesgo de desarrollar pérdida de sensibilidad al dolor (tal sujeto debe esperarse que sea un sujeto con una fase temprana de neuropatía). El tratamiento con una proteína de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán en dichas circunstancias serviría para tratar pacientes en riesgo preventivamente.

[0081] En el tratamiento terapéutico, una proteína de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán se administra a un sujeto que padece pérdida de sensibilidad al dolor como resultado o de aflicción de una neuropatía (de tal manera que el sujeto podría esperarse que fuera un sujeto con una neuropatía en fase temprana). El tratamiento con una proteína de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán en dichas circunstancias serviría para rescatar la sensibilidad al dolor apropiada en el sujeto.

4. Tratamiento de infecciones virales y neuropatías asociadas a virus

[0082] Se contempla el tratamiento profiláctico de infecciones y neuropatías virales. El tratamiento profiláctico se indica después de la determinación de una infección viral y después de la aparición de dolor neuropático. Durante el tratamiento, una proteína de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán se administra para impedir la aparición de dolor neuropático incluyendo, pero sin limitación, dolor neuropático asociado con lepra, enfermedad de Lyme, dolor neuropático asociado con infección por virus, particularmente un virus seleccionado del grupo que consiste en un herpes virus (y más particularmente un virus del herpes zoster, que puede conducir a neuralgia postherpética), un virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y un papiloma virus). En una realización alternativa, una proteína de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán se administra para reducir la gravedad de dolor neuropático, que pudiese aparecer.

[0083] Los síntomas de infección aguda viral a menudo incluyen la aparición de una erupción. Otros síntomas incluyen, por ejemplo, el desarrollo de dolor persistente en el área afectada del cuerpo que es una complicación habitual de una infección por herpes zoster (culebrillas). La neuralgia postherpética puede durar un mes o más, y puede aparecer diversos meses después de que hayan desaparecido síntomas de tipo erupción.

5. Tratamiento de dolor por neuropatía diabética

[0084] Se contempla el tratamiento profiláctico de dolor por neuropatía diabética. El tratamiento profiláctico de neuropatías diabéticas comenzaría después de la determinación de un diagnóstico inicial de diabetes o síntomas asociados con diabetes y antes de la aparición de dolor neuropático. El tratamiento profiláctico de dolor por neuropatía diabética también puede comenzar después de determinar que un sujeto está en riesgo de desarrollar diabetes o síntomas asociados con la diabetes. Durante el tratamiento, una proteína de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán se administra para prevenir la aparición de dolor neuropático. En una realización alternativa, una proteína de la familia de ligandos del GDNF y heparina o sulfato de heparán se administran para reducir la gravedad de dolor neuropático que ya ha aparecido.

[0085] A continuación se indica un ejemplo de la realización práctica de la invención, que no debe considerarse como limitante del ámbito de la invención de ninguna manera.

Ejemplo: Coadministración de heparina y Neublastina

[0086] Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley previamente intubadas (vena yugular). La Neublastina se administró por vía intravenosa mediante una jeringa de 1 cc unida al catéter yugular a una dosis de 1 mg/kg en solitario o con heparina 16 kDa en una composición que contenía (en PBS) Citrato de Na 5 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM y Tween-80 al 0,01%. El polipéptido de Neublastina utilizado en estos experimentos consistía en los aminoácidos 113 carboxiterminales de la Neublastina de rata de tipo silvestre.

[0087] Las muestras de sangre se extrajeron de las ratas en diversos momentos postdosificación. La farmacocinética de la Neublastina administrada en los diversos momentos se midió mediante el ELISA Complejo Ternario.

Tabla 1: concentración de Neublastina detectada en suero después de administración intravenosa de Neublastina en solitario o coadministración de heparina y Neublastina

Minutos después de la Administración Intravenosa	**Neublastina Sola (concentración en suero, ng/ml)**	**Neublastina + Heparina (concentración en suero, ng/ml)**
5	3,760	5,930
15	1,464	6,369
30	287	6,018
60	206	1,532
120	174	sin determinar

Tabla 2: parámetros farmacocinéticos de Neublastina después de administración intravenosa

Parámetros después de Administración Intravenosa	**Neublastina Sola**	**Neublastina + Heparina**
CL	0,667 l/(h.kg)	0,185 l/(h.kg)
$T_{1/2}$	0,940 h	1,77 h
MRT	0,913 h	0,58 h
V_{ss}	0,609 l/kg	0,107 l/kg
ABC	1.500 ng.h/ml	5.417 ng.h/ml

[0088] Como se detalla en las Tablas 1 y 2, la coadministración de heparina con Neublastina aumentó (en comparación con la administración de Neublastina sola) la exposición en suero de Neublastina, aumentó el área bajo la curva (ABC), disminuyó la eliminación de Neublastina y aumentó la semivida de la proteína administrada.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0089]

<110> Biogen Idee MA Inc.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DE LIGANDOS DEL GDNF

<130> 13751-082wO1

<140> PCT/US2007/005366
<141> 27-02-2007

<150> US 60/778.509
<151> 01-03-2006

<160> 16

<170> FastSEQ para windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 113
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

<210>2
<211> 134
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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


<210>3
<211> 102
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

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

<210>4
<211> 96
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

<210>5
<211> 220
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

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


    130                 135                 140
Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro
145                 150                 155                 160
His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro
                165                 170                 175
Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg
            180                 185                 190
Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val
        195                 200                 205
Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
    210                 215                 220
```

<210>6
<211> 224
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 6

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

<210>7
<211> 224
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 7

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

100 105 110
Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ala Arg Ala Thr Asp Ala Arg Gly Cys Arg
115 120 125
Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Ser Ala Leu Gly Leu Gly His Ser
130 135 140
Ser Asp Glu Leu Ile Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg
145 150 155 160
Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly
165 170 175
Ala Leu Arg Ser Pro Pro Gly Ser Arg Pro Ile Ser Gln Pro Cys Cys
180 185 190
Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr
195 200 205
Trp Arg Thr Val Asp His Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
210 215 220

<210>8
<211>211
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

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

<210>9
<211> 240
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 9

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

65                  70                  75                  80
Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val Met Asp Phe
                85                  90                  95
Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg Leu Lys Arg Ser Pro Asp Lys Gln Ala
            100                 105                 110
Ala Ala Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala Ala Ala Ser
        115                 120                 125
Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn
    130                 135                 140
Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly
145                 150                 155                 160
Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly
                165                 170                 175
Ser Cys Glu Ser Ala Glu Thr Met Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu
            180                 185                 190
Ser Arg Ser Arg Arg Leu Thr Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys
        195                 200                 205
Arg Pro Val Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu
    210                 215                 220
Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
225                 230                 235                 240
```

<210> 10
<211>211
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 10

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

<210> 11
<211> 197
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

```
Met Gln Arg Trp Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ser Val Leu Cys Ser Ser
 1               5                  10                  15
Val Leu Ser Ile Trp Met Cys Arg Glu Gly Leu Leu Leu Ser His Arg


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

<210> 12
<211> 195
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 12

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

<210> 13
<211> 195
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 13

Met Arg Cys Trp Lys Ala Ala Ala Leu Val Ser Leu Ile Cys Ser Ser
1 5 10 15
Leu Leu Ser Val Trp Met Cys Gln Glu Gly Leu Leu Leu Gly His Arg

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

<210> 14
<211> 156
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

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

<210> 15
<211> 156
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 15

```
Met Ala Ala Gly Arg Leu Arg Ile Leu Cys Leu Leu Leu Leu Ser Leu
 1               5                  10                  15
His Pro Ser Leu Gly Trp Val Leu Asp Leu Gln Glu Ala Ser Val Ala
            20                  25                  30
Asp Lys Leu Ser Phe Gly Lys Met Ala Glu Thr Arg Gly Thr Trp Thr
        35                  40                  45
Pro His Gln Gly Asn Asn His Val Arg Leu Pro Arg Ala Leu Ala Gly
    50                  55                  60
Ser Cys Arg Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala Glu Leu Gly Leu


65                  70                  75                  80
Gly Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Val Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser
                85                  90                  95
Cys Pro Gln Glu Ala Arg Thr Gln His Ser Leu Val Leu Ala Arg Leu
            100                 105                 110
Arg Gly Arg Gly Arg Ala His Gly Arg Pro Cys Cys Gln Pro Thr Ser
        115                 120                 125
Tyr Ala Asp Val Thr Phe Leu Asp Asp Gln His His Trp Gln Gln Leu
    130                 135                 140
Pro Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly
145                 150                 155
```

<210> 16
<211> 156
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 16

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

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

(i) una proteína de la familia de ligandos del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) seleccionada del grupo que consiste en un polipéptido de Neublastina, un polipéptido de GDNF, un polipéptido de Neurturina, y un polipéptido de Persefina; y
(ii) una cantidad de heparina o sulfato de heparán que aumenta la exposición en suero de la proteína de la familia de ligandos del GDNF administrada en un sujeto,

para su uso en el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso mediante la liberación sistémica de la composición farmacéutica.

2. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en la que la proteína de la familia de ligandos del GDNF es un polipéptido de Neublastina, que tiene una identidad de al menos el 80% con los aminoácidos 15-113 de la SEC ID NO: 1, y en la que cuando el polipéptido dimeriza, se une a un complejo que contiene GFRalfa3 y RET.

3. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 2, en la que el polipéptido de Neublastina tiene una identidad de al menos el 90% con los aminoácidos 15-113 de la SEC ID Nº: 1.

4. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 2, en la que el polipéptido de Neublastina comprende los aminoácidos 15-113 de la SEC ID NO: 1.

5. La composición farmacéutica para usarsegún la reivindicación 2, en la que el polipéptido de Neublastina consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1.

6. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 2, en la que el polipéptido de Neublastina consiste en los 104 aminoácidos carboxiterminales de la SEC ID NO: 1.

7. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en la que la proteína de la familia de ligandos del GDNF es un polipéptido de GDNF que tiene una identidad de al menos el 80% con la SEC ID NO: 2, y en la que cuando el polipéptido dimeriza, se une a un complejo que contiene GFRalfa1 y RET.

8. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en la que la proteína de la familia de ligandos del GDNF es un polipéptido de Neurturina que tiene una identidad de al menos el 80% con la SEC ID NO: 3, y en la que cuando el polipéptido dimeriza, se une a un complejo que contiene GFRalfa2 y RET.

9. La composición farmacéutica para usar según la reivindicación 1, en la que la proteína de la familia de ligandos del GDNF es un polipéptido de Persefina que tiene una identidad de al menos el 80% con la SEC ID NO: 4, y en la que cuando el polipéptido dimeriza, se une a un complejo que contiene GFRalfa4 y RET.

10. La composición farmacéutica para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el trastorno del sistema nervioso es dolor neuropático.

11. La composición farmacéutica para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el trastorno del sistema nervioso es una neuropatía periférica.

12. La composición farmacéutica para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el trastorno del sistema nervioso es pérdida de sensibilidad al dolor asociada con una neuropatía.

13. La composición farmacéutica para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la proteína de la familia de ligandos del GDNF no está conjugada con un polímero.

14. La composición farmacéutica para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que la administración sistémica es administración intravenosa.

15. La composición farmacéutica para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que la administración sistémica es administración subcutánea.

16. La composición farmacéutica para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el sujeto es un ser humano.

		10	20	30	40	50
Neublastina de ser humano	1	MELGLGGLST	ESHGPWPRRQ	PALWPTLAAL	ALLSSVAEAS	LGSAPRSPAP
Neublastina de ratón	1	MELGLAEPTA	ESHCLRPRWQ	SAWWPTLAVL	ALLSCVTEAS	LDPMSRSPAA
Neublastina de rata	1	MELGLGEPTA	ESHCLRPRWQ	PALWPTLAAL	ALLSSVTEAS	EDPMSRSPAS
Neublastina de ser humano	51	REGRPPVLAS	PAGHLPGGRT	ARWCSGRARR	PPPQPSRPAP	PPPAP----P
Neublastina de ratón	51	RDGPSPVEAP	PTDHLPGGHT	AHLCSERTLR	PPPQSPQPAP	PPPGPALQSP
Neublastina de rata	51	RDVPSPVLAP	PTDYLPGGHT	AHLCSERALR	PPPQSPQPAP	PPPGPALQSP
Neublastina de ser humano	97	SALPRGGRAA	RAGGPGSRAR	AAGARGGRLR	SQLVPVRALG	LGHRSDELVR
Neublastina de ratón	101	PAALRGARAA	RAGTRSSRAR	TTDARGGRLR	SQLVPVSALG	LGHSSDELIR
Neublastina de rata	101	PAALRGARAA	RAGTRSSRAR	ATDARGGRLR	SQLVPVSALG	LGHSSDELIR
Neublastina de ser humano	147	FRFCSGSGRR	ARSPHDLSLA	SLLGAGALRP	PPGSRPVSQP	CCRPTRYEAV
Neublastina de ratón	151	FRFGSGSGRR	ARSQHDLSLA	SLLGAGALRS	PPGSRPISQP	CCRPTRYEAV
Neublastina de rata	151	FRFCSGSGRR	ARSPHDLSLA	SLLGAGALRS	PPGSRPISQP	CCRPTRYEAV
Neublastina de ser humano	197	SFMDVNSTWR	TVDRLSATAC	GCLG		
Neublastina de ratón	201	SFMDVNSTWR	TVDHLSATAC	GCLG		
Neublastina de rata	201	SFMDVNSTWR	TVDHLSATAC	GCLG		

Fig. 1

```
GDNF de rata        ------------------------------MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRLLEA 31
GDNF de ratón       MGFGPLGVNVQLGVYGDRIRGAAAGRDSKMKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRLLEA 60
GDNF de ser humano  ------------------------------MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRPPEA 31
                                                   **************************  **

GDNF de rata        PAEDHSLGHRRVPFALTSDSNMPEDYPDQFDDVMDFIQATIKRLKRSPDKQAAALPRRER 91
GDNF de ratón       PAEDHSLGHRRVPFALTSDSNMPEDYPDQFDDVMDFIQATIKRLKRSPDKQAAALPRRER 120
GDNF de ser humano  PAEDRSLGRRRAPFALSSDSNMPEDYPDQFDDVMDFIQATIKRLKRSPDKQMAVLPRRER 91
                    ****:***:**.****:********************************** *.******

GDNF de rata        NRQAAAASPENSRGKGRRGQRGKNRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCEA 151
GDNF de ratón       NRQAAAASPENSRGKGRRGQRGKNRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCES 180
GDNF de ser humano  NRQAAAANPENSRGKGRRGQRGKNRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDA 151
                    *******.**************************************************::

GDNF de rata        AETMYDKILKNLSRSRRLTSDKVGQACCRPVAFDDDLSFLDDSLVYHILRKHSAKRCGCI 211
GDNF de ratón       AETMYDKILKNLSRSRRLTSDKVGQACCRPVAFDDDLSFLDDNLVYHILRKHSAKRCGCI 240
GDNF de ser humano  AETTYDKILKNLSRNRRLVSDKVGQACCRPIAFDDDLSFLDDNLVYHILRKHSAKRCGCI 211
                    *** **********.***.***********:************.****************
```

Fig. 2

```
Neurturina de rata          MRCWKAAALVSLICSSLLSVWMCQEGLLLGHRLGPALAPLRRPPRTLDARIARLAQYRAL 60
Neurturina de ratón         MRRWKAAALVSLICSSLLSVWMCQEGLLLGHRLGPALAPLRRPPRTLDARIARLAQYRAL 60
Neurturina de ser humano    MQRWKAAALASVLCSSVLSIWMCREGLLLSHRLGPALVPLHRLPRTLDARIARLAQYRAL 60
                            *: ******.*::***:**:***:*****.*******.**:* *****************

Neurturina de rata          LQGAPDAVELRELSPWVARPSGPRRRAGPRRRRARP--GSRPCGLRELEVRVSELGLGYT 118
Neurturina de ratón         LQGAPDAVELRELSPWAARIPGPRRRAGPRRRRARP--GARPCGLRELEVRVSELGLGYT 118
Neurturina de ser humano    LQGAPDAMELRELTPWAGRPPGPRRRAGPRRRRARARLGARPCGLRELEVRVSELGLGYA 120
                            *******:*****:**..* .**************.  :*:*******************:

Neurturina de rata          SDETVLFRYCAGACEAAIRIYDLGLRRLRQRRRVRKERVRAHPCCRPTAYEDEVSFLDVH 178
Neurturina de ratón         SDETVLFRYCAGACEAAIRIYDLGLRRLRQRRRVRRERARAHPCCRPTAYEDEVSFLDVH 178
Neurturina de ser humano    SDETVLFRYCAGACEAAARVYDLGLRRLRQRRRLRRERVRAQPCCRPTAYEDEVSFLDAH 180
                            ***************** *:**************:*:**.**:****************.*

Neurturina de rata          SRYHTLQELSARECACV 195
Neurturina de ratón         SRYHTLQELSARECACV 195
Neurturina de ser humano    SRYHTVHELSARECACV 197
                            *****::**********
```

Fig. 3

```
Persefina de rata           MAAGRLRILFLLLLSLHLGLGWVLDLQEAPAAD-ELSSGKMAETGRTWKPHQGNNNVRLP 59
Persefina de ratón          MAAGRLRILCLLLLSLHPSLGWVLDLQEASVAD-KLSFGKMAETRGTWTPHQGNNHVRLP 59
Persefina de ser humano     MAVGKFLLGSLLLLSLQLGQGWGPDARGVPVADGEFSSEQVAKAGGTWLGTHR-PLARLR 59
                            **.*:: :  ******: . **  * : ...** ::*  ::*::  **   :    .**

Persefina de rata           RALPGLCRLWSLTLPVAELGLGYASEEKIIFRYCAGSCPQEVRTQHSLVLARLRGQGRAH 119
Persefina de ratón          RALAGSCRLWSLTLPVAELGLGYASEEKVIFRYCAGSCPQEARTQHSLVLARLRGRGRAH 119
Persefina de ser humano     RALSGPCQLWSLTLSVAELGLGYASEEKVIFRYCAGSCPRGARTQHGLALARLQGQGRAH 119
                            ***.* *:******.*************:**********: .****.*.****:*:****

Persefina de rata           GRPCCQPTSYADVTFLDDHHHWQQLPQLSAAACGCGG 156
Persefina de ratón          GRPCCQPTSYADVTFLDDQHHWQQLPQLSAAACGCGG 156
Persefina de ser humano     GGPCCRPTRYTDVAFLDDRHRWQRLPQLSAAACGCGG 156
                            * ***:** *:**:****:*:**:**************
```

Fig. 4

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 0001815 A **[0028] [0034] [0040] [0046]**
- US 2005029638 W **[0050]**
- US 4407957 A **[0058]**
- US 5798113 A **[0058]**
- US 5800828 A **[0058]**
- US 2007005366 W **[0089]**
- US 60778509 B **[0089]**

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- **LIN et al.** *Science,* 1993, vol. 260, 1130 **[0002]**
- **KOTZBAUER et al.** *Nature,* 1996, vol. 384, 467 **[0002]**
- **MILBRANDT et al.** *Neuron,* vol. 20, 245 **[0002]**
- **BALOH et al.** *Neuron,* 1998, vol. 21, 1291 **[0002] [0004]**
- **MASURE et al.** *Eur J Biochem,* 1999, vol. 266, 892 **[0002]**
- **MOORE et al.** *Nature,* 1996, vol. 382, 76 **[0003]**
- **BAUDET et al.** *Development,* 2000, vol. 127, 4335 **[0003]**
- **ROSENBLAD et al.** *Mol. Cell Neurosci.,* 2000, vol. 15 (2), 199 **[0003]**
- **MASON et al.** *Pharm Acta Helv,* 2000, vol. 74, 261 **[0004]**
- **MASURE et al.** *J Biol Chem,* 2000, vol. 275, 39427 **[0004]**
- **ALTSCHUL et al.** *Nucleic Acids Research,* 1997, vol. 25, 3389-3402 **[0025]**
- **SADICK et al.** *Anal. Biochem.,* 1996, vol. 235 (2), 207 **[0029] [0035] [0041] [0047]**
- **STEWART et al.** Solid Phase Peptide Synthesis. 1984 **[0049]**
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Maack Publishing Co, **[0056]**