

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 787**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
A61K 49/04 (2006.01)
A61K 51/12 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2007 PCT/US2007/067423**
87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2007 WO07127803**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2007 E 07761286 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2019683**

54 Título: **Administración de factores de crecimiento para el tratamiento de trastornos del SNC**

30 Prioridad:

25.04.2006 US 795012 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2017

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR
OAKLAND, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

BANKIEWICZ, KRYSSTOF, S.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 618 787 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

Administración de factores de crecimiento para el tratamiento de trastornos del SNC

5 **Declaración relativa a la subvención federal de la investigación o el desarrollo**

Esta invención se llevó a cabo con el apoyo gubernamental bajo la Subvención nº NINDS U54 NS045309, concedida por el National Institutes of Neurological Disorders and Stroke. El gobierno de los Estados Unidos tiene algunos derechos sobre esta invención.

10

Aviso sobre el material sujeto a la protección de la propiedad intelectual

Una porción del material de este documento patente está sujeto a la protección de la propiedad intelectual bajo las leyes de la propiedad intelectual de los Estados Unidos y de otros países. El propietario de los derechos de la propiedad intelectual no tiene ninguna objeción en la reproducción en facsímil por parte de cualquier persona del documento patente o de la divulgación de la patente, tal y como aparece en el archivo o en los registros disponibles al público de la United States Patent and Trademark Office, pero por lo demás se reserva todo los derechos de la propiedad intelectual para cualquier propósito. El propietario de la propiedad intelectual no renuncia por la presente a ninguno de sus derechos para tener este documento patente mantenido en secreto, incluyendo, sin limitación, sus derechos según la 37 C.F.R. § 1.14.

15

20

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

25

Esta invención se refiere a enfermedades neurodegenerativas y a otras afecciones caracterizadas por una muerte y/o una disfunción neuronales en el sistema nervioso central. La invención también concierne a los factores de crecimiento que son capaces de promover la supervivencia de las neuronas en el sistema nervioso central. La invención se refiere específicamente a composiciones farmacéuticas que comprenden un factor neurotrófico para su uso en métodos de tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y de afecciones caracterizadas por una muerte y/o una disfunción neuronales en el sistema nervioso central.

30

2. Descripción de la técnica relacionada

35

Los factores de crecimiento son proteínas naturales que desempeñan papeles importantes en el sistema nervioso. Se encuentran en el tejido nervioso así como en muchos tejidos objetivo inervados. Los factores de crecimiento promueven el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación fenotípica de las neuronas y/o de las células gliales. Los factores de crecimiento también juegan un papel en el remodelado de las conexiones sinápticas en el sistema nervioso maduro, un proceso denominado generalmente plasticidad neuronal. Debido a estos papeles fisiológicos, los factores de crecimiento son útiles para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central (SNC) en los que está comprometida en la supervivencia y/o la función apropiada de las neuronas. Dichos trastornos del SNC pueden aparecer por muchos motivos diferentes, que incluyen: (1) una lesión física que provoca la degeneración de los procesos axonales y/o de los cuerpos celulares nerviosos próximos al sitio de la lesión, (2) un cese temporal o permanente del flujo sanguíneo (isquemia) en partes del sistema nervioso, como en un ictus, (3) una exposición intencionada o accidental a neurotoxinas, tales como los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer y el SIDA cisplatino y didesoxicidina (ddC), respectivamente, (4) enfermedades metabólicas crónicas, tales como la diabetes o la insuficiencia renal, o (5) enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), que son el resultado de la degeneración de poblaciones específicas de neuronas.

40

45

50

El efecto terapéutico de un factor de crecimiento administrado en el SNC puede derivar de múltiples mecanismos de acción. Los factores de crecimiento pueden contribuir a la eficacia terapéutica al promover la supervivencia y/o el mantenimiento de la diferenciación fenotípica de una población de neuronas que está comprometida en un trastorno del SNC. Adicionalmente, los factores de crecimiento pueden actuar sobre poblaciones secundarias de neuronas que no están comprometidas en un trastorno en particular del SNC pero que son capaces de efectuar cambios compensadores beneficiosos en el SNC en respuesta al factor de crecimiento, por ejemplo, a través de la plasticidad neuronal. Con objeto de que un factor de crecimiento en particular sea potencialmente útil en el tratamiento de un trastorno del SNC, la población de neuronas comprometida en el trastorno del SNC o una población de neuronas compensadoras secundarias, deben ser sensibles al factor en particular. La sensibilidad a un factor de crecimiento en particular está conferida por su receptor, específico del factor de crecimiento, la gran mayoría de los cuales pertenece a la familia de receptores de cinasas de tirosina.

55

60

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es el miembro fundador de una familia definida de factores de crecimiento, denominada neurotrofinas, que incluye el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3), la NT-4/5 y la NT-6. Se sabe que estas neurotrofinas actúan a través de la familia de los receptores de cinasa de tirosina trk, es decir, el trkA, el trkB, el trkC y el receptor de baja afinidad p75.

65

El factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) es un homodímero glicosilado unido por disulfuro que tiene su homología estructural más cercana con la superfamilia de proteínas del factor de crecimiento transformante (TGF). El GDNF fue identificado y purificado mediante el uso de ensayos basados en su eficacia para promover la supervivencia y la estimulación del fenotipo transmisor de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas *in vitro*. *In vivo*, el tratamiento con GDNF exógeno estimula el fenotipo dopaminérgico de las neuronas de la sustancia negra y restaura las deficiencias funcionales inducidas por una axotomía o por neurotoxinas dopaminérgicas en modelos animales de la enfermedad de Parkinson. Aunque originalmente se pensaba que era relativamente específico para las neuronas dopaminérgicas, experimentos posteriores demostraron que el GDNF tiene una eficacia neurotrófica sobre las neuronas colinérgicas del tronco cerebral y de la médula espinal, tanto *in vitro* como *in vivo*.

El GDNF y los ligandos relacionados neurturina, artemina y persefina, mantienen diversas poblaciones de neuronas en el SNC, incluyendo las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y las motoneuronas. La familia de ligandos del GDNF se une a proteínas alfa específicas de la familia de receptores del GDNF, que forman complejos receptores y señalizan a través del receptor de cinasa de tirosina RET. El GDNF también es capaz de señalar directamente a través del receptor alfa, así como a través de la molécula de adhesión celular neural (NCAM) a través de la activación de la Fyn y la FAK.

En el SNC, la expresión del trkA, el receptor del NGF, está limitada prácticamente exclusivamente a las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. Estas neuronas colinérgicas tienen un interés neurológico particular, debido a que la degeneración y/o la distrofia de las células colinérgicas es la característica de la enfermedad de Alzheimer. Las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal pueden ser fácilmente identificadas en preparaciones morfológicas mediante el uso de una histoquímica con acetilcolinesterasa o con una inmunohistoquímica mediante el uso de un anticuerpo contra la acetiltransferasa de colina (ChAT), la enzima sintética de la acetilcolina, o contra el p75.

La enfermedad de Alzheimer es una demencia progresiva caracterizada por una pérdida de la memoria reciente, amnesia, alteraciones en el comportamiento emocional y dificultades para manejar las relaciones espaciales o las capacidades motoras. La enfermedad aparece en todo el mundo y supone entre la mitad y dos tercios de todos los casos de pérdida intelectual al final de la vida en muchos países desarrollados que tienen unas poblaciones con una elevada esperanza de vida.

La enfermedad de Alzheimer es diagnosticada principalmente a través de los síntomas clínicos, después de haber descartado otras causas de demencia. Después de la muerte, el diagnóstico puede ser establecido de forma concluyente mediante la observación de los numerosos y característicos ovillos neurofibrilares y placas seniles en el cerebro que acompañan a la degeneración observada en la enfermedad de Alzheimer.

Se observa una pérdida y una degeneración progresiva específica de la región de células seleccionadas en las áreas de la asociación y de la memoria de la corteza cerebral en la enfermedad de Alzheimer, junto con anomalías en algunos núcleos subcorticales. La pérdida de neuronas afecta especialmente a las grandes células piramidales de las áreas de asociación parietal y frontal, el hipocampo y la amígdala. Las entradas del hipocampo fuertemente afectadas son aquellas de la corteza entorrinal, las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y las neuronas noradrenérgicas del locus cerúleo. El núcleo de Meynert del prosencéfalo basal, a partir del cual surge la principal proyección colinérgica hacia la corteza, también sufre una degeneración grave.

Unas pruebas importantes apuntan a un papel significativo de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal en las alteraciones del comportamiento observadas en los pacientes con Alzheimer. La pérdida de la función colinérgica es uno de los cambios más tempranos de la enfermedad. La magnitud de la deficiencia colinérgica se correlaciona con el grado de deterioro de la memoria, y la mejora de la función colinérgica con inhibidores de la acetilcolinesterasa produce una mejora modesta pero significativa de los síntomas. En animales, las lesiones de las neuronas colinérgicas que inervan el hipocampo y la corteza dan como resultado unas pronunciadas deficiencias en la memoria y cognitivas que son revertidas por los fármacos que mejoran la función colinérgica.

Las neuronas de proyección que producen otros transmisores de monoamina (norepinefrina, serotonina y dopamina) y las neuronas corticales que producen glutamato, ácido gamma-aminobutírico (GABA), somatostatina, neuropéptido Y, factor liberador de corticotropina, sustancia P y otros neuromoduladores, también están afectadas en la enfermedad de Alzheimer.

Mientras que una investigación temprana apuntaba la promesa del NGF como un fármaco para la enfermedad de Alzheimer y para otras neuropatologías, se han observado unos efectos secundarios insostenibles en ensayos clínicos con seres humanos mediante el uso del NGF. La administración sistémica del NGF a bajas dosis para el tratamiento de la neuropatía periférica ha provocado daños musculares graves en algunos pacientes, mientras que los pacientes con Alzheimer tratados con infusiones intracerebroventriculares de NGF experimentaron un dolor periférico muscular rostral similar al notificado con la administración periférica de NGF, y una pérdida de peso significativa.

También se han notificado ensayos clínicos mediante el uso del GDNF para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y han mostrado unos resultados mixtos. La enfermedad de Parkinson es un trastorno en el que una lenta

degeneración de las neuronas productoras de dopamina, fundamentalmente en la ruta nigroestriada, da como resultado un efecto neurológico. La administración intraventricular de GDNF no produjo un beneficio clínico determinable, y se notificaron múltiples efectos secundarios adversos. También se ha usado la administración local de GDNF en el estriado para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Los ensayos clínicos que implicaban una infusión continua y la difusión del GDNF en el putamen dorsal notificaron diferentes resultados, potencialmente debido al menos en parte a diferencias en la dosis y en la administración.

De forma importante, se detectaron anticuerpos neutralizantes anti-GDNF en sueros de diversos pacientes humanos, y en un estudio toxicológico se observó una lesión cerebelosa segmentaria caracterizada por una pérdida las células de Purkinje y granuladas en monos que recibían una infusión de GDNF.

Algunos estudios clínicos que implican una infusión de neurotrofina en el parénquima cerebral de pacientes con una enfermedad neurodegenerativa han usado una infusión continua y se basaban en la difusión del infundido para que alcanzara los tejidos objetivo. Existen numerosas dificultades relacionadas con la administración basada en una difusión, siendo la más crítica el bajo volumen de distribución en los tejidos. Sin ningún medio para monitorizar la distribución de la neurotrofina infundida, es difícil determinar la eficacia terapéutica. Por ejemplo, Gill et al. notificaron en Nat. Med. 9: 5899-595, 2003 que cuando se usó factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) en estudios clínicos como tratamiento para la enfermedad de Parkinson, no estaba claro hasta qué punto difundiría el GDNF lejos de la punta del catéter, y que es posible que porciones más rostrales del putamen contribuyan a la degeneración si no son alcanzadas por la difusión. También averiguaron que, como la dosis de GDNF era creciente, se observó una elevada intensidad de señal en T2 en la imagen por RMN alrededor de la punta del catéter, posiblemente debido al edema vasogénico o a la acumulación de proteínas, lo que requirió una reducción de la dosis y potencialmente comprometió adicionalmente porciones rostrales del putamen.

El documento US 2002/0114780 describe el uso de un agente facilitador con un agente terapéutico con objeto de aumentar el volumen de distribución del agente terapéutico en un tejido durante una administración localizada, por ejemplo, mediante una CED. Cuando el agente terapéutico es el GDNF, el agente facilitador puede ser la heparina.

Continúa existiendo una necesidad de métodos y de composiciones terapéuticas útiles para el tratamiento de los trastornos del SNC, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

Sumario de la invención

La invención radica en parte en el descubrimiento de que la velocidad de aclaramiento tisular de los factores de crecimiento en el tejido del SNC de los mamíferos es menor de lo que se creía previamente. En particular, la presente divulgación establece que los factores de crecimiento infundidos en el parénquima cerebral en un régimen de tratamiento típico son detectables durante hasta aproximadamente 2-6 semanas después de la administración.

Algunos ensayos previos que implican la infusión del factor de crecimiento en el parénquima cerebral para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa han empleado una infusión continua. Sin embargo, como consecuencia de las notablemente bajas velocidades de aclaramiento tisular, la infusión continua del factor de crecimiento es innecesaria para conseguir un nivel terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento en el tejido cerebral objetivo, y la acumulación que resulta de la administración continua puede tener efectos adversos. Por ejemplo, la acumulación del factor de crecimiento en el parénquima cerebral puede dar lugar a una acumulación de la dosis y a una filtración hacia sitios secundarios y al LCR, que tiene el potencial de provocar efectos secundarios indeseables así como respuestas inmunitarias y la consecuente producción de anticuerpos neutralizantes del factor de crecimiento. Dichos anticuerpos neutralizantes anti-GDNF se han observado en los sueros de pacientes que reciben una infusión continua del GDNF en el estriado. Adicionalmente, se ha observado toxicidad celular en sitios secundarios en un estudio animal de toxicidad por GDNF, y se ha observado un flujo del infundido desde el putamen hacia sitios secundarios a través del espacio perivascular en primates.

La presente invención se refiere a conseguir y mantener una dosis terapéutica eficaz del factor del crecimiento en el tejido objetivo del SNC evitando la acumulación de la dosis que da lugar a una sobredosis, para reducir el riesgo de acontecimientos adversos, incluyendo la producción de anticuerpos neutralizantes y el inicio de una respuesta inmunitaria. La invención consigue estos objetivos con los regímenes de administración del factor de crecimiento que contrarrestan las velocidades de aclaramiento tisular previamente no reconocidas, con objeto de proporcionar una dosis terapéutica eficaz sostenida del factor de crecimiento en el tejido del SNC comprometido. Por el contrario, la técnica anterior se esfuerza en regular la dosis terapéutica de los factores de crecimiento mediante el empleo de sensores capaces de detectar la actividad eléctrica indicativa de una degeneración o de una disfunción neuronal, Elsberry et al., U.S. 6.042.579; un parámetro inadecuado de información que no consigue abordar los acontecimientos adversos, tales como los procesos mediados por la inmunidad mencionados anteriormente.

En la invención, el régimen de administración implica una administración intermitente, en el que la administración contrarresta el aclaramiento tisular.

En una realización preferida, la invención implica el método de administración mejorada por convección ("CED"),

preferentemente junto con una cánula de diseño progresivo exenta de reflujo, para la administración del factor de crecimiento a poblaciones celulares comprometidas del SNC. En una realización preferida, la invención implica adicionalmente la administración de un agente trazador junto con el factor de crecimiento, y el agente trazador actúa como un sustituto de la monitorización de la distribución del factor de crecimiento infundido. En una realización
 5 preferida, la invención implica adicionalmente el uso de un agente facilitador, que proporciona un aumento en la movilidad del factor de crecimiento en el parénquima cerebral. Por lo tanto, además de abordar los problemas relacionados con la acumulación del factor de crecimiento, la presente invención supera las limitaciones inherentes a la administración basada en una difusión con los catéteres típicos, particularmente el bajo volumen de distribución tisular, la acumulación en la punta del catéter, el reflujo y la filtración a sitios secundarios y al LCR, y proporciona
 10 una monitorización en tiempo real y una optimización de la administración neuroterapéutica.

De acuerdo con los objetivos establecidos anteriormente, en un aspecto la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un factor neurotrófico para su uso en métodos para la promoción de la supervivencia de una población de neuronas sensible a un factor neurotrófico en el SNC de mamífero. Los métodos comprenden
 15 la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor de crecimiento a la población de neuronas sensible al factor de crecimiento, en los que el factor de crecimiento es administrado a una velocidad que sustancialmente se opone a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, mediante lo cual se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento en el tejido objetivo del SNC. Dicho régimen de administración está diseñado para evitar la acumulación sustancial del factor de crecimiento.

En una realización, el método comprende la etapa de la determinación de la velocidad de aclaramiento del factor de crecimiento que va a ser administrado localmente en una población de neuronas del SNC sensible al factor de crecimiento. En una realización preferida, la etapa de determinación de la velocidad de aclaramiento se lleva a cabo preclínicamente, preferentemente en un primate. En otra realización preferida, la etapa de determinación de la
 20 velocidad de aclaramiento se lleva a cabo mediante la medición de un indicador de la velocidad de aclaramiento en un sujeto humano.

En una realización preferida, la composición farmacéutica es administrable mediante una administración mejorada por convección (CED).
 30

En una realización preferida, la composición farmacéutica es administrable localmente mediante una CED.

En una realización preferida, la CED comprende una velocidad de infusión de entre aproximadamente 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ y aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.
 35

En una realización preferida, la CED comprende una velocidad de infusión mayor de aproximadamente 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 0,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 1,2 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 1,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 2,2 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 2,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 2,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 3 $\mu\text{l}/\text{min}$, así como preferentemente menor de aproximadamente 25 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menor de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menor de aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menor de aproximadamente 12 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menor de aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.
 40
 45

En una realización preferida, la CED comprende aumentos incrementales en el caudal, denominados "escalonamiento", durante la administración. Preferiblemente, el escalonamiento comprende unas velocidades de infusión de entre aproximadamente 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ y aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.
 50

En una realización preferida, el escalonamiento comprende unas velocidades de infusión mayores de aproximadamente 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 0,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 1,2 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 1,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 2,2 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 2,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 2,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 3 $\mu\text{l}/\text{min}$, así como preferentemente menores de aproximadamente 25 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menores de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menores de aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menores de aproximadamente 12 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menores de aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.
 55
 60

En una realización preferida, la composición farmacéutica es administrada con el uso de una cánula de diseño progresivo exenta de reflujo compatible con la CED.

En una realización, la cánula de diseño progresivo es compatible con una administración crónica. Dichas cánulas son preferidas para su uso en el tratamiento de trastornos crónicos del SNC, según se describe en el presente

documento.

En otra realización, la cánula de diseño progresivo es compatible con una administración aguda. Dichas cánulas son preferidas para su uso en el tratamiento de trastornos agudos del SNC, según se describe en el presente documento.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende un agente trazador que proporciona una administración guiada del factor de crecimiento. Preferiblemente, el agente trazador es un agente de contraste para la obtención de imágenes por RMN, denominado a veces en el presente documento "imán de RMN". En una realización preferida, el agente trazador comprende un liposoma. En una realización especialmente preferida, el agente trazador comprende un liposoma que contiene un quelato de gadolinio.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende un agente facilitador, que facilita la administración del factor de crecimiento al tejido objetivo. En una realización preferida, el agente facilitador es una heparina de bajo peso molecular.

En una realización, la composición farmacéutica comprende un neuroterapéutico de alto peso molecular que comprende un factor de crecimiento y un portador. En una realización, el portador es un portador sintético. Hay disponibles para su uso una amplia variedad de portadores sintéticos en los neuroterapéuticos de alto peso molecular de la invención. En una realización preferida, el portador es un liposoma. En otra realización preferida, el portador es una partícula metálica, tal como una partícula de oro, o un polímero. En otra realización, el portador es una composición natural o una variante de la misma. Algunos ejemplos de dichos portadores naturales incluyen partículas víricas, incluyendo partículas víricas modificadas (por ejemplo, aquellas que tienen un perfil modificado de las proteínas de superficie).

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende un factor neurotrófico que se selecciona entre el grupo que consiste en NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6 y también podrían usarse GDNF, CNTF, LIF, IGF-1, b-FGF, neurturina, persefina, artemina, TGF α , TGF β , IGF-2, PDGF, EGF, cardiotropina, EGF, IGF, VEGF, Sonic hedgehog (SHH), BMP, FGF20, VIP, PDGF, pleiotrofina (PTN) y HGF.

Según se describe en el presente documento, la composición farmacéutica puede comprender un ácido nucleico que codifica un factor de crecimiento. En un caso, el factor de crecimiento se selecciona entre el grupo que consiste en NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6, GDNF, CNTF, LIF, IGF-1, b-FGF, neurturina, persefina, artemina, TGF α , TGF β , IGF-2, PDGF, EGF, cardiotropina, EGF, IGF, VEGF, Sonic hedgehog (SHH), BMP, FGF20, VIP, PDGF, pleiotrofina (PTN) y HGF. En un caso, la composición farmacéutica comprende un vector, vector que comprende dicho ácido nucleico que codifica un factor de crecimiento bajo el control de un promotor regulable.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende NGF, o un fragmento activo o una variante del mismo, y la población de neuronas sensible al factor de crecimiento comprende neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal.

En una realización preferida, además del NGF, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un agente bioactivo seleccionado entre el grupo que consiste en agonistas colinérgicos, inhibidores de la colinesterasa tales como clorhidrato de tacrina, neurotrofinas, inductores de la síntesis o de la producción endógena del factor neurotrófico, inductores de la formación de placas amiloides seniles e inductores de la formación del PHF.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende GDNF, o un fragmento activo o una variante del mismo, y la población de neuronas sensible al factor de crecimiento comprende neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende GDNF, o un fragmento activo o una variante del mismo, y la población de neuronas sensible al factor de crecimiento comprende neuronas dopaminérgicas que tienen cuerpos celulares o procesos en el estriado y/o en el mesencéfalo.

En otro caso, la composición farmacéutica comprende VIP, o un fragmento activo o una variante del mismo, y la población de neuronas sensible al factor de crecimiento comprende neuronas dopaminérgicas que tienen cuerpos celulares o procesos en el estriado y/o en el mesencéfalo.

En otro caso, la composición farmacéutica comprende PTN, o un fragmento activo o una variante del mismo, y la población de neuronas sensible al factor de crecimiento comprende neuronas dopaminérgicas que tienen cuerpos celulares o procesos en el estriado y/o en el mesencéfalo.

Se apreciará que en algunas realizaciones, los factores de crecimiento pueden ser administrados en las terminaciones neuronales distantes de los cuerpos celulares.

En otro caso, la composición farmacéutica comprende BMP, o un fragmento activo o una variante de la misma, y la

población de neuronas sensible al factor de crecimiento comprende células de una zona del SNC afectada por un ictus.

5 En la invención, el método comprende una CED intermitente de la composición farmacéutica, en la que las interrupciones son de al menos aproximadamente una semana.

10 En una realización preferida, la administración del factor de crecimiento comprende una interrupción de desde aproximadamente 7 días hasta aproximadamente 45 días, más preferentemente de desde aproximadamente 14 días hasta aproximadamente 45 días, más preferentemente de desde aproximadamente 17 días hasta aproximadamente 35 días, más preferentemente de desde aproximadamente 20 días hasta aproximadamente 35 días después de la administración del factor de crecimiento, interrupción que está seguida por otra administración del factor de crecimiento. En una realización preferida, la administración del factor de crecimiento comprende dos o más de dichas interrupciones.

15 En otro caso, la administración del factor de crecimiento comprende unas interrupciones de menos de 7 días, preferentemente de entre aproximadamente 2 días y aproximadamente 6 días, o de más de 45 días.

20 En una realización preferida, la duración de dos o más de las interrupciones es diferente en un régimen de administración intermitente que comprende tres o más etapas de administración. En una realización preferida, la duración de la interrupción entre las etapas de administración al inicio de un régimen de administración intermitente es sustancialmente más corto que una interrupción entre las etapas de administración posteriores.

25 En una realización, la dosis del factor de crecimiento administrado difiere entre las etapas de administración. En una realización preferida, la dosis del factor de crecimiento administrada en una etapa de administración temprana es mayor que la dosis del factor de crecimiento administrada en una etapa de administración tardía en un régimen de administración intermitente que comprende dos o más etapas de administración.

30 En una realización preferida, la duración de la CED es de entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 12 horas, más preferentemente de entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 6 horas.

En otra realización, la duración de la CED es menor de aproximadamente 30 minutos o mayor de aproximadamente 12 horas.

35 En una realización preferida, la duración de la administración está indicada por el uso de un agente trazador y la monitorización de la distribución del infundido.

40 En un aspecto, la composición farmacéutica para el uso de la invención reduce la muerte de las neuronas sensibles al factor neurotrófico del SNC de mamífero. El uso comprende la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor neurotrófico a una población de neuronas del SNC sensibles al factor de crecimiento que está en riesgo de experimentar una muerte celular en ausencia de intervención, en el que el factor neurotrófico es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor neurotrófico, mediante lo cual se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor neurotrófico en el tejido objetivo del SNC.

45 También se describen métodos para la modulación de la formación de sinapsis por parte de las neuronas sensibles al factor de crecimiento del SNC de mamífero. Los métodos comprenden la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor de crecimiento a una población de neuronas del SNC sensibles al factor de crecimiento, en los que el factor de crecimiento es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, mediante lo cual se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento en el tejido objetivo del SNC y en los que el factor de crecimiento modula la formación de sinapsis por parte de la población de neuronas sensibles al factor de crecimiento.

50 También se describen métodos para la modulación del crecimiento neurítico por parte de las neuronas sensibles al factor de crecimiento del SNC de mamífero. Los métodos comprenden la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor de crecimiento a una población de neuronas del SNC sensibles al factor de crecimiento, en los que el factor de crecimiento es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, mediante lo cual se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento en el tejido objetivo del SNC y en los que el factor de crecimiento modula el crecimiento neurítico de la población de neuronas sensibles al factor de crecimiento.

60 También se describen métodos para el aumento del recambio de neurotransmisores en las neuronas sensibles al factor de crecimiento del SNC de mamífero. Los métodos comprenden la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor de crecimiento a una población de neuronas del SNC sensibles al factor de crecimiento, en los que el factor de crecimiento es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, mediante lo cual se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento en el tejido objetivo del SNC y en los que el factor de crecimiento

aumenta el recambio de neurotransmisores en la población de neuronas sensible al factor de crecimiento.

También se describen métodos para la modulación de la diferenciación fenotípica de las neuronas sensibles al factor de crecimiento del SNC de mamífero. Los métodos comprenden la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor de crecimiento a una población de neuronas del SNC sensibles al factor de crecimiento, en los que el factor de crecimiento es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, mediante lo cual se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento en el tejido objetivo del SNC y en los que el factor de crecimiento modula la diferenciación fenotípica de la población de neuronas sensible al factor de crecimiento.

En la invención, los métodos son para el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno del SNC caracterizado por una muerte y/o una disfunción neuronal. En una realización, el trastorno del SNC es un trastorno crónico. En otra realización, el trastorno del SNC es un trastorno agudo. En una realización preferida, el trastorno del SNC se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, ictus, traumatismo craneal, lesión en la médula espinal, esclerosis múltiple, demencia con cuerpos de Lewy, degeneración de la retina, epilepsia, trastornos psiquiátricos, trastornos del equilibrio hormonal y degeneración coclear. Adicionalmente se contemplan métodos para la reducción de la inflamación que está asociada con un trastorno del SNC caracterizado por una muerte y/o una disfunción neuronal.

Los métodos comprenden la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor neurotrófico a una población de neuronas del SNC sensibles al factor neurotrófico en el paciente, en los que dicha administración del factor neurotrófico es terapéuticamente eficaz en el tratamiento del paciente. El factor neurotrófico es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor neurotrófico, mediante lo cual se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor neurotrófico en el tejido objetivo del SNC.

En las realizaciones en las que se trata un trastorno agudo del SNC, preferentemente existe un punto final en el que se interrumpe la administración.

En un aspecto, los métodos son para el tratamiento de un paciente al que se le ha diagnosticado un trastorno del SNC en sus etapas tempranas, preferentemente antes de su aparición clínica. Los métodos comprenden la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor neurotrófico a una población de neuronas del SNC sensibles al factor neurotrófico en el paciente, en los que dicha administración del factor neurotrófico previene, retrasa o reduce la gravedad de las manifestaciones clínicas asociadas con el trastorno del SNC. El factor neurotrófico es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor neurotrófico, mediante lo cual se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor neurotrófico en el tejido objetivo del SNC.

En un aspecto, los métodos son métodos profilácticos para el tratamiento de un paciente en riesgo de sufrir un trastorno del SNC. Los métodos comprenden la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor neurotrófico a una población de neuronas del SNC sensibles al factor neurotrófico en el paciente, en los que dicha administración del factor neurotrófico previene o retrasa la aparición de un trastorno del SNC, o reduce la gravedad del trastorno del SNC una vez que se ha manifestado. El factor neurotrófico es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor neurotrófico, mediante lo cual se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor neurotrófico en el tejido objetivo del SNC.

Los métodos de tratamiento que incluyen los métodos profilácticos del presente documento implican preferentemente un diagnóstico preoperatorio.

En una realización preferida, el diagnóstico preoperatorio implica un cribado genético. En otra realización preferida, el diagnóstico preoperatorio implica la obtención de neuroimágenes. En una realización, la obtención de neuroimágenes realizada comprende neuroimágenes funcionales. En otra realización, la obtención de neuroimágenes realizada no implica neuroimágenes funcionales. Preferiblemente, la obtención de neuroimágenes realizada implica una PET, una RMN y/o una TC.

Los métodos de tratamiento del presente documento también comprenden preferentemente la obtención de neuroimágenes, preferentemente mediante una RMN, para la localización del objetivo y/o la colocación guiada de la cánula. Preferiblemente se usa un soporte estereotáctico junto con las neuroimágenes para proporcionar la colocación guiada de la cánula en, o cerca de, la población de neuronas objetivo.

Los métodos de tratamiento del presente documento también comprenden preferentemente la obtención de neuroimágenes, preferentemente mediante una RMN junto con un imán de RMN administrado para la monitorización de la distribución del infundido.

En el presente documento se describen composiciones farmacéuticas administrables localmente útiles para el

tratamiento de un trastorno del SNC caracterizado por la muerte y/o la disfunción de una población de neuronas del SNC.

En una realización preferida, la composición farmacéutica es administrable mediante una CED.

- 5 En un caso preferido, la composición farmacéutica comprende un agente trazador.
- En un caso preferido, el agente trazador es un imán de RMN.
- 10 En un caso preferido, el agente trazador comprende un liposoma. En un caso, el agente trazador comprende un liposoma que contiene un imán de RMN, preferentemente un quelato de gadolinio. En otro caso, el agente trazador consiste esencialmente en un liposoma que contiene un imán de RMN, preferentemente un quelato de gadolinio.

En un caso preferido, la composición farmacéutica comprende un agente facilitador.

- 15 En un caso, el agente facilitador es una heparina de bajo peso molecular.
- En otro caso, el factor de crecimiento se selecciona entre el grupo que consiste en NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6, GDNF, CNTF, LIF, IGF-1, b-FGF, neurturina, persefina, artemina, TGF α , TGF β , IGF-2, PDGF, EGF, cardiotropina, EGF, IGF, VEGF, Sonic hedgehog (SHH), BMP, FGF20, VIP, PDGF, pleiotrofina (PTN) y HGF.
- 20

También se describen métodos para la producción de una composición farmacéutica.

- 25 También se describe un dispositivo de administración que comprende una composición farmacéutica según se describe en el presente documento.

También se describe un catéter o una cánula que comprende una composición farmacéutica según se describe en el presente documento.

- 30 También se describe un dispositivo de administración que comprende una bomba que es capaz de efectuar la administración de una composición farmacéutica mediante una CED. En un caso, el dispositivo de administración comprende una bomba que es capaz de efectuar la administración intermitente de una composición farmacéutica mediante una CED. En otro caso, el dispositivo comprende adicionalmente una composición farmacéutica. En un caso adicional, el dispositivo comprende adicionalmente una cánula de diseño progresivo exenta de reflujo compatible con una CED, cánula que es compatible con una administración crónica o aguda.
- 35

También se describen métodos de uso de un factor de crecimiento o de un ácido nucleico que codifica el mismo para la producción de un medicamento útil para el tratamiento de un paciente que tiene un trastorno del SNC caracterizado por una muerte y/o una disfunción neuronal, en el que el medicamento es administrable en el SNC del paciente que tiene un trastorno del SNC a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, en el que el factor de crecimiento o el ácido nucleico que codifica el mismo está presente en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz cuando el medicamento es administrado en el SNC del paciente sin producir una acumulación sustancial del factor de crecimiento en el SNC del paciente. En un caso preferido, el medicamento es administrable mediante una CED. En un caso preferido, el medicamento puede ser administrado de forma intermitente.

40

45

También se describen métodos de uso de un factor de crecimiento o de un ácido nucleico que codifica el mismo para la producción de un medicamento útil para la reducción de la muerte de neuronas sensibles al factor de crecimiento del SNC de mamífero, en el que el medicamento es administrable en el SNC del paciente que tiene un trastorno del SNC a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, en el que el factor de crecimiento o el ácido nucleico que codifica el mismo está presente en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz cuando el medicamento es administrado en el SNC del paciente sin producir una acumulación sustancial del factor de crecimiento en el SNC del paciente. En un caso preferido, el medicamento es administrable mediante una CED. En un caso preferido, el medicamento puede ser administrado de forma intermitente.

50

55

También se describen métodos de uso de un factor de crecimiento o de un ácido nucleico que codifica el mismo para la producción de un medicamento útil para la modulación del crecimiento neurítico por parte de las neuronas sensibles al factor de crecimiento del SNC de mamífero, en el que el medicamento es administrable en el SNC del paciente que tiene un trastorno del SNC a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, en el que el factor de crecimiento o el ácido nucleico que codifica el mismo está presente en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz cuando el medicamento es administrado en el SNC del paciente sin producir una acumulación sustancial del factor de crecimiento en el SNC del paciente. En un caso preferido, el medicamento es administrable mediante una CED. En un caso preferido, el medicamento puede ser administrado de forma intermitente.

60

65

- 5 También se describen métodos de uso de un factor de crecimiento o de un ácido nucleico que codifica el mismo para la producción de un medicamento útil para el aumento del recambio de neurotransmisores en las neuronas sensibles al factor de crecimiento del SNC de mamífero, en el que el medicamento es administrable en el SNC del paciente que tiene un trastorno del SNC a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, en el que el factor de crecimiento o el ácido nucleico que codifica el mismo está presente en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz cuando el medicamento es administrado en el SNC del paciente sin producir una acumulación sustancial del factor de crecimiento en el SNC del paciente. En un caso preferido, el medicamento es administrable mediante una CED. En un caso preferido, el medicamento puede ser administrado de forma intermitente.
- 10 También se describen métodos de uso de un factor de crecimiento o de un ácido nucleico que codifica el mismo para la producción de un medicamento útil para la modulación de la diferenciación fenotípica de las neuronas sensibles al factor de crecimiento del SNC de mamífero, en el que el medicamento es administrable en el SNC del paciente que tiene un trastorno del SNC a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, en el que el factor de crecimiento o el ácido nucleico que codifica el mismo está presente en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz cuando el medicamento es administrado en el SNC del paciente sin producir una acumulación sustancial del factor de crecimiento en el SNC del paciente. En un caso preferido, el medicamento es administrable mediante una CED. En un caso preferido, el medicamento puede ser administrado de forma intermitente.
- 15 También se describen métodos de uso de un factor de crecimiento o de un ácido nucleico que codifica el mismo para la producción de un medicamento útil para el tratamiento de un paciente al que se le ha diagnosticado un trastorno del SNC en sus etapas tempranas, en el que el medicamento es administrable en el SNC del paciente que tiene un trastorno del SNC a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, en el que el factor de crecimiento o el ácido nucleico que codifica el mismo está presente en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz cuando el medicamento es administrado en el SNC del paciente sin producir una acumulación sustancial del factor de crecimiento en el SNC del paciente. En un caso preferido, el medicamento es administrable mediante una CED. En un caso preferido, el medicamento puede ser administrado de forma intermitente.
- 20 También se describen métodos de uso de un factor de crecimiento o de un ácido nucleico que codifica el mismo para la producción de un medicamento útil para el tratamiento profiláctico de un paciente en riesgo de sufrir un trastorno del SNC, en el que el medicamento es administrable en el SNC del paciente que tiene un trastorno del SNC a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, en el que el factor de crecimiento o el ácido nucleico que codifica el mismo está presente en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz cuando el medicamento es administrado en el SNC del paciente sin producir una acumulación sustancial del factor de crecimiento en el SNC del paciente. En un caso preferido, el medicamento es administrable mediante una CED. En un caso preferido, el medicamento puede ser administrado de forma intermitente.
- 25 En un caso, un medicamento comprende adicionalmente un agente trazador.
- 30 En un caso, un medicamento comprende adicionalmente un agente facilitador.
- 35 En un caso, los métodos para la producción de un medicamento implican el uso de un neuroterapéutico de alto peso molecular de la invención que comprende (i) un portador y (ii) un factor de crecimiento o un ácido nucleico que codifica el mismo.
- 40 También se describen kits para el tratamiento de trastornos del SNC, kits que comprenden una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento.
- 45 También se describen kits útiles para la reducción de la muerte de neuronas sensibles al factor de crecimiento del SNC de mamífero, kits que comprenden una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento.
- 50 También se describen kits útiles para la modulación del crecimiento neurítico por parte de las neuronas sensibles al factor de crecimiento del SNC de mamífero, kits que comprenden una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento.
- 55 También se describen kits útiles para un aumento del recambio de los neurotransmisores en las neuronas sensibles al factor de crecimiento del SNC de mamífero, kits que comprenden una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento.
- 60 También se describen kits útiles para la modulación de la diferenciación fenotípica de las neuronas sensibles al factor de crecimiento del SNC de mamífero, kits que comprenden una o más composiciones farmacéuticas de la invención.
- 65

También se describen kits útiles para el tratamiento de un paciente al que se le ha diagnosticado un trastorno del SNC en sus etapas tempranas, kits que comprenden una o más composiciones farmacéuticas de la invención.

5 También se describen kits útiles para el tratamiento profiláctico de un paciente en riesgo de sufrir un trastorno del SNC, kits que comprenden una o más composiciones farmacéuticas de la invención.

10 También se describe un kit que comprende adicionalmente un dispositivo de administración útil para la CED, preferentemente una cánula y más preferentemente una cánula de diseño progresivo exenta de reflujo. En un caso, un kit comprende adicionalmente una bomba útil para la CED.

15 También se describe un método para el tratamiento de un mamífero que tiene un trastorno del sistema nervioso central (SNC). En un caso, el método implica la administración a un mamífero que tiene un trastorno del SNC de una composición farmacéutica tal como un factor de crecimiento, correlacionando la administración de dicha composición farmacéutica con el correspondiente aclaramiento tisular de la composición farmacéutica. En un caso, la composición farmacéutica es administrada mediante el uso de una administración mejorada por convección (CED). En un caso, la composición farmacéutica incluye un agente trazador. En otro caso, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un agente facilitador. En un caso, la composición farmacéutica es administrada de forma intermitente. En un modo, la administración intermitente equilibra el proceso de aclaramiento tisular.

20 Otro aspecto de la descripción es un método para promover la supervivencia de una población de neuronas sensible al factor de crecimiento en el SNC de mamífero. En un caso, el método implica la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor de crecimiento a la población de neuronas sensible al factor de crecimiento, en el que el factor de crecimiento es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, de forma que se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento en el tejido objetivo del SNC. En un modo, la administración no produce una acumulación sustancial del factor de crecimiento. En un caso, el método implica la determinación de la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento que va a ser administrado localmente a una población de neuronas del SNC sensible al factor de crecimiento. En un caso, la determinación de la velocidad de aclaramiento tisular se lleva a cabo preclínicamente en un primate. En otra realización, la determinación de la velocidad de aclaramiento tisular se lleva a cabo mediante la medición de un indicador de la velocidad de aclaramiento en un sujeto humano.

35 Otro aspecto de la descripción es un método para la reducción de la muerte de neuronas sensibles al factor de crecimiento del SNC de mamífero. En un caso, el método implica la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor de crecimiento a una población de neuronas del SNC sensibles al factor de crecimiento que está en riesgo de experimentar una muerte celular en ausencia de intervención, en el que el factor de crecimiento es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, y mediante el cual se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento en el tejido objetivo del SNC.

40 Otro aspecto de la descripción es un método para el tratamiento de un trastorno del SNC. En un caso, el método implica la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor de crecimiento a una población de neuronas del SNC sensibles al factor de crecimiento en el paciente, en el que dicha administración del factor de crecimiento es terapéuticamente eficaz en el tratamiento del paciente. En un caso, el factor de crecimiento es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, mediante lo cual se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento en el tejido objetivo del SNC. En un caso, el trastorno del SNC comprende un trastorno agudo del SNC y la administración es interrumpida en un punto final.

50 Otro aspecto de la descripción es un método para el tratamiento de un paciente al que se le ha diagnosticado un trastorno del SNC en sus etapas tempranas. En un caso, el método implica la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor de crecimiento a una población de neuronas del SNC sensibles al factor de crecimiento en el paciente, en el que dicha administración del factor de crecimiento previene, retrasa o reduce la gravedad de las manifestaciones clínicas asociadas con el trastorno del SNC en etapas tardías en ausencia de un factor de crecimiento administrado. En un caso, el factor de crecimiento es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, mediante lo cual se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento en el tejido objetivo del SNC.

60 Otro aspecto del presente documento es un método profiláctico para el tratamiento de un paciente en riesgo de sufrir un trastorno del SNC. En un caso, el método implica la administración local de una composición farmacéutica que comprende un factor de crecimiento a una población de neuronas del SNC sensibles al factor de crecimiento en el paciente, en el que dicha administración del factor de crecimiento previene o retrasa la aparición de un trastorno del SNC, o reduce la gravedad del trastorno del SNC una vez que se ha manifestado. En un caso, el factor de crecimiento es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, mediante lo cual se consigue una cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento en el tejido objetivo del SNC.

65

Algunos aspectos adicionales de la invención se resaltan en las siguientes porciones de la memoria descriptiva, en la que la descripción detallada es con el fin de divulgar completamente las realizaciones preferidas de la invención sin poner limitaciones a las mismas.

5 Breve descripción de los dibujos

La invención se comprenderá más completamente mediante referencia a los siguientes dibujos, que son únicamente con fines ilustrativos:

- 10 la FIG. 1 y la FIG. 2 son imágenes del cerebro de rata. Se infunde heparina de BPM (1 microgramo/microlitro) con GDNF en el cerebro de rata (el hemisferio izquierdo es infundido con GDNF + heparina de BPM; el hemisferio derecho recibió únicamente GDNF con PBS como control).
 La FIG. 3 es una gráfica que ilustra la expresión del GDNF en diferentes puntos temporales después de la transducción con AAV2-GDNF. El AAV2-GDNF fue infundido en el estriado a diferentes dosis, y las ratas fueron sacrificadas en diferentes puntos temporales para analizar la correlación con el nivel de expresión del GDNF. Los resultados muestran una acumulación gradual del GDNF con el tiempo.
- 15 La FIG. 4 es una imagen de un cerebro de mono tratado según un método de la invención. El GDNF (30 µg/sitio) fue administrado mediante una CED en un lado del cerebro de mono normal. Un sitio objetivo estaba en el caudado y 2 sitios en el putamen. El mono fue sacrificado 3 semanas después. Había presente una significativa proteína GDNF residual. La tinción con TH reveló una fuerte regulación por aumento de las fibras de DA en el lado tratado únicamente con GDNF.
- 20 La FIG. 5 es una gráfica que ilustra los efectos de la administración de 5 µg de neutrina (NTN) en ratas normales a los 4 días. Se observó un significativo aumento en el recambio de la DA después de una única administración. También se observó una aparente sinergia entre la NTN y la heparina.
- 25 La FIG. 6 es una gráfica que ilustra el aclaramiento tisular del GDNF después de una única administración.
 La FIG. 7 es una gráfica que ilustra la regulación de los niveles de DA después de una única administración.
 La FIG. 8 ilustra el AAV2-GDNF infundido (CED) en el estriado de rata a diferentes dosis.
 La FIG. 9 es una gráfica que ilustra la expresión del GDNF en el cerebro de rata en diferentes puntos temporales después de la transducción con AAV2-GDNF. Los valores medios en cada punto temporal se calcularon a partir de 3 hemisferios.
- 30 La FIG. 10 ilustra los parámetros experimentales para la determinación del aclaramiento del NF del cerebro de rata.
 La FIG. 11 es una gráfica que ilustra el aclaramiento de la proteína GDNF en el cerebro de rata después de una infusión semanal mediante una CED. Los valores medios de cada semana se calcularon a partir de 3 ratas (6 hemisferios).
- 35 La FIG. 12 es una gráfica que ilustra el aclaramiento del GDNF después de su infusión intraestriatal en el cerebro de rata.

Descripción detallada de la invención

- 40 La invención se refiere a métodos y a composiciones para la administración local de factores de crecimiento a poblaciones de neuronas sensibles al factor de crecimiento en el SNC de mamífero. La invención radica en parte en el descubrimiento de que el aclaramiento tisular de los factores de crecimiento en el SNC es bajo con respecto a las velocidades a las que normalmente se han administrado previamente factores exógenos de crecimiento. La infusión de un factor de crecimiento a una velocidad mayor que el aclaramiento tisular da como resultado una acumulación innecesaria y potencialmente tóxica del factor de crecimiento. En la presente invención se lleva a cabo la administración del factor de crecimiento a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular, para evitar la acumulación tóxica del factor de crecimiento y conseguir unos niveles en el tejido objetivo que se mantengan en una ventana terapéuticamente eficaz con el tiempo. En la invención se lleva a cabo la administración intermitente del factor de crecimiento.
- 45
- 50

El fenómeno del bajo aclaramiento tisular no está limitado a un factor de crecimiento o a una región cerebral en particular. Consecuentemente, el beneficio asociado con los presentes métodos de administración no está limitado a un factor de crecimiento en particular, a una población de neuronas del SNC en particular o a una indicación en particular. En principio, dada la capacidad para administrar una gran diversidad de factores de crecimiento a una gran diversidad de poblaciones de neuronas del SNC, puede tratarse cualquier indicación caracterizada por la muerte y/o la disfunción de una población de neuronas que sea sensible al factor de crecimiento, o pueda ser compensada funcionalmente por parte de una población de neuronas sensible al factor de crecimiento.

60 Administración del factor de crecimiento

Según se usa en el presente documento con respecto a la invención, "factor de crecimiento" significa un factor neurotrófico.

- 65 Se han administrado diversos factores de crecimiento mediante diversos medios en un intento de tratar diversas enfermedades neurodegenerativas. Para una revisión, véase, por ejemplo, Dawbarn et al., *Neuropathol and App.*

Neurobiol, 29: 211-230, 2003. La presente invención proporciona un medio nuevo para la administración de factores de crecimiento a poblaciones de neuronas sensibles al factor de crecimiento en estas enfermedades con una eficacia mejorada. En particular, la invención proporciona métodos y composiciones para la administración de factores de crecimiento a poblaciones de neuronas objetivo a una velocidad que contrarresta las velocidades de aclaramiento tisulares para conseguir una dosis terapéutica eficaz sostenida sin unos efectos adversos indeseados.

En los métodos de la invención, el factor de crecimiento es administrado a una velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento. Por "velocidad que se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular" se entiende una velocidad de administración que es aproximadamente contraria a la velocidad de aclaramiento tisular. La velocidad se refiere a la cantidad de factor de crecimiento con el tiempo. La velocidad de administración no tiene por qué contrarrestar de forma exacta la velocidad de aclaramiento tisular, y la cantidad de factor de crecimiento en el tejido objetivo no tiene por qué permanecer constante. Por ejemplo, en la invención, la administración implica la administración intermitente del factor de crecimiento. Se apreciará que dichos protocolos de administración darán como resultado diversas cantidades del factor de crecimiento en el tejido objetivo, con un máximo aproximadamente al comienzo de una interrupción y un mínimo aproximadamente al final de una interrupción. Lo que se contempla en los presentes métodos es una velocidad de administración que proporciona el mantenimiento de una cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento (en una ventana terapéutica) en un tejido objetivo con el tiempo. Al considerar la velocidad de aclaramiento determinada empíricamente de un factor de crecimiento en particular en un tejido objetivo, el experto en la materia puede determinar fácilmente una velocidad de administración apropiada sin una experimentación excesiva.

La velocidad de administración del factor de crecimiento en los presentes métodos está indicada por la velocidad de aclaramiento tisular del factor de crecimiento, y se opone sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular. La velocidad de administración deseada del factor de crecimiento puede conseguirse con una administración continua o intermitente y unas concentraciones apropiadas del factor de crecimiento. La CED es el medio de administración en la presente invención, con la administración intermitente de una composición farmacéutica que tiene una concentración apropiada del factor de crecimiento. Sin embargo, en algunos casos, puede llevarse a cabo la administración a una velocidad de infusión menor de 0,5 µl/min y puede realizarse un régimen de administración que comprende la administración intermitente con unas interrupciones muy cortas (días, horas, minutos) e incluso puede realizarse la administración continua con las concentraciones apropiadas del factor de crecimiento de forma que la velocidad de administración se oponga sustancialmente a la velocidad de aclaramiento tisular.

Por "acumulación sustancial" o "acumulación perjudicial" del factor de crecimiento se entiende la consecución de una cantidad del factor de crecimiento que es mayor que la mínima cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento y capaz de producir unos efectos perjudiciales indeseables, que normalmente está bastante por encima de la cantidad terapéutica máxima eficaz del factor de crecimiento (es decir, es mayor que la cantidad techo eficaz del factor de crecimiento) durante un periodo de tiempo. Por "administración intermitente" se entiende una administración discontinua. De acuerdo con la invención, el factor de crecimiento en particular es administrado según disminuye su nivel en el tejido objetivo con objeto de mantener una cantidad terapéuticamente eficaz del factor en el tejido objetivo. El factor de crecimiento es infundido en la población objetivo durante un periodo de tiempo, normalmente de desde aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 12 horas, más preferentemente de desde aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 6 horas, punto en el cual cesa la administración. La duración de la administración estará indicada por un agente trazador en las realizaciones preferidas. Durante la administración, el nivel del factor de crecimiento en el tejido objetivo aumenta. Preferiblemente, el cese de la administración se produce cuando se consigue la dosis terapéutica eficaz máxima (el techo de la dosis terapéutica) en el tejido objetivo. Aunque es menos preferido, el cese de la administración puede producirse cuando se ha sobrepasado la dosis terapéutica eficaz máxima. Preferiblemente, el cese de la administración se produce cuando el infundido está distribuido a lo largo de la sustancial totalidad del tejido objetivo, como puede monitorizarse con un agente trazador según se divulga en el presente documento. Preferiblemente, el cese de la administración se produce mientras el infundido permanece sustancialmente confinado en el tejido objetivo. Después del cese, los mecanismos de aclaramiento tisular actúan para disminuir lentamente el nivel del factor de crecimiento en el tejido objetivo. La administración se repite cuando el factor de crecimiento en el tejido objetivo está disminuyendo, preferentemente mientras permanece una cantidad terapéuticamente eficaz de factor de crecimiento en el tejido objetivo, más preferentemente cuando el factor de crecimiento está por encima o ligeramente por encima de la mínima cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento. Aunque es menos preferido, la administración puede repetirse cuando el factor de crecimiento está por debajo de la mínima cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento. En una realización, no se mantiene una dosis terapéuticamente eficaz de forma continua sin interrupción.

En una realización preferida, la administración del factor de crecimiento comprende una interrupción de entre aproximadamente 7 días y aproximadamente 45 días, más preferentemente de entre aproximadamente 14 días y aproximadamente 45 días, más preferentemente de entre aproximadamente 17 días y aproximadamente 35 días, más preferentemente de entre aproximadamente 20 días y aproximadamente 35 días después de la administración del factor de crecimiento, interrupción que esta seguida por otra administración del factor de crecimiento. En una realización preferida, la administración del factor de crecimiento comprende dos o más de dichas interrupciones.

En otro caso, la administración del factor de crecimiento comprende unas interrupciones de menos de aproximadamente 7 días o de más de aproximadamente 45 días.

En los métodos del presente documento, los factores de crecimiento son administrados localmente a una población de neuronas objetivo sensible al factor de crecimiento en el SNC de mamífero mediante el método de la CED. Por "CED" se entiende una infusión a una velocidad mayor de 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$. En una realización preferida, el factor de crecimiento es administrado mediante una CED a través de un catéter o de una cánula apropiados, preferentemente una cánula de diseño progresivo exenta de reflujo. En una realización preferida, el método de la CED se lleva a cabo con una cánula de diseño progresivo exenta de reflujo compatible con una CED. Véase Krauze et al., J. Neurosurg., 103: 923-929, 2005. Véase también la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. nº 2007/0088295 A1 y 2006/0135945 A1. El método implica el posicionamiento de la punta de la cánula al menos en una estrecha proximidad al tejido objetivo. Después de haber posicionado la cánula, se conecta a una bomba que administra el factor de crecimiento a través de la punta de la cánula al tejido objetivo. Se mantiene un gradiente de presión desde la punta de la cánula durante la infusión.

Por "próximo a" a la población objetivo se entiende a una distancia eficaz de la población objetivo. En particular, con respecto al posicionamiento de la cánula con respecto al tejido objetivo, proximidad se refiere a una distancia tal que el infundido alcanzará el tejido objetivo. Como el medio más preferido de administración de una composición farmacéutica es una CED, la proximidad en la mayoría de los casos del presente documento se refiere a estar a una distancia del tejido objetivo que es alcanzada por la CED de la composición farmacéutica.

En una realización preferida, una cánula de diseño progresivo exenta de reflujo está unida a una bomba que extrae el factor de crecimiento de un recipiente y produce una presión suficiente para causar que el factor de crecimiento fluya a través del catéter hacia el tejido objetivo a unas velocidades controladas. Puede usarse cualquier caudal adecuado de forma que la presión intracraneal se mantenga a unos niveles adecuados, de forma que no se lesione el tejido cerebral. Puede usarse más de una única cánula.

La penetración del factor de crecimiento en el tejido objetivo está facilitada en gran medida por una presión de infusión positiva durante un periodo de horas. La penetración está aumentada adicionalmente por el uso de un agente facilitador, tal como una heparina de bajo peso molecular. Adicionalmente, la inclusión de un agente trazador, preferentemente de un imán de RMN, proporciona la monitorización en tiempo real de la penetración tisular por parte del infundido e indica el cese de la administración.

De esta forma puede administrarse cualquier cantidad adecuada del factor de crecimiento. Las cantidades adecuadas son las cantidades que son terapéuticamente eficaces, y por lo tanto capaces de provocar una respuesta en las neuronas sensibles al factor de crecimiento en el tejido objetivo, sin provocar una sobreadundancia de efectos secundarios indeseables. Normalmente, la cantidad del factor de crecimiento será de entre aproximadamente 1 μg y aproximadamente 1.000 μg , más preferentemente de entre aproximadamente 1 μg y aproximadamente 500 μg , más preferentemente de entre aproximadamente 1 μg y aproximadamente 250 μg , más preferentemente de entre aproximadamente 1 μg y aproximadamente 100 μg . En una realización especialmente preferida, la cantidad del factor de crecimiento es de entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 100 μg . En una realización preferida, la CED comprende una velocidad de infusión de entre aproximadamente 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ y aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

En una realización preferida, la CED comprende una velocidad de infusión mayor de aproximadamente 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 0,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 1,2 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 1,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 2,2 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 2,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 2,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayor de aproximadamente 3 $\mu\text{l}/\text{min}$, así como preferentemente menor de aproximadamente 25 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menor de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menor de aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menor de aproximadamente 12 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menor de aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

En una realización preferida, la CED comprende aumentos incrementales en el caudal, denominados "escalonamiento", durante la administración. Preferiblemente, el escalonamiento comprende unas velocidades de infusión de entre aproximadamente 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ y aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

En una realización preferida, el escalonamiento comprende unas velocidades de infusión mayores de aproximadamente 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 0,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 1,2 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 1,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 2,2 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 2,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 2,7 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente mayores de aproximadamente 3 $\mu\text{l}/\text{min}$, así como preferentemente menores de aproximadamente 25 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menores de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, más

preferentemente menores de aproximadamente 15 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menores de aproximadamente 12 $\mu\text{l}/\text{min}$, más preferentemente menores de aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

5 Para enseñanzas adicionales del método de CED, véase, por ejemplo, Saito et al., Exp. Neurol., 196: 3891-389, 2005; Krauze et al., Exp. Neurol., 196: 104-111, 2005; Krauze et al., Brain Res. Brain Res. Protocol., 16: 20-26, 2005; la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. nº 2006/0073101; la Patente de EE.UU. nº 5.720.720.

10 Los presentes métodos de tratamiento implican preferentemente una o más determinaciones diagnósticas preoperatorias para la evaluación de la presencia o del riesgo de un trastorno del SNC. "Trastorno del SNC", según se usa en el presente documento, se refiere a trastornos del SNC de mamífero caracterizados por la muerte y/o la disfunción de una o más poblaciones de neuronas. Algunos trastornos del SNC incluyen trastornos crónicos, tales como enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, así como trastornos agudos, tales como el ictus. Se conocen muchos biomarcadores asociados con varios trastornos del SNC. Por ejemplo, véase Henley et al., Curr. Opin. Neurol., 18: 698-705, 2005. La determinación diagnóstica realizada incluye preferentemente la obtención de neuroimágenes. Por ejemplo, véase Mathis et al., Arch. Neurol., 62: 196-200, 2005. En una realización preferida, la determinación diagnóstica implica una prueba genética.

20 Los métodos también implican preferentemente la obtención de imágenes preoperatorias para definir estereotácticamente la ubicación de la población de neuronas objetivo.

25 En una realización muy preferida, los métodos comprenden adicionalmente la obtención de imágenes durante la administración con objeto de monitorizar el posicionamiento de la cánula. En una realización, el método comprende el uso de un sistema de neuronavegación, por ejemplo, véase la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. nº 2002/0095081. En una realización preferida, los métodos comprender adicionalmente la obtención de neuroimágenes para monitorizar la distribución del infundido.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de un trastorno del SNC.

30 En una realización preferida, la invención proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los métodos comprenden la administración del NGF, o de un fragmento activo o una variante del mismo, localmente y preferentemente intermitentemente, en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal.

35 En una realización preferida, la invención proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los métodos comprenden la administración del GDNF, o de un fragmento activo o una variante del mismo, localmente y preferentemente intermitentemente, en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal.

40 En una realización preferida, la invención proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Los métodos comprenden la administración del GDNF, o de un fragmento activo o una variante del mismo, localmente y preferentemente intermitentemente, en el estriado y/o en el mesencéfalo.

En una realización preferida, la invención proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Los métodos comprenden la administración del VIP, o de un fragmento activo o una variante del mismo, localmente y preferentemente intermitentemente, en el estriado y/o en el mesencéfalo.

45 En una realización preferida, la invención proporciona métodos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Los métodos comprenden la administración de la PTN, o de un fragmento activo o una variante de la misma, localmente y preferentemente intermitentemente, en el estriado y/o en el mesencéfalo.

50 En una realización preferida, la invención proporciona métodos para el tratamiento de ictus. Los métodos comprenden la administración de la BMP, o de un fragmento activo o una variante de la misma, localmente y preferentemente intermitentemente, en la zona del SNC afectada por el ictus.

55 La Tabla 1 proporciona una lista de los factores de crecimiento que pueden usarse en la presente invención para producir los efectos deseados en diversas poblaciones de neuronas objetivo. Esta descripción es a modo de ejemplo y no pretende ser limitante.

60 De forma más general, la Tabla 2 proporciona una lista de los factores de crecimiento que generalmente son capaces de producir unos efectos beneficiosos, tales como una supervivencia, un crecimiento neurítico y un mantenimiento fenotípico, en los tipos particulares de neuronas indicados. Está descripción es a modo de ejemplo y no pretende ser limitante.

65 La dosis del factor de crecimiento administrado está determinada por el factor de crecimiento en particular, por la densidad del tejido objetivo, por el volumen del tejido objetivo y por la velocidad de aclaramiento tisular. Normalmente, la cantidad de factor de crecimiento será de entre aproximadamente 1 μg y aproximadamente 1.000 μg , más preferentemente de entre aproximadamente 1 μg y aproximadamente 500 μg , más preferentemente de entre aproximadamente 1 μg y aproximadamente 250 μg , más preferentemente de entre aproximadamente 1 μg y

aproximadamente 100 µg. En una realización especialmente preferida, la cantidad de factor de crecimiento es de entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 100 µg. En una realización preferida, después de una interrupción de entre aproximadamente 7 días y aproximadamente 45 días, más preferentemente de entre aproximadamente 14 días y aproximadamente 45 días, más preferentemente de entre aproximadamente 17 días y aproximadamente 35 días, más preferentemente de entre aproximadamente 20 días y aproximadamente 35 días, si fuera necesario, se repite la administración a una dosis diseñada de nuevo para mantener una cantidad terapéuticamente eficaz del factor de crecimiento en el tejido sin que se produzca una acumulación perjudicial.

En una realización preferida, la administración del factor de crecimiento comprende dos o más de dichas interrupciones.

En una realización preferida, la duración de una interrupción que se produce de forma tardía es más larga que la duración de una interrupción que se produce de forma temprana en un régimen de administración que comprende tres o más etapas de administración.

En una realización preferida, la dosis del factor de crecimiento que es administrada en una administración temprana es mayor que la dosis del factor de crecimiento administrada en una administración tardía en un régimen de administración que comprende dos o más etapas de administración.

Se contempla adicionalmente que el factor de crecimiento sea administrado junto con una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. Por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, dicho segundo agente terapéutico puede incluir:

agonistas colinérgicos, particularmente aquellos específicos del SNC y no de los músculos periféricos, inhibidores de la colinesterasa tales como clorhidrato de tacrina, neurotrofinas tales como NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), inhibidores de la formación de placas amiloides seniles, inhibidores de la formación de PHF e inductores de la síntesis o de la producción del factor neurotrófico endógeno.

Los productos de la proteína del factor de crecimiento según esta invención pueden ser aislados o generados mediante cualquier medio conocido por los expertos en la materia.

Los productos de la proteína del factor de crecimiento naturales pueden ser aislados a partir de una preparación de células neuronales de mamífero, o a partir de una línea de células de mamífero que secretan o que expresan el factor de crecimiento. Por ejemplo, la Publicación Internacional PCT nº WO93/06116, describe el aislamiento del GDNF a partir del crecimiento exento de suero en medio condicionado de células de glioblastoma B49. Los productos de la proteína del GDNF también pueden ser sintetizados químicamente mediante cualquier medio conocido por los expertos en la materia. Los productos de la proteína del GDNF también son producidos preferentemente a través de técnicas recombinantes debido a que son susceptibles de conseguir unas cantidades comparativamente mayores de proteína con una mayor pureza. Las formas de los productos recombinantes de la proteína del GDNF incluyen formas glicosiladas y no glicosiladas de la proteína, y la proteína expresada en sistemas celulares de bacterias, de mamífero o de insecto.

En general, las técnicas recombinantes implican el aislamiento de los genes responsables de la codificación del factor de crecimiento, la clonación del gen en los vectores y tipos celulares adecuados, la modificación del gen si fuera necesario para que codifique una variante deseada, y la expresión del gen con objeto de que produzca el producto de la proteína del factor de crecimiento. Alternativamente, puede sintetizarse químicamente una secuencia de nucleótidos que codifica el producto de la proteína del factor de crecimiento deseado. Se contempla que el producto de la proteína del factor de crecimiento pueda ser expresado mediante el uso de secuencias de nucleótidos que difieren en el uso de los codones debido a la degeneración del código genético o a variantes alélicas.

En algunos casos, el factor de crecimiento es administrado en forma de un ácido nucleico codificante que puede ser expresado en una célula transducida. En un caso, se administra un neuroterapéutico de alto peso molecular a un paciente, en el que el neuroterapéutico de alto peso molecular comprende un ácido nucleico que codifica un factor de crecimiento, en el que el ácido nucleico es expresado en una célula transducida del SNC del paciente y se produce el factor de crecimiento codificado. Por lo tanto, el factor de crecimiento es producido *in situ*. Los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de los factores de crecimiento de la invención son bien conocidos en la materia.

En un ejemplo preferido, el ácido nucleico que codifica un factor de crecimiento es regulable *in situ*. En un caso, se administra una composición farmacéutica que comprende un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un factor de crecimiento bajo el control de un promotor regulable. Se apreciará que la expresión regulable de un ácido nucleico que codifica un factor de crecimiento proporciona la administración intermitente del factor de crecimiento.

Una composición de infundido terapéutico es un volumen de composición farmacéutica que va a ser administrado

mediante una CED en una única administración. El volumen de infundido estará determinado ampliamente por el tejido objetivo y su volumen. Algunos volúmenes típicos serán de entre aproximadamente 10 µl y aproximadamente 10 cc, aunque pueden usarse volúmenes mayores y menores.

- 5 El término "tejido objetivo" se refiere a un objetivo físico (habitualmente anatómico) en el SNC que comprende una población de neuronas de interés.

10 Un agente trazador es detectable preferentemente mediante imágenes de resonancia magnética (RMN) o mediante una tomografía computerizada de rayos X. La distribución del agente trazador es monitorizada y usada como medida indirecta de la distribución del factor de crecimiento o del neuroterapéutico de alto peso molecular. Esta monitorización se lleva a cabo para verificar que el factor de crecimiento está alcanzando el tejido objetivo y consiguiendo una concentración eficaz en el mismo, y para detectar una administración no deseada del infundido en un tejido no objetivo.

- 15 En una realización preferida, un agente trazador está separado del factor de crecimiento. El agente trazador es distribuido de una forma que se correlaciona con la del factor de crecimiento, y por lo tanto es un indicador indirecto de la distribución del factor de crecimiento.

20 En una realización preferida, el agente trazador y el factor de crecimiento están, cada uno, en forma de composiciones portadoras, que confieren unas características de distribución muy similares a los mismos.

25 En una realización muy preferida, el agente trazador y el factor de crecimiento están en forma de composiciones liposómicas. Los agentes trazadores basados en liposomas son unos indicadores indirectos muy precisos de la distribución de los neuroterapéuticos de alto peso molecular basados en liposomas.

30 El acto de "monitorizar" se refiere a la obtención de imágenes sucesivas del agente trazador con el tiempo. Mediante la monitorización de la distribución del agente trazador, puede determinarse la localización y el volumen de distribución del neuroterapéutico de alto peso molecular en el tejido en cualquier momento durante el proceso de infusión. Las imágenes sucesivas pueden obtenerse a cualquier velocidad hasta la velocidad máxima a la que pueda obtener imágenes el instrumento de imagen. Por ejemplo, las imágenes sucesivas pueden obtenerse a unos intervalos que varían desde unos pocos milisegundos hasta horas, pero más normalmente a unos intervalos de minutos, tales como a unos intervalos de 1, 2, 5, 10, 15, 20 o 30 minutos. El intervalo entre las imágenes sucesivas puede variarse durante la infusión. En algunos casos, puede ser deseable la obtención de imágenes a unos intervalos cortos (por ejemplo, cada 5, 10 o 15 segundos) al comienzo del proceso de infusión, para detectar el reflujo a lo largo de la cánula o para verificar que el infundido está entrando en el tejido objetivo deseado. Una vez que se ha confirmado la administración en el sitio apropiado, los intervalos entre imágenes pueden alargarse y usarse las imágenes para seguir el proceso de infusión.

40 En un aspecto, la invención proporciona métodos de tratamiento que comprenden la administración de una composición farmacéutica de la invención mediante una CED, en los que la composición farmacéutica comprende un agente trazador, la monitorización de la distribución del agente trazador según se mueve a través del SNC y el cese de la administración de la composición farmacéutica cuando el neuroterapéutico de alto peso molecular es distribuido en un volumen predeterminado en el SNC. El movimiento del agente trazador a través del tejido sólido puede ser monitorizado mediante una técnica de imagen tal como una imagen por resonancia magnética (RMN) o una tomografía computerizada de rayos X (TC). El agente trazador tiene una movilidad en el tejido del SNC que es sustancialmente similar a la del agente terapéutico, y la administración es suspendida cuando se observa que el agente trazador alcanza una región deseada o consigue un volumen de distribución deseado, o alcanza o se aproxima o supera los bordes del tejido objetivo.

50 El volumen predeterminado puede corresponderse con una región en particular del cerebro. El volumen de distribución predeterminado es "sustancialmente similar" al volumen de distribución observado para un agente trazador que está siendo monitorizado para seguir la infusión. "Sustancialmente similar" se refiere a una diferencia en volumen de menos del 20 %. Más preferentemente, la diferencia en volumen es menor del 15 %, más preferentemente menor del 10 %, más preferentemente menor del 5 %. Mediante la monitorización de la distribución del agente trazador, puede suspenderse la infusión cuando se alcance el volumen de distribución predeterminado.

60 El volumen de distribución puede ser determinado, por ejemplo, mediante el uso de un programa informático de imágenes que es habitual en la materia, por ejemplo, iFLOW™. Véase también, por ejemplo, Krautze et al., Brain Res. Protocols, 16: 20-26, 2005; y Saito et al., Exp. Neurol., 196: 3891-389, 2005.

Variantes del factor de crecimiento

65 El término "variante del factor de crecimiento" según se usa en el presente documento incluye polipéptidos en los que se han delecionado ("variantes de deleción"), insertado ("variantes de adición") o sustituido ("variantes de sustitución") residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del factor de crecimiento natural. Dichas variantes se preparan mediante la introducción de los apropiados cambios de nucleótidos en el ADN que codifica el

polipéptido, o mediante una síntesis química *in vitro* del polipéptido deseado. Los expertos en la materia apreciarán que pueden realizarse muchas combinaciones de deleciones, inserciones y sustituciones siempre que la molécula final sea biológicamente activa.

- 5 El término "biológicamente activa" según se usa en el presente documento significa que el fragmento de la variante muestra unas propiedades similares, pero no necesariamente todas las mismas propiedades y no necesariamente en el mismo grado, que el factor de crecimiento en el que está basado.

10 Las técnicas de mutagénesis para la sustitución, la inserción o la deleción de uno o más residuos de aminoácidos seleccionados son bien conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, Patente de EE.UU. nº 4.518.584). Existen dos variables principales en la construcción de variantes: la localización del sitio de la mutación y la naturaleza de la mutación. Para el diseño de las variantes del factor de crecimiento, la selección del sitio de la mutación y la naturaleza de la mutación dependerán de la(s) característica(s) del factor de crecimiento que se va a modificar. Los sitios de la mutación pueden ser modificados individualmente o en serie, por ejemplo, mediante (1) la sustitución en primer lugar con deleciones de aminoácidos conservativas, y después con deleciones más radicales dependiendo de los resultados conseguidos (2) la deleción del residuo de aminoácido objetivo, o (3) la inserción de residuos de aminoácidos adyacentes al sitio localizado. Se prefieren los cambios conservativos de entre 1 y 20 aminoácidos. Una vez que se ha determinado la secuencia de aminoácidos del producto de la proteína del factor de crecimiento deseado, se determina fácilmente la secuencia de ácidos nucleicos que se va a usar en la expresión de la proteína. También pueden generarse variantes de deleción N-terminales y C-terminales mediante enzimas proteolíticas.

25 Para las variantes de deleción del factor de crecimiento, las deleciones varían generalmente entre aproximadamente 1 y 30 residuos, más habitualmente entre aproximadamente 1 y 10 residuos y normalmente entre aproximadamente 1 y 5 residuos contiguos. Se contemplan deleciones N-terminales, C-terminales e intrasecuencia internas. Las deleciones pueden ser introducidas en regiones de baja homología con otros miembros de la familia para modificar la actividad de un factor de crecimiento en particular. Es más probable que las deleciones en áreas con una homología sustancial con otras secuencias de la familia modifiquen más significativamente la actividad biológica del factor de crecimiento en particular. El número de deleciones consecutivas se seleccionará de forma que se preserve la estructura terciaria del producto de la proteína del factor de crecimiento en el dominio afectado.

30 Algunos ejemplos de variantes incluyen los divulgados en las Patentes de EE.UU. nº 6.723.701; 6.468.970; 6.440.702; 5.741.778; 5.731.284; 5.830.857; 5.733.875.

35 Para las variantes de adición del factor de crecimiento, las adiciones en la secuencia de aminoácidos normalmente incluyen fusiones N- y/o C-terminales con una longitud variable desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como adiciones intrasecuencia internas de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Las adiciones internas pueden variar generalmente entre aproximadamente 1 y 10 residuos, más normalmente desde aproximadamente 1 hasta 5 residuos y habitualmente desde aproximadamente 1 hasta 3 residuos de aminoácidos. Algunos ejemplos de variantes de adición N-terminales incluyen un factor de crecimiento con un residuo N-terminal de metionilo (un artefacto de la expresión directa del GDNF en un cultivo de células bacterianas recombinantes) y la fusión de una secuencia de señalización heteróloga N-terminal con el N-terminal del factor de crecimiento para facilitar la secreción del factor de crecimiento maduro desde las células hospedadoras recombinantes. Dichas secuencias de señalización generalmente se obtendrán a partir, y serán homólogas, de la especie de célula hospedadora prevista. Las adiciones también pueden incluir secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de otros factores de crecimiento.

50 Las variantes de sustitución del factor de crecimiento tienen al menos un residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos del factor de crecimiento eliminado, y se ha insertado un residuo diferente en su lugar. Dichas variantes de sustitución incluyen variantes alélicas, que se caracterizan por cambios en las secuencias de nucleótidos naturales en la población de la especie que pueden dar como resultado o no un cambio en un aminoácido.

55 Las mutaciones específicas en la secuencia de aminoácidos del factor de crecimiento pueden implicar modificaciones en un sitio de glicosilación (por ejemplo, serina, treonina o asparragina). La ausencia de glicosilación o únicamente una glicosilación parcial es el resultado de la sustitución o de la deleción de aminoácidos en un sitio de reconocimiento de glicosilación unido a asparragina o en cualquier sitio de la molécula que es modificado mediante la adición de un carbohidrato unido por O. Un sitio de reconocimiento de glicosilación unido a asparragina comprende una secuencia tripeptídica que es reconocida específicamente por las apropiadas enzimas celulares de glicosilación. Estas secuencias tripeptídicas son Asn-Xaa-Thr o Asn-Xaa-Ser, en las que Xaa puede ser cualquier aminoácido distinto a la Pro. Varias sustituciones o deleciones de aminoácidos en una o en ambas de la primera o de la tercera posición de aminoácido de un sitio de reconocimiento glicosilación (y/o la deleción de aminoácidos en la segunda posición) dan como resultado una no glicosilación en la secuencia tripeptídica modificada. Por lo tanto, la expresión de las apropiadas secuencias de nucleótidos alteradas produce variantes que no están glucosiladas en ese sitio. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos del factor de crecimiento puede ser modificada para añadir sitios de glicosilación.

Un método para la identificación de los residuos de aminoácidos del factor de crecimiento o de las regiones para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por cribado de alanina" según describen Cunningham y Wells (Science, 244: 1081-1085, 1989). En este método se identifica un residuo de aminoácido o un grupo de residuos objetivo (por ejemplo, residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o con carga negativa (lo más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el entorno acuoso circundante en, o en el exterior de, la célula. Aquellos dominios que muestren una sensibilidad funcional a las sustituciones se refinarán a continuación mediante la introducción de residuos alternativos o adicionales en los sitios de sustitución. Por lo tanto, se determina el sitio objetivo para la introducción de una variación en la secuencia de aminoácidos, se lleva a cabo un cribado de alanina o una mutagénesis aleatoria sobre el correspondiente codón o región objetivo de la secuencia de ADN, y las variantes del factor de crecimiento expresadas se criban para encontrar la combinación óptima de actividad y grado de actividad deseados.

Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen sitios en los que los aminoácidos encontrados en un factor de crecimiento en particular en diversas especies son sustancialmente diferentes en términos de volumen de la cadena lateral, carga y/o hidrofobicidad. Otros sitios de interés son aquellos en los que las proteínas relacionadas con los residuos del factor de crecimiento en particular, obtenidas a partir de diversas especies, son idénticas. Dichas posiciones son generalmente importantes para la actividad biológica de una proteína. Inicialmente, estos sitios son sustituidos de una forma relativamente conservativa. Dichas sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 3 en el encabezamiento de sustituciones a modo de ejemplo. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales (sustituciones a modo de ejemplo) y/o pueden llevarse a cabo otras adiciones o deleciones, y cribarse los productos resultantes para comprobar su actividad.

Se espera que las modificaciones conservativas de la secuencia de aminoácidos (y las correspondientes modificaciones en las secuencias de ácidos nucleicos codificantes) produzcan productos de proteínas del factor de crecimiento que tengan unas características funcionales y químicas similares a las del correspondiente factor de crecimiento natural. Por el contrario, pueden llevarse a cabo modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de los productos de proteínas del factor de crecimiento mediante la selección de las sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o en hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrofóbicos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) neutros hidrófilos: Cys, Ser, Thr;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) residuos que afectan a la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro. Dichos residuos sustituidos pueden ser introducidos en regiones de la proteína del factor de crecimiento que son homólogas con otras proteínas de factores de crecimiento, o en las regiones no homólogas de la molécula.

Derivados del factor de crecimiento

Los derivados de factor de crecimiento modificados químicamente o las variantes del factor de crecimiento pueden ser preparados por el experto en la materia dadas las divulgaciones del presente documento. Las fracciones químicas más adecuadas para la derivatización incluyen polímeros solubles en agua. Un polímero soluble en agua es deseable debido a que la proteína a la que está unido no precipita en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. Preferiblemente, el polímero será farmacéuticamente aceptable para la preparación de un producto o de una composición terapéutica. El experto en la materia será capaz de seleccionar el polímero deseado basándose en dichas consideraciones según se vaya a usar el conjugado de polímero/proteína terapéuticamente, y si es así, la dosis deseada, el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis y otras consideraciones. La eficacia de la derivatización puede averiguarse mediante la administración del derivado, en la forma deseada (es decir, mediante una bomba osmótica, o, más preferentemente, mediante una inyección o una infusión, o, adicionalmente formulada para la vía de administración oral, pulmonar u otras) y determinando su eficacia.

Algunos polímeros solubles en agua adecuados incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetil celulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (tanto homopolímeros como copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxetilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la elaboración debido a su estabilidad en agua.

El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede estar ramificado o sin ramificar. Para el polietilenglicol, el peso molecular preferido es de entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa para facilitar su manipulado y elaboración (indicando el término "aproximadamente" que en las preparaciones de polietilenglicol, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular establecido). Pueden usarse otros tamaños, dependiendo del perfil terapéutico deseado (por ejemplo, la duración de la liberación sostenida deseada, los efectos, si los hay, sobre la actividad biológica, la facilidad de manipulación, el grado o la ausencia de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol sobre una proteína o una variante terapéutica).

El número de moléculas de polímero así unidas puede variar, y el experto en la materia será capaz de averiguar el efecto sobre la función. Se puede mono-derivatizar, o se puede proporcionar una di-, tri-, tetra- o alguna combinación de derivatización, con unas propiedades químicas iguales o diferentes (por ejemplo, polímeros, tales como diferentes pesos de polietilenglicoles). La proporción entre las moléculas de polímero y las moléculas de la proteína (o el péptido) variará, así como sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la proporción óptima (en términos de eficacia de reacción en la que no hay ningún exceso de proteína o de polímero sin reaccionar) estará determinada por factores tales como el grado de derivatización deseado (por ejemplo, mono, di-, tri-, etc.), el peso molecular del polímero seleccionado, si el polímero está ramificado o sin ramificar, y las condiciones de la reacción.

Las moléculas de polietilenglicol (u otras fracciones químicas) deben estar unidas a la proteína con respecto a los efectos sobre los dominios funcional o antigénico de la proteína. Existen diversos métodos de unión disponibles para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, el documento EP 0 401 384, (acoplamiento de PEG a G-LCR), véase también Malik et al., Exp. Hematol. 20: 1028-1035 (1992) (que notifica la pegilación de GM-LCR mediante el uso de cloruro de tresilo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede ser unido covalentemente a través de residuos de aminoácidos a través de un grupo reactivo, tal como un grupo amino o carboxilo libre. Los grupos reactivos son aquellos a los que puede unirse una molécula activada de polietilenglicol. Los residuos de aminoácidos que tienen un grupo amino libre pueden incluir residuos de lisina y el residuo del aminoácido N-terminal. Aquellos que tienen un grupo carboxilo libre pueden incluir residuos de ácido aspártico, residuos de ácido glutámico y el residuo del aminoácido C-terminal. También puede usarse un grupo sulfhidrilo como grupo reactivo para la unión de la(s) molécula(s) de polietilenglicol. Con fines terapéuticos, se prefiere la unión en un grupo amino, tal como la unión en el N-terminal o en el grupo de lisina. Debería evitarse la unión a residuos importantes para la unión al receptor si se desea una unión al receptor.

Se puede desear específicamente una proteína codificada químicamente en el N-terminal. Para el uso de polietilenglicol como ilustración de las presentes composiciones, se puede seleccionar entre diversas moléculas de polietilenglicol (según el peso molecular, la ramificación, etc.), la proporción entre las moléculas de polietilenglicol y las moléculas de la proteína (o el péptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación que se va llevar a cabo y el método para la obtención de la proteína pegilada N-terminalmente seleccionada. El método de obtención de la preparación pegilada N-terminalmente (es decir, la separación de esta fracción de otras fracciones monopegiladas si fuera necesario) puede ser la purificación del material pegilado N-terminalmente a partir de una población de moléculas de proteínas pegiladas. La modificación química selectiva N-terminal puede llevarse a cabo mediante una alquilación reductora que explota la diferente reactividad de los diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina con respecto al N-terminal) disponibles para la derivatización en una proteína en particular. En las condiciones de reacción apropiadas, se consigue una derivatización sustancialmente selectiva de la proteína en el N-terminal con un polímero que contiene un grupo carbonilo. Por ejemplo, se puede pegilar selectivamente N-terminalmente la proteína llevando a cabo la reacción a un pH que permita aprovechar las diferencias en el pKa entre el grupo ϵ -amino de los residuos de lisina y el del grupo α -amino del residuo N-terminal de la proteína. Mediante dicha derivatización selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua a una proteína: la conjugación con el polímero tiene lugar predominantemente en el N-terminal de la proteína, y no se produce una modificación significativa de otros grupos reactivos, tales como los grupos amino de la cadena lateral de lisina. Mediante el uso de una alquilación reductora, el polímero soluble en agua puede ser del tipo descrito anteriormente y debería tener un único aldehído reactivo para el acoplamiento de la proteína. Puede usarse propionaldehído de polietilenglicol, que contiene un único aldehído reactivo.

La presente invención contempla el uso de los derivados que son factores de crecimiento expresados en procariontes, o variantes de los mismos, unidos a al menos una molécula de polietilenglicol, así como el uso del factor de crecimiento, o de variantes del mismo, unido a una o más moléculas de polietilenglicol a través de un enlace acilo o alquilo.

La pegilación puede llevarse a cabo mediante cualquier reacción de pegilación conocida en la materia. Véase, por ejemplo: Focus on Growth Factors, 3 (2): 4-10 (1992); el documento EP 0 154 316; el documento EP 0 401 384; y las demás publicaciones mencionadas en el presente documento que se relacionan con la pegilación, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. La pegilación puede llevarse a cabo a través de una reacción de acilación o de una reacción de alquilación con una molécula reactiva de polietilenglicol (o un polímero reactivo análogo soluble en agua).

La pegilación por acilación implica generalmente la reacción de un derivado de éster activo de polietilenglicol (PEG)

con el factor de crecimiento o la variante. Puede usarse cualquier molécula reactiva conocida o descubierta posteriormente de PEG para llevar a cabo la pegilación de la proteína del factor de crecimiento o de una variante. Un éster de PEG activado preferido es PEG esterificado con N-hidroxisuccinimida ("NITS"). Según se usa en el presente documento, se contempla que "acilación" incluya sin limitación los siguientes tipos de enlaces entre la proteína terapéutica y un polímero soluble en agua tal como PEG: amida, carbamato, uretano y similares. Véase Bioconjugate Chem., 5: 133-140 (1994). Las condiciones de la reacción pueden seleccionarse entre cualquiera de las conocidas en la técnica de pegilación o aquellas desarrolladas posteriormente, pero deberían evitarse condiciones tales como una temperatura, un disolvente y un pH que inactiven el factor de crecimiento o la variante que se va a modificar.

La pegilación por acilación dará como resultado generalmente una proteína o una variante del factor de crecimiento poli-pegilada. Preferiblemente, el enlace de conexión será una amida. También preferentemente, el producto resultante estará sustancialmente únicamente (por ejemplo, > 95 %) mono-, di- o tripegilado. Sin embargo, pueden formarse algunas especies con grados mayores de pegilación en unas cantidades que dependen de las condiciones específicas de reacción usadas. Si se desea, pueden separarse más especies pegiladas purificadas de la mezcla, particularmente especies sin reaccionar, mediante las técnicas de purificación estándar, que incluyen, entre otras, diálisis, precipitación salina, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel y electroforesis.

La pegilación por alquilación implica generalmente la reacción de un derivado aldehído terminal de PEG con la proteína o la variante del factor de crecimiento en presencia de un agente reductor. La pegilación por alquilación también puede dar como resultado una proteína o una variante del factor de crecimiento poli-pegilada. Además, se pueden manipular las condiciones de reacción para favorecer la pegilación sustancialmente únicamente en el grupo α -amino N-terminal de la proteína o de la variante del factor de crecimiento (es decir, una proteína mono-pegilada). En cualquier caso, tanto de una monopegilación como de una polipegilación, los grupos de PEG están unidos a la proteína preferentemente a través de un grupo $-\text{CH}_2-\text{NH}-$. Con referencia particular al grupo $-\text{CH}_2-$, este tipo de enlace se denomina en el presente documento enlace "alquilo".

La derivatización a través de una alquilación reductora para producir un producto monopegilado explota la diferente reactividad de los diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina con respecto al N-terminal) disponibles para la derivatización. La reacción se lleva a cabo a un pH que permite aprovechar las diferencias en el pKa entre los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina y el del grupo α -amino del residuo N-terminal de la proteína. Mediante dicha derivatización selectiva se controla la unión de un polímero soluble en agua que contiene un grupo reactivo tal como un aldehído, a una proteína: la conjugación con el polímero tiene lugar predominantemente en el N-terminal de la proteína y no se produce una modificación significativa de los demás grupos reactivos, tales como los grupos amino de la cadena lateral de lisina. En un aspecto importante, la presente invención contempla el uso de una preparación sustancialmente homogénea de moléculas conjugadas de monopolímero/proteína (o variantes) del factor de crecimiento (lo que significa que la proteína o la variante del factor de crecimiento a la que se ha unido la molécula del polímero está sustancialmente únicamente (es decir, > 95 %) en una única ubicación). Más específicamente, si se usa polietilenglicol, la presente invención también incluye el uso de la proteína o de la variante pegilada del factor de crecimiento que posiblemente carece de grupos de unión antigénicos y que tiene la molécula de polietilenglicol acoplada directamente a la proteína o a la variante del factor de crecimiento.

Por lo tanto, los productos de la proteína del factor de crecimiento actualmente preferidos según la presente invención son la proteína o a la variante de los factores de crecimiento pegilados, en los que el (los) grupo(s) de PEG está(n) unido(s) a través de grupos acilo o alquilo. Como se ha analizado anteriormente, dichos productos pueden estar mono-pegilados o poli-pegilados (por ejemplo, que contienen 2-6 y preferentemente 2-5, grupos de PEG). Los grupos de PEG están unidos generalmente a la proteína en los grupos de aminoácidos α - o ϵ -, pero también se contempla que los grupos de PEG pueden estar unidos a cualquier grupo amino unido a la proteína que sea lo suficientemente reactivo como para quedar unido a un grupo de PEG en unas condiciones de reacción estables.

Las moléculas de polímero usadas en ambas metodologías de acilación y de alquilación pueden seleccionarse entre polímeros solubles en agua como se ha descrito anteriormente. El polímero seleccionado debería estar modificado para que tenga un único grupo reactivo, tal como un éster activo para la acilación o un aldehído para la alquilación, preferentemente, de forma que pueda controlarse el grado de polimerización según se prevé en los presentes métodos. Un ejemplo de aldehído de PEG reactivo es el propionaldehído de polietilenglicol, que es estable en agua, o alcoxi o ariloxi C1-C10 monoderivados del mismo (véase la Patente de EE.UU. nº 5.252.714). El polímero puede estar ramificado o sin ramificar. Para las reacciones de acilación, el (los) polímero(s) seleccionado(s) debería(n) tener un único grupo éster reactivo. Para la presente alquilación reductora, el (los) polímero(s) seleccionado(s) debería(n) tener un único grupo aldehído reactivo. Generalmente, el polímero soluble en agua soluble no se seleccionará a partir de residuos de glicosilo naturales, dado que estos son habitualmente elaborados más convenientemente por sistemas de expresión recombinante de mamífero. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede estar ramificado o sin ramificar.

Un polímero soluble en agua particularmente preferido para su uso en el presente documento es el polietilenglicol.

Según se usa en el presente documento, se entiende que el polietilenglicol engloba cualquiera de las formas del PEG que se han usado para la derivatización de otras proteínas, tales como mono- alcoxi- o ariloxi- (C1-C10) polietilenglicol.

5 En general, la derivatización química puede llevarse a cabo en cualquier condición adecuada usada para la reacción entre una sustancia biológicamente activa y una molécula de un polímero activada. Los métodos para la preparación de la proteína o a la variante pegilada del factor de crecimiento comprenderán generalmente las etapas de (a) hacer reaccionar una proteína o una variante del factor de crecimiento con polietilenglicol (tal como un éster reactivo o un aldehído derivado de PEG) en unas condiciones en las cuales la proteína quede unida a uno o más grupos de PEG
10 y (b) la obtención del (los) producto(s) de la reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación serán determinadas caso por caso basándose en los parámetros conocidos y en el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor sea la proporción de PEG:proteína, mayor será el porcentaje de producto poli-pegilado.

15 La alquilación reductora para la producción de una población sustancialmente homogénea de una molécula conjugada de la proteína (o de la variante) del mono-polímero/factor de crecimiento comprenderá generalmente las etapas de: (a) la reacción de una proteína o de una variante del factor de crecimiento con una molécula reactiva de PEG en unas condiciones de alquilación reductora, a un pH adecuado para permitir la modificación selectiva del grupo α -amino en el amino terminal de dicha proteína o de la variante del factor de crecimiento; y (b) la obtención del
20 (los) producto(s) de la reacción.

Para una población sustancialmente homogénea de moléculas conjugadas de la proteína (o de la variante) del mono-polímero/factor de crecimiento, las condiciones de reacción de la alquilación reductora son aquellas que permiten la unión selectiva de la fracción del polímero soluble en agua al N-terminal de la proteína o de la variante
25 del factor de crecimiento. Dichas condiciones de reacción proporcionan generalmente unas diferencias en el pKa entre los grupos amino de la lisina y el grupo α -amino en el N-terminal (siendo el pKa el pH al cual el 50 % de los grupos amino están protonados y el 50 % no lo están). El pH también afecta a la proporción entre el polímero y la proteína que se va a usar. En general, si el pH es menor, se deseará un gran exceso de polímero con respecto a la proteína (es decir, cuanto menos reactivo sea el grupo α -amino N-terminal, más polímero será necesario para
30 conseguir unas condiciones óptimas). Si el pH es mayor, no es necesario que la proporción entre el polímero y la proteína sea grande (es decir, hay disponibles más grupos reactivos, por lo que se necesitan menos moléculas de polímero). Para los fines de la presente invención, el pH estará generalmente en el intervalo de 3-9, preferentemente de 3-6.

35 Otra consideración importante es el peso molecular del polímero. En general, cuanto mayor sea el peso molecular del polímero, menos moléculas de polímero pueden ser unidas a la proteína. De forma análoga, debería tenerse en cuenta la ramificación del polímero para optimizar estos parámetros. Generalmente, cuanto mayor sea el peso molecular (o haya más ramificaciones), mayor será la proporción de polímero:proteína. En general, para las reacciones de pegilación contempladas en el presente documento, el peso molecular medio preferido es de entre
40 aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa. El peso molecular medio preferido es de entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, particularmente preferentemente de entre aproximadamente 12 kDa y aproximadamente 25 kDa. La proporción entre el polímero soluble en agua y la proteína o la variante del GDNF será generalmente de entre 1:1 y 100:1, preferentemente (para la polipegilación) de entre 1:1 y 20:1 y (para la monopegilación) de entre 1:1 y 5:1.

45 Mediante el uso de las condiciones indicadas anteriormente, la alquilación reductora proporcionará la unión selectiva del polímero a cualquier proteína o variante del factor de crecimiento que tenga un grupo α -amino en el amino terminal y proporciona una preparación sustancialmente homogénea del conjugado de la proteína (o de la variante) del monopolímero/factor de crecimiento. El término "conjugado de la proteína (o la variante) del monopolímero/factor de crecimiento" se usa aquí para significar una composición formada por una única molécula de polímero unida a una molécula de una proteína del factor de crecimiento o a una variante de la proteína del factor de crecimiento. El conjugado de la proteína (o la variante) del monopolímero/factor de crecimiento tendrá preferentemente una molécula de polímero ubicada en el N-terminal, pero no en los grupos amino laterales de la lisina. La preparación será preferentemente mayor de un 90 % de conjugado de la proteína (o la variante) del monopolímero/factor de
50 crecimiento y más preferentemente mayor de un 95 % de conjugado de la proteína (o la variante) del monopolímero/factor de crecimiento, quedando el resto de las moléculas observables sin reaccionar (es decir, proteínas que carecen de la fracción polimérica).

60 Para la presente alquilación reductora, el agente reductor debería ser estable en solución acuosa, y preferentemente ser capaz de reducir únicamente la base de Schiff formada en el proceso inicial de la alquilación reductora. Los agentes reductores preferidos pueden seleccionarse entre borhidruro de sodio, cianoborhidruro de sodio, dimetilamina borano, trimetilamina borano y piridina borano. Un agente reductor particularmente preferido es el cianoborhidruro de sodio. Otros parámetros de la reacción, tales como el disolvente, los tiempos de reacción, las temperaturas, etc. y los medios para la purificación de los productos, pueden ser determinados caso por caso
65 basándose en la información publicada relativa a la derivatización de proteínas con polímeros solubles en agua (véanse las publicaciones mencionadas en el presente documento).

Composiciones farmacéuticas del factor de crecimiento

Las composiciones farmacéuticas del factor de crecimiento normalmente incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto proteico de un factor de crecimiento en una mezcla con uno o más materiales de formulación farmacéutica y fisiológicamente aceptables. Algunos materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes, conservantes, colorantes, agentes diluyentes, agentes emulsionantes, agentes suspensores, disolventes, agentes de relleno, agentes de volumen, tampones, vehículos para la administración, diluyentes y excipientes. Por ejemplo, un vehículo adecuado puede incluir agua, solución salina fisiológica o LCR artificial, posiblemente complementado con otros materiales. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mixta con albúmina sérica son algunos ejemplos adicionales de vehículos.

Una vez que se ha formulado la composición terapéutica, puede ser almacenada en viales estériles en forma de una solución, de una suspensión, de un gel, de una emulsión, de un sólido o de un polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden ser almacenadas tanto en una forma lista para su uso como en una forma, por ejemplo, liofilizada, que requiere su reconstitución antes de la administración.

La formulación farmacéutica óptima será determinada por el experto en la materia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) páginas 1435-1712. El régimen de dosificación final implicado en un método para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente será determinado por el médico responsable, teniendo en consideración diversos factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la edad, el estado, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el momento de la administración y otros factores clínicos. Según se vayan realizando estudios surgirá información adicional relativa a los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento de diversas enfermedades e infecciones.

La composición farmacéutica puede incluir normalmente una cantidad eficaz del respectivo factor de crecimiento junto con un portador farmacéuticamente aceptable y, además, puede incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, diluyentes, etc. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente ni de otro modo indeseable, es decir, el material puede ser administrado a un individuo junto con el agente seleccionado sin causar ningún efecto biológico o indeseable ni interactuar de una forma perjudicial con cualquiera de los demás componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

En una realización preferida, el factor neurotrófico se selecciona entre el grupo que consiste en NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6, GDNF, neurturina, persefina y artemina.

En una realización preferida, una composición farmacéutica es administrable localmente en el SNC de mamífero mediante una CED.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende un agente trazador.

Un agente trazador comprende preferentemente un ion paramagnético para su uso con una RMN. Algunos iones metálicos adecuados incluyen aquellos que tienen los números atómicos 22-29 (incluidos), 42, 44 y 58-70 (incluidos) y tienen los estados de oxidación de +2 o +3. Algunos ejemplos de dichos iones metálicos son cromo (III), manganeso (II), hierro (II), hierro (III), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), praseodimio (III), neodimio (III), samario (III), gadolinio (III), terbio (III), disprosio (III), holmio (III), erbio (III) e iterbio (III).

En una realización preferida, el agente trazador comprende un imán de RMN que puede ser usado junto con una RMN para la monitorización de la distribución de la composición farmacéutica infundida.

En una realización preferida, el imán de RMN es un quelato de gadolinio.

En una realización preferida, el agente trazador comprende un liposoma, que comprende un imán de RMN. En una realización preferida, el imán de RMN es un quelato de gadolinio.

En las realizaciones en las que se usan imágenes de rayos X (tales como la TC) para monitorizar la CED, el trazador puede comprender un material radiopaco. Los materiales radiopacos adecuados son bien conocidos e incluyen compuestos de yodo, compuestos de bario, compuestos de galio, compuestos de talio y similares. Algunos ejemplos específicos de materiales radiopacos incluyen bario, diatrizoato, aceite etiodizado, citrato de galio, ácido yocármico, ácido yocetámico, yodamida, yodipamida, ácido yodoxámico, yogulamida, yohexol, yopamidol, ácido yopanoico, ácido yoprocémico, ácido yosefámico, ácido yosérico, yosulamida meglumina, ácido yosumético, yotasul, ácido yotétrico, ácido yotalámico, ácido yotróxico, ácido yoxáglico, ácido yoxotriroico, ipodato, meglumina, metrizamida, metrizoato, propiliodona y cloruro taloso.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende un agente facilitador. Un agente facilitador es capaz de facilitar la administración del factor de crecimiento en el tejido objetivo, preferentemente cuando se administran tanto el agente facilitador como el factor de crecimiento mediante una CED. En una realización

preferida, un agente facilitador es una biomolécula que es eliminada eficazmente del tejido. En una realización preferida, un agente facilitador tiene una semivida corta con respecto al factor de crecimiento. En una realización preferida, un agente facilitador es capaz de competir con el factor de crecimiento por la unión a los sitios de unión del factor de crecimiento en el parénquima cerebral, sitios de unión que son distintos a los receptores correspondientes del factor de crecimiento. Para una descripción adicional de los agentes facilitadores, véase el documento U.S. 2002/0114780.

Un agente facilitador especialmente preferido para su uso en la presente invención es una heparina de bajo peso molecular. La heparina de bajo peso molecular (heparina de BPM) aumenta eficazmente el volumen de distribución del GDNF infundido, tiene una amplia ventana terapéutica y es más segura que la heparina de alto peso molecular (que puede causar una hemorragia a la misma dosis). Cuando se infunde heparina de BPM (1 microgramo/microlitro) con el GDNF se observa una amplia mejora en la distribución del GDNF (FIGS. 1 y 2). La heparina de alto peso molecular es una forma no fraccionada con un intervalo de peso molecular de 5.000 -35.000 daltons.

Neuroterapéuticos de alto peso molecular

En una realización, los factores de crecimiento se proporcionan como neuroterapéuticos de alto peso molecular. Las composiciones neuroterapéuticas de alto peso molecular de la invención comprenden un factor de crecimiento y un portador. En un aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden neuroterapéuticos de alto peso molecular. Para más información relativa a los neuroterapéuticos de alto peso molecular, véase la solicitud de patente provisional de EE.UU. con número de serie 60/795.371 depositada el 26 de abril de 2006, y la solicitud de patente provisional de EE.UU. con número de serie 60/900.492 depositada el 9 de febrero de 2007.

Los neuroterapéuticos de alto peso molecular de la invención tienen un peso molecular mayor de aproximadamente 200 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 500 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 1.000 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 1.500 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 2.000 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 2.500 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 3.000 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 3.500 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 4.000 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 4.500 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 5.000 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 5.500 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 6.000 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 6.500 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 7.000 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 7.500 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 8.000 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 8.500 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 9.000 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 9.500 kDa, más preferentemente mayor de aproximadamente 10.000 kDa.

En una realización, un neuroterapéutico de alto peso molecular de la invención tiene un diámetro o una longitud mayor de aproximadamente 10 nm, más preferentemente mayor de aproximadamente 20 nm, más preferentemente mayor de aproximadamente 30 nm, más preferentemente mayor de aproximadamente 40 nm, más preferentemente mayor de aproximadamente 50 nm, más preferentemente mayor de aproximadamente 60 nm, más preferentemente mayor de aproximadamente 70 nm, más preferentemente mayor de aproximadamente 80 nm, más preferentemente mayor de aproximadamente 90 nm, más preferentemente mayor de aproximadamente 100 nm, más preferentemente mayor de aproximadamente 110 nm, más preferentemente mayor de aproximadamente 120 nm. En algunas realizaciones, un neuroterapéutico de alto peso molecular de la invención tiene un diámetro o una longitud mayor de aproximadamente 130 nm, o mayor de aproximadamente 140 nm, o mayor de aproximadamente 150 nm, o mayor de aproximadamente 160 nm, o mayor de aproximadamente 170 nm, o mayor de aproximadamente 180 nm, o mayor de aproximadamente 190 nm, o mayor de aproximadamente 200 nm.

En una realización, el portador es un portador sintético.

Hay disponible una amplia variedad de portadores sintéticos para su uso en los neuroterapéuticos de alto peso molecular de la invención. En una realización preferida, el portador es un liposoma. En otra realización preferida, el portador es una partícula metálica, tal como una partícula de oro, o un polímero. Con respecto a los portadores, véase, por ejemplo, Felgner et al., *Ann N Y Acad Sci.*, 27 de noviembre de 1995; 772: 126-39; Ramsay et al., *Curr Drug Deliv.*, octubre de 2005; 2 (4): 341-51; Allen et al., *Anticancer Agents Med Chem.*, noviembre de 2006; 6 (6): 513-23; Mitra et al., *Curr Pharm Des.* 2006; 12 (36): 4729-49.

En una realización, el portador es una composición natural o una variante de la misma. Algunos ejemplos de dichos portadores incluyen partículas víricas, incluyendo partículas víricas modificadas (por ejemplo, aquellas que tienen un perfil modificado de las proteínas de superficie). Por ejemplo, véase de Jonge, et al., *Gene Therapy* (2006) 13, 400-411.

En una realización, el neuroterapéutico de alto peso molecular es mayor que un virus AAV.

En una realización, el neuroterapéutico de alto peso molecular tiene un peso molecular mayor que un virus AAV.

En una realización, el neuroterapéutico de alto peso molecular comprende un portador distinto al AAV.

5 *Kits*

Se describen kits que comprenden una o más composiciones farmacéuticas de la invención. En un caso, un kit comprende adicionalmente un dispositivo de administración útil para la CED, preferentemente una cánula y más preferentemente una cánula de diseño progresivo exenta de reflujo. En un caso, un kit comprende adicionalmente una bomba útil para la CED. Los kits pueden comprender adicionalmente partes de conexión, tubos, material de envasado, prospectos con instrucciones y otros materiales útiles para llevar a cabo el tratamiento de un trastorno del SNC.

15 *Recopilación de datos*

En el presente documento se describen métodos para la recopilación de los datos obtenidos a partir de la monitorización basada en imágenes de la distribución del infundido según es administrado a pacientes que tienen un trastorno del SNC. Los datos pueden incluir, pero no se limitan a, el volumen de infundido, el volumen de distribución, la distribución neuroanatómica, la ubicación neuroanatómica de una población objetivo, datos genéticos, los parámetros de infusión, los parámetros de la cánula y los datos de colocación de la cánula. En un caso es una base de datos que comprende dichos datos. En un caso, la base de datos es útil para la derivación de algoritmos que describen la distribución del infundido en el SNC de un paciente que tiene un trastorno del SNC y puede usarse para modelar una administración terapéutica.

25 *Dispositivos de administración*

También se describe un dispositivo de administración que comprende una bomba que es capaz de administrar una composición farmacéutica, preferentemente mediante una CED, preferentemente mediante una CED intermitente. El dispositivo comprende, o se usa junto con, un catéter o una cánula que facilita la administración localizada en una población de neuronas del SNC. Preferiblemente se usa una cánula de diseño progresivo exenta de reflujo compatible con la CED que es compatible con una administración crónica o aguda. En un caso preferido, el dispositivo comprende adicionalmente una composición farmacéutica.

Para su uso puede ser apropiado cualquier dispositivo de administración mejorado por convección. En un caso preferido el dispositivo es una bomba osmótica o una bomba de infusión. Ambas bombas osmótica y de infusión están disponibles en el mercado en diversos proveedores, por ejemplo, Alzet Corporation, Hamilton Corporation, Alza, Inc., Palo Alto, Calif.).

El catéter o la cánula es insertado en el tejido del SNC en el sujeto elegido. El experto en la materia podría determinar fácilmente qué área general del SNC es un objetivo apropiado. Por ejemplo, para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, el estriado es un área objetivo adecuada del cerebro. Hay disponibles mapas estereotácticos y dispositivos de posicionamiento, por ejemplo, en ASI Instruments, Warren, Mich. El posicionamiento también puede llevarse a cabo mediante el uso de mapas anatómicos obtenidos mediante imágenes de una TC y/o de una RMN del cerebro del sujeto, para ayudar a guiar el dispositivo de inyección hacia el objetivo.

En una realización muy preferida, el método de la CED se lleva a cabo con una cánula de diseño progresivo exenta de reflujo compatible con una CED. Dichas cánulas más preferidas se divulgan en Krauze et al., J Neurosurg., noviembre de 2005; 103 (5): 923-9.

50 *Tratamiento de trastornos del SNC.*

El tratamiento da generalmente como resultado una reducción o una prevención de la gravedad o de los síntomas del trastorno del SNC en el sujeto, es decir, una mejora en el estado del sujeto o un "efecto terapéutico". Por lo tanto, el tratamiento puede reducir la gravedad o prevenir uno o más síntomas del trastorno del SNC, inhibir la progresión o el empeoramiento del trastorno del SNC y en algunos casos, revertir el trastorno del SNC.

Según se usa en el presente documento, el término "mejora" significa una mejora en el estado del sujeto, una reducción en la gravedad de la afección o una inhibición en la progresión o el empeoramiento de la afección.

En el caso de un trastorno agudo del SNC, el tratamiento mejorará el estado del sujeto hasta un punto final clínico, que puede ser la mejora del trastorno, la recuperación completa o parcial del trastorno, punto en el cual preferentemente se interrumpe la administración del factor de crecimiento.

Un trastorno agudo del SNC es aquel que puede ser tratado de forma eficaz con la administración del factor de crecimiento de forma que mejora el estado del sujeto hasta un punto clínico en el que puede interrumpirse la

administración. Algunos ejemplos de trastornos agudos del SNC pueden incluir un ictus y un traumatismo del SNC, aunque dependiendo de la gravedad, el ictus y el traumatismo pueden considerarse trastornos crónicos del SNC que requieren un tratamiento crónico (administración crónica del factor de crecimiento).

5 Los métodos de la invención para el tratamiento de un sujeto son aplicables para la profilaxis o la prevención de un trastorno del SNC en un sujeto en riesgo de sufrir un trastorno del SNC, o para prevenir la aparición clínica en un sujeto al que se le ha diagnosticado un trastorno del SNC en una etapa temprana.

10 Los métodos de la invención para el tratamiento de un sujeto también pueden estar complementados con otras formas de terapia. Algunas terapias complementarias incluyen un tratamiento farmacológico, un cambio en la dieta, etc. Las terapias complementarias pueden ser administradas antes de, junto con o después de los métodos de tratamiento de la invención. El artesano experto puede averiguar fácilmente las terapias que pueden usarse en un régimen junto con los métodos de tratamiento de la invención.

15 Debería apreciarse que las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse tanto para aplicaciones veterinarias como humanas, y que el término "paciente" no debería interpretarse de una forma limitante.

20 Ejemplos

20 Ejemplo 1: EXPRESIÓN DEL GDNF EN EL ESTRIADO DE RATA DESPUÉS DE UNA CED del AAV2-GDNF

Se infundió AAV2-GDNF en el estriado en diferentes dosis, y las ratas fueron sacrificadas en puntos temporales diferentes para analizar la acumulación de la expresión del GDNF. El GDNF se midió mediante un ELISA.

25

AAV2-GDNF (de Avigen) = 1,1 e13 vg/ml (PBS + un 0,001 % de pluronic F68)

Se eligieron 3 dosis diferentes:

30

15 ml # máx. = 1,65 e11vg [1,1 e13 vg/ml]
 15 ml # ½ log = 9,07 e10vg [6,05 e12 vg/ml]
 15 ml # log -1 = 1,65 e10vg [1,1 e12 vg/ml]

7 ratas por punto temporal:

35

grupo A: hemisferio izquierdo de 4 ratas: máx. / hemisferio derecho: ½ log [3 para ELISA, 1 para IHC]
 grupo B: hemisferio izquierdo de 3 ratas: log⁻¹ / hemisferio derecho: AAV2-LacZ (control) [3 para ELISA]
 CED - velocidad de infusión: 0,2 µl/min = 11 min
 0,5 µl/min = 8 min
 0,8 µl/min = 11 min
 15 µl 30 min

40

Los resultados se proporcionan en la Tabla 4 y en la FIG. 3, que muestran una acumulación gradual del GDNF con el tiempo.

45 Ejemplo 2: EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA PROTEÍNA GDNF EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La administración de una única dosis de GDNF en el putamen de mono dio como resultado unos niveles tisulares prolongados del GDNF que pueden durar más de varias semanas (FIG. 4).

50

Con objeto de comprender la frecuencia y el nivel de dosis de la administración local del GDNF con una administración mejorada por convección (CED), se ha establecido la relación entre la administración de una única dosis y la semivida tisular y los efectos biológicos (FIG. 4). También se realizan opcionalmente estudios adicionales con monos MPTP con una evaluación funcional e imágenes de PET para la caracterización adicional de la farmacocinética del GDNF administrado localmente en monos PD.

55

Su realiza un estudio para averiguar la dosis en monos Rhesus normales para establecer la magnitud y la duración de la respuesta de una forma dependiente de la dosis. Se usaron treinta y nueve (39) animales y se dividieron en grupos de 3 animales. Cada grupo recibe unilateralmente una dosis de 10, de 50 o de 100 µg de GDNF en 2 sitios del putamen.

60

El lado contralateral es infundido con PBS o con excipiente (véase la Tabla 5 y la FIG. 5). Se incluye heparina de bajo peso molecular en la formulación. La heparina de bajo peso molecular aumenta significativamente la distribución del GDNF en el cerebro después de la CED, estabiliza la proteína GDNF en la solución y aumenta los efectos del GDNF sobre el recambio de la DA, que puede aumentar los efectos funcionales del GDNF. (Hamilton J. F., Morrison P. F., Chen M. Y., Harvey-White J, Pernaute R. S., Phillips H. S., Oldfield E. H. y Bankiewicz K. S.

65

Heparin Co-infusion during Convection-Enhanced Delivery (CED) increases the distribution of the glial derived neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin. (2001) *Experimental Neurology* 168, 155-161).

5 Cada animal recibe una administración unilateral de GDNF en 2 sitios del putamen. En el lado contralateral se administra PBS. Se usará una CED para la administración del fármaco. Se sacrifican tres monos normales a las 6 semanas para determinar los niveles normales del GDNF y la proporción de DOPAC/DA, dado que puede haber un efecto contralateral de la administración del GDNF.

10 Métodos abreviados:

Cirugía

15 Cada animal recibe GDNF o PBS/excipiente en 2 sitios (50 µl por sitio) en el putamen con una CED. Las coordenadas estereotácticas se establecen basándose en las imágenes de RMN y se colocan cánulas de sílice fundida resistentes al reflujo en los sitios objetivo. La CED es controlada mediante una bomba externa. Después de la administración del GDNF, se recoge el LCR a través de una punción suboccipital y los animales son devueltos a sus jaulas. El LCR se recoge en el momento inicial y cada 2 semanas en todos los monos (LCR de animales de 6 semanas recogido en el momento inicial y a las 0, 2, 4, 6 semanas; animales de 4 semanas en el momento inicial, a las 0, 2 y 4 semanas; animales de 2 semanas en el momento inicial, a las 0, 2 semanas; semana 0 y momento inicial y a las 0 semanas). Se recogen muestras sanguíneas junto con las muestras de LCR. Inmediatamente después de la administración del GDNF (0 semanas) o 2, 4 o 6 semanas después, los animales son sacrificados y sus cerebros se extraen (frescos). Los cerebros se bloquean en placas de 3 mm y se congelan inmediatamente. Los órganos vitales se recogen para futuras evaluaciones patológicas.

25 Procesado del cerebro:

Los cerebros se procesan para evaluar: los niveles del 1-GDNF mediante un Elisa; los niveles de 2-DOPAC/DA mediante una HPLC; 3-GDNF, TH, CD68, inmunotinción con GFAP; 4-H&E

30 Los bloques de cerebro congelados se montan en el criostato y se recogen 6 secciones en corona (20 µm) de cada bloque que contienen el putamen. Las secciones se post-fijan y se tiñen para una inmunquímica del GDNF para determinar la magnitud de la administración del GDNF. El putamen de ambos lados del cerebro se disecciona y se pesa para obtener el peso en húmedo. El tejido se homogeneiza y se procesa para evaluar el contenido de GDNF mediante ELISA y DA y los metabolitos mediante una HPLC. También se mide el contenido de proteínas de las muestras.

Resultados

40 La inmunotinción del GDNF detecta la proteína GDNF en el putamen en todos los puntos temporales. El volumen de distribución (Vd) del GDNF se reduce en función del tiempo. Se usa la confirmación de la tinción del GDNF para hacer una validación cruzada de los datos del ELISA y de la HPLC.

1. Aclaramiento tisular del GDNF después de una única administración

45 Haciendo referencia a la FIG. 6, después de una única administración de 3 dosis de GDNF en el putamen, los niveles tisulares del GDNF disminuyen en función de la dosis y del tiempo.

2. Regulación por aumento de los niveles de DA después de una única administración del GDNF

50 La FIG. 7 describe un posible resultado de la administración de una única dosis en el putamen. Son posibles varios escenarios. (i) el patrón de la regulación por aumento de la DA seguirá estrechamente el de los niveles tisulares del GDNF, en cuyo caso el efecto biológico del GDNF es dependiente de la presencia de la proteína GDNF. (ii) el GDNF desencadena efectos biológicos y persisten más allá de los niveles tisulares detectables del GDNF.

3. Niveles del GDNF en el LCR

55 Puede haber un pequeño aumento en el GDNF a las 0 semanas con unos niveles indetectables en todos los demás momentos.

4. Anticuerpos contra el GDNF

60 No se detectaron anticuerpos contra el GDNF en ningún punto temporal en el LCR ni en el suero 5.

65 *Hallazgos neuropatológicos*

Aunque los animales no serán perfundidos con formalina, pudo analizarse el cerebelo para evaluar cualquier patología. No se observa patología.

5 Mediante el uso de los métodos anteriores se determina la relación entre una única dosis de GDNF, su semivida tisular y sus efectos biológicos en el sistema de la DA en monos.

SUJETOS:

10 Especie: macaco (cinomólogo o rhesus)
Género: masculino o femenino
Edad: de adulto joven a adulto
Cantidad: 39
Peso: 3-8 kg

15 AGENTE EXPERIMENTAL:

Factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF).

20 Los grupos de tratamiento se muestran en la Tabla 6 y los parámetros de la infusión se muestran en la Tabla 7.

PROGRAMA DE EVALUACIÓN:

25 Imágenes por resonancia magnética (RMN)
Administración intracraneal de PBS/GDNF (a través de una CED)
Recolección del LCR y de sangre:
Supervivencia a las 0 semanas: momento inicial y después de la CED
Supervivencia a las 2 semanas: momento inicial, después de la CED y 2 semanas después de la cirugía
Supervivencia a las 4 semanas: momento inicial, después de la CED y 2 y 4 semanas después de la cirugía
Supervivencia a las 6 semanas: momento inicial, después de la CED y 2, 4 y 6 semanas después de la cirugía

30 Eutanasia:

35 Se sacrificaron nueve (9) animales después de los procedimientos de CED
Se sacrificaron nueve (9) animales 2 semanas después de la cirugía
Se sacrificaron nueve (9) animales 4 semanas después de la cirugía
Se sacrificaron nueve (9) animales 6 semanas después de la cirugía
Se sacrificaron tres (3) animales (PBS) 6 semanas después de la cirugía

40 NECROPSIA Y PROCESADO DE LOS TEJIDOS:

40 Después de la eutanasia se lleva a cabo una perfusión cardíaca para introducir sistémicamente 1 l de solución salina tamponada con fosfato. Se recoge el cerebro, se bloquea en placas de 3 mm y se congela en fresco en isopentano enfriado con hielo seco. Se recogen muestras representativas de los órganos vitales y se procesan para un análisis histológico.

45 Procesado del tejido cerebral:

50 Los bloques cerebrales congelados se montan en un criostato y se recogen seis (6) secciones en corona (20 µm de espesor) de cada bloque que contienen el putamen. Las secciones se post-fijan y se tiñen para una inmunohistoquímica del GDNF para la evaluación de la distribución del GDNF.

55 Se llevan a cabo disecciones en el resto de tejido cerebral congelado para recoger el núcleo del putamen de cada bloque. El tejido del putamen se pesa, se homogeneiza y se procesa para evaluar el contenido de GDNF mediante un ELISA. La DA y los niveles de metabolitos se miden mediante una HPLC.

DURACIÓN DEL ESTUDIO:

Duración en vivo: entre 0 y 6 semanas después de la infusión con CED

60 PARÁMETROS DE LA EVALUACIÓN EN VIVO:

Imágenes de RMN

65 Administración intracraneal de PBS/GDNF
Observaciones clínicas posteriores a la cirugía
Observaciones semanales de la salud

Recolección de sangre (5 ml, suero): antes de la cirugía, después de la CED y 2, 4 y 6 semanas después de la CED

Recolección del LCR (1 ml): antes de la cirugía, después de la CED y 2, 4 y 6 semanas después de la CED

5 PARÁMETROS NEUROPATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS:

El ensayo de anticuerpos contra el GDNF se lleva a cabo en muestras de suero y de LCR recogidas antes de la cirugía, después de la CED y 2 y 6 semanas después de la CED

10 El ensayo del GDNF se lleva a cabo sobre muestras de LCR recogidas antes de la cirugía, después de la CED y 2, 4 y 6 semanas después de la CED

Análisis del tejido cerebral

- 15 Nivel de GDNF determinado mediante un ELISA (criterio de valoración primario)
 Proporción de DOPAC/DA determinada mediante una HPLC (criterio de valoración primario)
 Inmunotinción del GDNF (criterio de valoración primario)
 Inmunotinción de GFAP, TH, CD68 (criterio de valoración secundario)
 Tinción con H&E (criterio de valoración primario)

20 Véase también Hadaczek et al., Human Gene Therapy, 17: 1-12, 2006, incorporado al presente documento como referencia en su totalidad.

Ejemplo 3: EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GDNF EN EL ESTRIADO DE RATA

25 Se infundió AAV2-GDNF (CED) en el estriado de rata a diferentes dosis, y las ratas fueron sacrificadas en diferentes puntos temporales para analizar la correlación con el nivel de expresión del GDNF con el tiempo. Ambos hemisferios fueron infundidos con una cantidad apropiada de AAV2-GDNF en un volumen total de 15 µl. Los grupos de ensayo están ilustrados en la FIG. 8.

30 Se llevaron a cabo los procedimientos quirúrgicos habituales para la CED intraestriatal con las siguientes velocidades de infusión: 0,2 µl/min durante 11 min, 0,5 µl/min durante 8 min y 0,8 µl/min durante 11 min. La concentración de la proteína GDNF en el tejido estriado fue determinada mediante un ELISA. Después de la eutanasia, los cerebros fueron rápidamente extraídos y el estriado se diseccionó bilateralmente y se congeló inmediatamente. Las muestras se homogeneizaron y se expusieron a un tratamiento de acidificación. Se determinó el nivel tisular del GDNF en los homogeneizados mediante un GDNF E_{max}® ImmunoAssay System (Promega). Para confirmar la expresión del GDNF, se usó una rata del grupo A para la evaluación inmunohistoquímica (se usó una tinción habitual de DAB con anticuerpo policlonal anti-GDNF humano; R&D Systems, a 1:50)

40 Resultados: la transducción del estriado de rata con AAV2-GDNF dio como resultado la expresión de la proteína GDNF en el tejido cerebral de una forma dependiente de la dosis (FIG. 9). El nivel de expresión del GDNF estuvo aumentando hasta 1 mes, cuando alcanzó su concentración estacionaria en el tejido estriado. Desde ese punto temporal, para la dosis máxima del virus infundido (1,65¹¹ vg), la cantidad media de GDNF detectada mediante un ELISA era de ~ 11 ng/mg de proteína tisular. Unas dosis menores del vector, de 9,07¹⁰ vg y de 1,65¹⁰ vg, dieron como resultado unas concentraciones tisulares menores del GDNF: de ~ 6-7 ng/mg de proteína tisular y de ~ 2-3 ng/mg de proteína tisular, respectivamente.

Ejemplo 4: EVALUACIÓN DEL ACLARAMIENTO DEL GDNF EN EL CEREBRO DE RATA

50 Métodos: para analizar el aclaramiento del GDNF en el cerebro de rata diseñamos un experimento en el que administramos la proteína GDNF en el estriado mediante una CED. Se infundieron ambos hemisferios con 1 µg de GDNF en un volumen total de 15 µl. Llevamos a cabo 4 infusiones semanales para averiguar si hay algún efecto acumulativo. Cada semana se sacrificaron 3 animales para la recolección del tejido cerebral. Véase la FIG. 10.

55 Se llevaron a cabo los procedimientos quirúrgicos habituales para la CED intraestriatal con las siguientes velocidades de infusión: 0,2 µl/min durante 11 min, 0,5 µl/min durante 8 min y 0,8 µl/min durante 11 min. La concentración de la proteína GDNF en el tejido estriado fue determinada mediante un ELISA. Después de la eutanasia, los cerebros fueron rápidamente extraídos y el estriado se diseccionó bilateralmente y se congeló inmediatamente. Las muestras se homogeneizaron y se expusieron a un tratamiento de acidificación. Se determinó el nivel tisular del GDNF en los homogeneizados mediante un GDNF E_{max}® ImmunoAssay System (Promega).

60 Resultados: la administración semanal de la proteína GDNF en el estriado de rata dio como resultado su nivel estacionario en el tejido cerebral. Las concentraciones medias eran de 32,9; de 26,6; de 29,0; y de 28,8 pg/mg de proteína en las semanas 1, 2, 3 y 4 respectivamente. (FIG. 11).

65 Ejemplo 5: EVOLUCIÓN TEMPORAL DEL ACLARAMIENTO DEL GDNF EN EL CEREBRO DE RATA

Se infundió la proteína GDNF en el estriado y las ratas fueron sacrificadas en diferentes puntos temporales para analizar la evolución temporal del aclaramiento del GDNF de cerebro.

La cantidad de GDNF se midió mediante un ELISA.

5 GDNF (del NIH; 10 µg/30 µl): 0,33 µg/µl

Se eligió una dosis:

- 10 La solución madre original se diluyó a 1:2 con 40 µl de PBS + 80 µl de PBS = 120 µl por línea (0,11 µg/µl)
 Se infundirán 15 µl en cada hemisferio (cantidad total: 1,65 µg de GDNF por hemisferio)
 2 ratas por punto temporal (4 hemisferios)
 Velocidad de infusión de la CED: 0,2 µl/min = 11 min; 0,5 µl/min = 8 min; 0,8 µl/min = 11 min; 15 µl, 30 min total.
 (FIG. 12).
- 15 Se describen las siguientes publicaciones Varon et al., Ann. Rev. Neuroscience, 1: 327, 1979; Thoenen et al., Science, 229: 238, 1985); Thoenen, Trends. Neurosci. 14: 165-170, 1991; Lapchak et al., Rev. Neurosci., 3: 1-10, 1993; Bothwell, Ann. Rev. Neurosci., 18: 223-253, 1995; Lapchak et al., Rev. Neurosci. 3: 1-10, 1993; Bothwell, Ann. Rev. Neurosci., 18: 223-253, 1995; Chao et al., TINS 18: 321-326, 1995; Lin et al., Science 260: 1130-1132, 1993; Kriegstein et al., EMBO J. 14: 736-742, 1995; Poulsen et al., Neuron 13: 1245-1252, 1994; Lin et al., Science 260: 1130-1132, 1993; Hudson et al., Brain Res. Bull. 36: 425-432; 1995; Beck et al., Nature 373: 339-341, 1995; Tomac et al., Nature 373: 335-339, 1995; Hoffer et al., Neurosci. Lett. 182: 107-111, 1994; Oppenheim et al., Nature 373: 344-346, 1995; Zurn et al., Neuroreport 6: 113-118, 1994; Yan et al., Nature 373: 341-344, 1995; Henderson et al., Science 266: 1062-1064, 1994; Sariola et al., J. Cell Sci., 1 de octubre de 2003; 116 (Pt 19): 3855-62; Venero et al., Neuroreport 4: 959-962, 1993; Hefti, J. Neurobiol. 25: 1418-1435, 1994; Olson, Neurochem. Jul. 15: 1-3, 1994; Batchelor et al., J. Comp. Neurol. 284: 187-204, 1989; Kiss et al., Neurosci. 27: 731-748, 1988; Woolf et al., Neurosci. 30: 143-152, 1989; Selkoe, Neuron, 6: 487-498, 1991; Hefti, J. Neurobiol. 25: 1418-1435, 1994; Petty et al., Ann. Aug. 36: 244-246, 1994; Eslamboli, Rev. Neurosci., 2005; 16 (4): 303-10; Kordower et al., Ann. Neurol., 46: 419-424, 1999; Gill et al., Nat. Med. 9: 5899-595, 2003; Patel et al., Ann. Neurol., 57: 298-302, 2005; Lang et al., Ann. Neurol., 59: 459-466, 2006; Eslamboli, Rev. Neurosci., 2005; 16 (4): 303-10; Krauze et al., Exp Neurol., noviembre de 2005; 196 (1): 104-11; Gill et al., Nat. Med. 9: 5899-595, 2003.

Tabla 1

Factor de crecimiento	Población objetivo	Efecto del factor de crecimiento
NGF	prosencéfalo basal e hipocampo	supervivencia de las neuronas colinérgicas
NGF	núcleos basales de Meynert	supervivencia de las neuronas colinérgicas
NGF	hipocampo	supervivencia de las neuronas colinérgicas
BDNF	hipocampo	supervivencia de las neuronas colinérgicas
NT-3	hipocampo	supervivencia de las neuronas colinérgicas
CNTF	estriado	supervivencia de las neuronas dopaminérgicas
IGF-1	hipocampo	protección frente a un daño neuronal excitotóxico
GDNF	sustancia negra, estriado	crecimiento neurítico y supervivencia de las neuronas, neuronas dopaminérgicas
VIP	sustancia negra, estriado	crecimiento neurítico y supervivencia de las neuronas, neuronas dopaminérgicas
PTN	sustancia negra, estriado	crecimiento neurítico y supervivencia de las neuronas, neuronas dopaminérgicas
bFGF20	sustancia negra, estriado	crecimiento neurítico y supervivencia de las neuronas, neuronas dopaminérgicas

Tabla 2

Tipo de neurona	Factor de crecimiento
Colinérgica	NGF
Colinérgica	BDNF
Colinérgica	NT-3
Dopaminérgica	CNTF
Dopaminérgica	GDNF

Dopaminérgica	VIP
Dopaminérgica	bFGF
Dopaminérgica	PTN
Glutaminérgica	IGF-1

Tabla 3

Residuo original	Ejemplos de sustituciones
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Tabla 4

Días después de la transducción	AAV2-LacZ control	AAV2-GDNF 1,65 e10 vg log ⁻¹	AAV2-GDNF 9,07 e10 vg ½ log	AAV2-GDNF 1,65 e11 vg dosis máxima
3 días	2,2 ± 0,28 pg/mg	7,0 ± 1 pg/mg	34,4 ± 5 pg/mg	96,4 ± 6 pg/mg
7 días	1,73 ± 0,13 pg/mg	16,7 ± 3 pg/mg	63,0 ± 7 pg/mg	208,4 ± 15 pg/mg
14 días	2,37 ± 0,38 pg/mg	36,1 ± 5 pg/mg	127,0 ± 10 pg/mg	354,0 ± 14 pg/mg
21 días	1,6 ± 0,12 pg/mg	75,0 ± 7 pg/mg	197,0 ± 10 pg/mg	521,3 ± 12 pg/mg

Tabla 5

Estudio de los intervalos de dosificación en monos normales				
Tiempo (semanas)	10 µg	50 µg	100 µg	0 µg
0	N = 3	N = 3	N = 3	x
2	N = 3	N = 3	N = 3	x
4	N = 3	N = 3	N = 3	x
6	N = 3	N = 3	N = 3	x
6	X	X	X	N = 3

Tabla 6

Grupos de tratamiento				
Grupo	Hemisferio izquierdo	Dosis en el hemisferio derecho/sitio (μg)	n° de animales	Tiempo de supervivencia (semanas)
1	PBS/excipiente	10	3	0
			3	2
			3	4
			3	6
2	PBS/excipiente	50	3	0
			3	2
			3	4
			3	6
3	PBS/excipiente	100	3	0
			3	2
			3	4
			3	6
4	PBS/PBS	0	3	6

Tabla 7

Parámetros de infusión			
Sitio objetivo	Velocidad de infusión (tiempo)	Volumen total por sitio	Tiempo de infusión total por sitio
Putamen (2 sitios)	0,2 $\mu\text{l}/\text{min}$ (10 min.) 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ (10 min.) 0,8 $\mu\text{l}/\text{min}$ (10 min.) 1,0 $\mu\text{l}/\text{min}$ (10 min.) 1,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ (10 min.) 2,0 $\mu\text{l}/\text{min}$ (5 min.)	50 μl	55 minutos

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en un método para el tratamiento de un mamífero que tiene un trastorno del sistema nervioso central (SNC), en donde dicha composición comprende un factor neurotrófico y es administrada mediante una administración mejorada por convección (CED) intermitente al SNC de dicho mamífero a una velocidad que se opone a la velocidad de aclaramiento tisular de dicho factor neurotrófico, y en donde dicha administración mantiene una dosis terapéutica eficaz del factor neurotrófico, siendo las interrupciones entre las administraciones de dicho factor neurotrófico de al menos aproximadamente una semana.
2. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica comprende adicionalmente un agente trazador.
3. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde dicho método comprende adicionalmente la determinación de la velocidad de aclaramiento tisular de dicho factor neurotrófico.
4. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde dicha CED comprende aumentos incrementales en el caudal.
5. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica es administrada mediante el uso de una cánula de diseño progresivo exenta de reflujo compatible con una CED.
6. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 2, en donde el agente trazador comprende un imán de RMN o un agente detectable mediante una TC.
7. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 6, en la que dicho agente trazador es un quelato de gadolinio.
8. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 2, en la que dicho agente trazador está encapsulado en un liposoma.
9. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en la que dicho factor neurotrófico se selecciona entre el grupo que consiste en GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6, neurturina, persefina y artemina.
10. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en la que dicho trastorno del SNC se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), ictus, traumatismo craneal, lesión en la médula espinal, esclerosis múltiple, demencia con cuerpos de Lewy, degeneración de la retina, epilepsia, trastornos psiquiátricos, trastornos del equilibrio hormonal y degeneración coclear.
11. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1 donde dicho factor neurotrófico es el GDNF y dicho trastorno del SNC es la enfermedad de Parkinson.
12. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde el tratamiento es para promover la supervivencia de una población de neuronas sensible al factor neurotrófico en el SNC de mamífero, en donde dicha composición es administrada según se define en la reivindicación 1 y en donde dicho método comprende: la administración local de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica, que comprende un factor neurotrófico, a dicho tejido objetivo del SNC que comprende una población de neuronas sensible a dicho factor neurotrófico.
13. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde el tratamiento es para la reducción de la muerte de las neuronas sensibles al factor neurotrófico del SNC de mamífero, en donde dicha composición es administrada según se define en la reivindicación 1 y en donde dicho método comprende: la administración local de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica, que comprende un factor neurotrófico, a un tejido objetivo del SNC que comprende una población de neuronas sensible a dicho factor neurotrófico, población de neuronas que está en riesgo de experimentar muerte celular en ausencia de intervención.
14. La composición farmacéutica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho uso comprende tres o más administraciones, teniendo la duración de dos o más interrupciones una longitud variable.
15. La composición farmacéutica según la reivindicación 14, en donde la duración de las interrupciones aumenta con el tiempo.

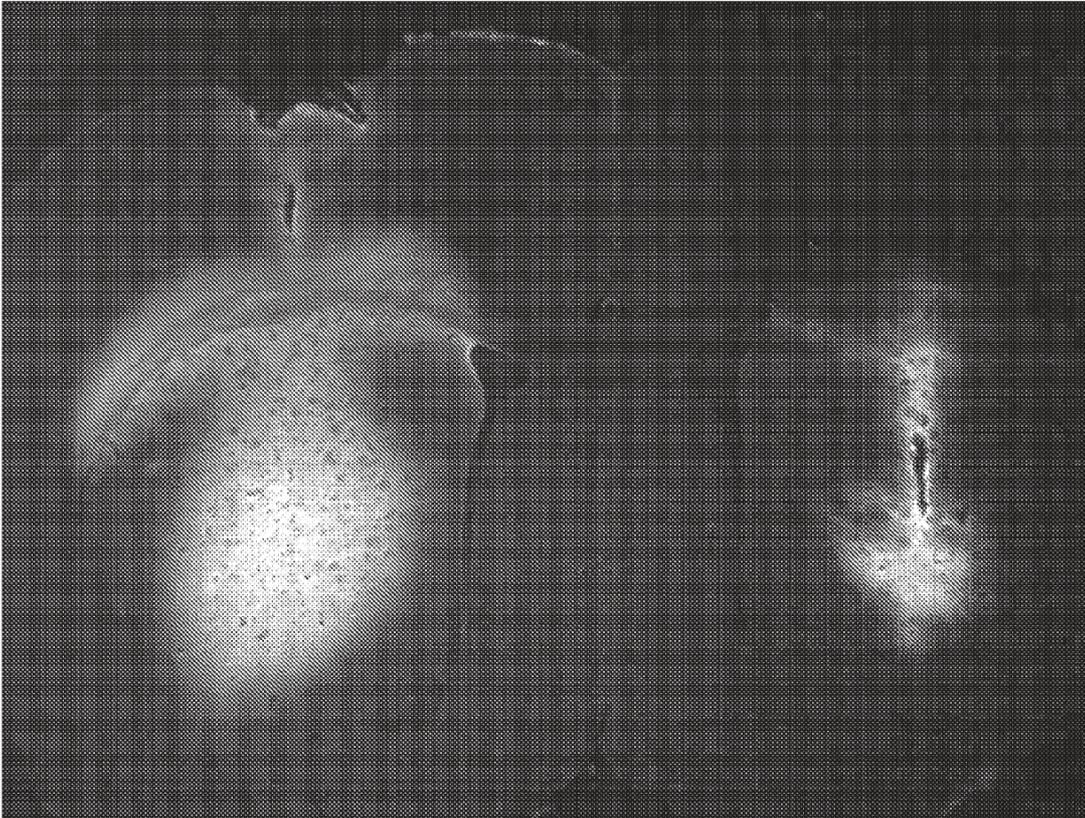


FIG. 1

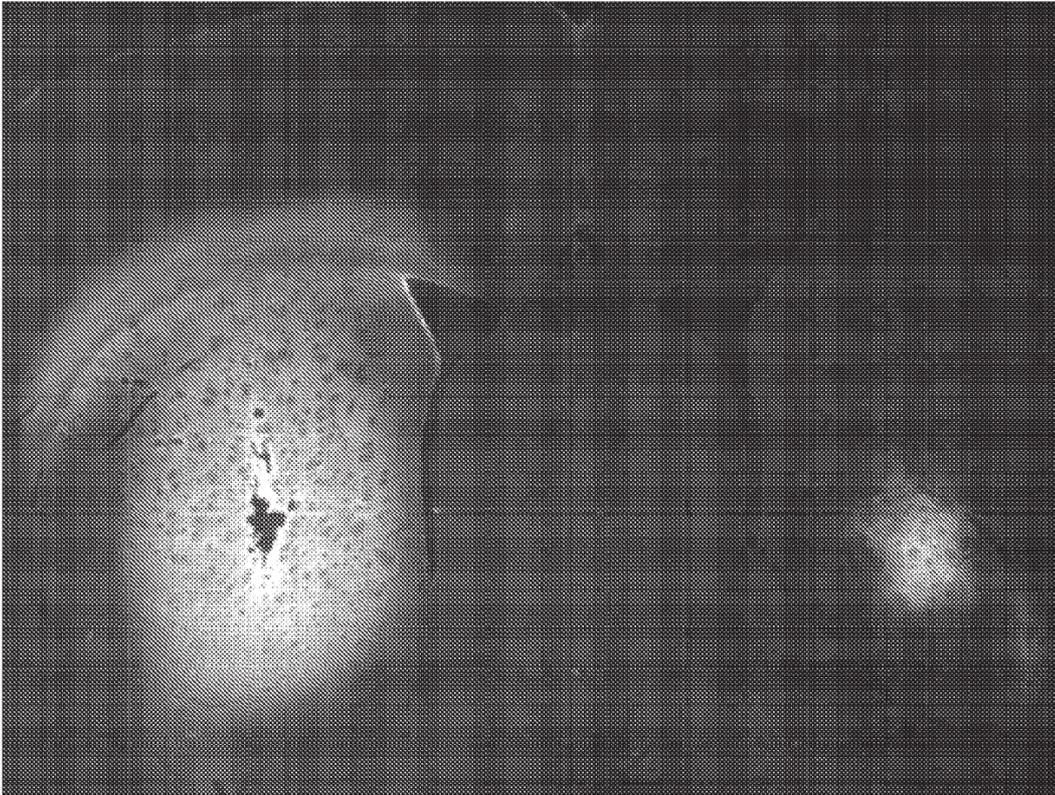


FIG. 2

Expresión del GDNF en diferentes puntos temporales después de la transducción con AAV2-GDNF

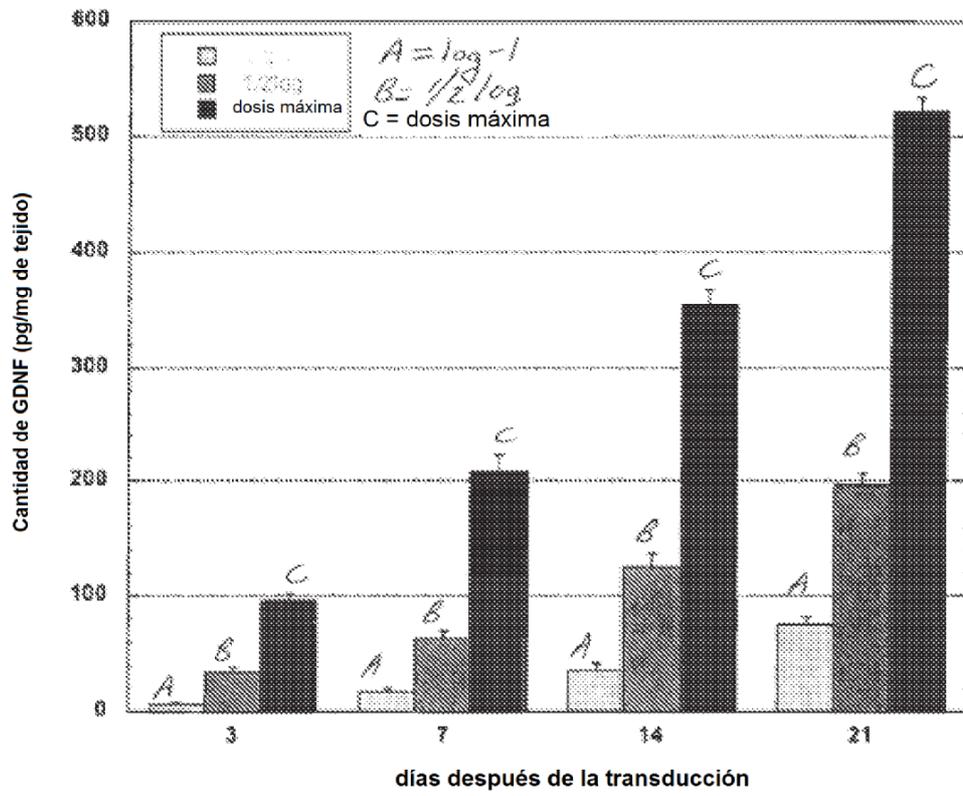


FIG. 3



FIG. 4

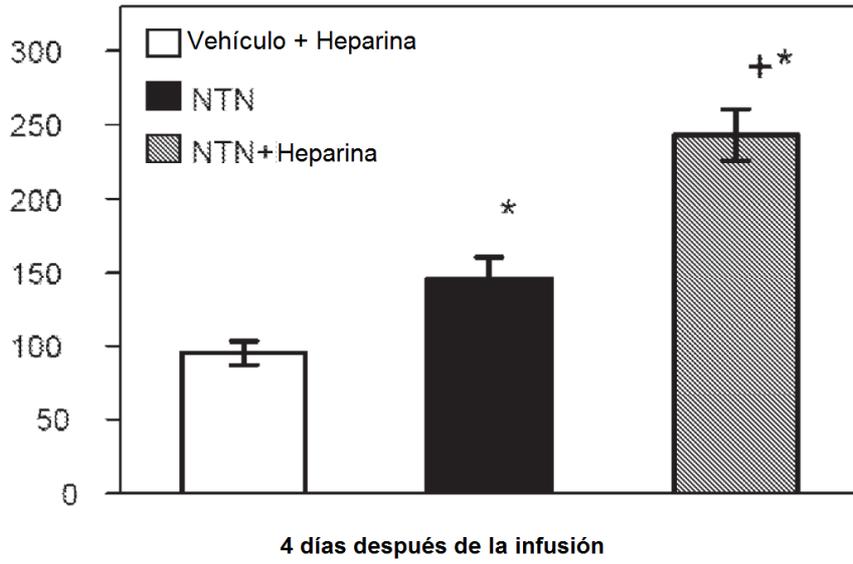


FIG. 5

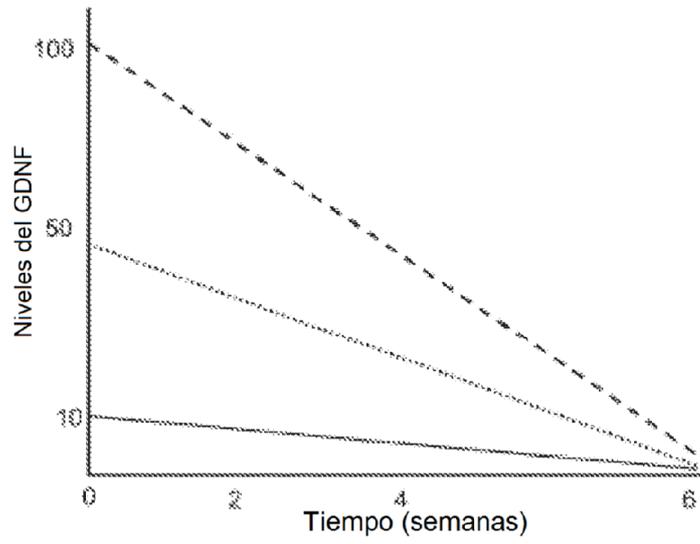


FIG. 6

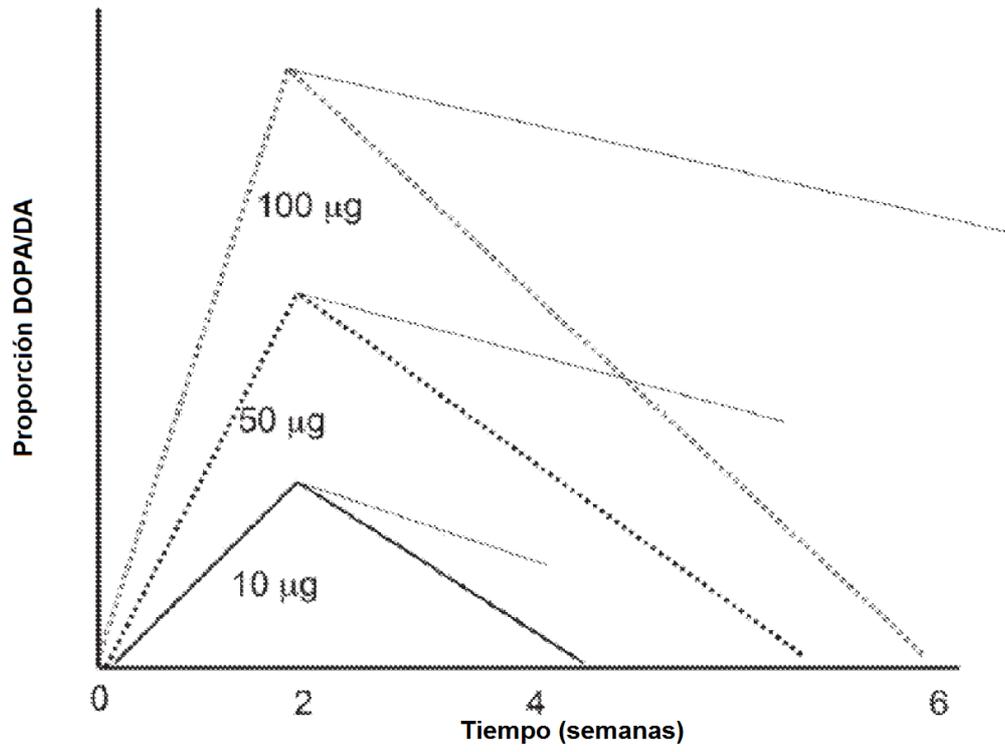


FIG. 7

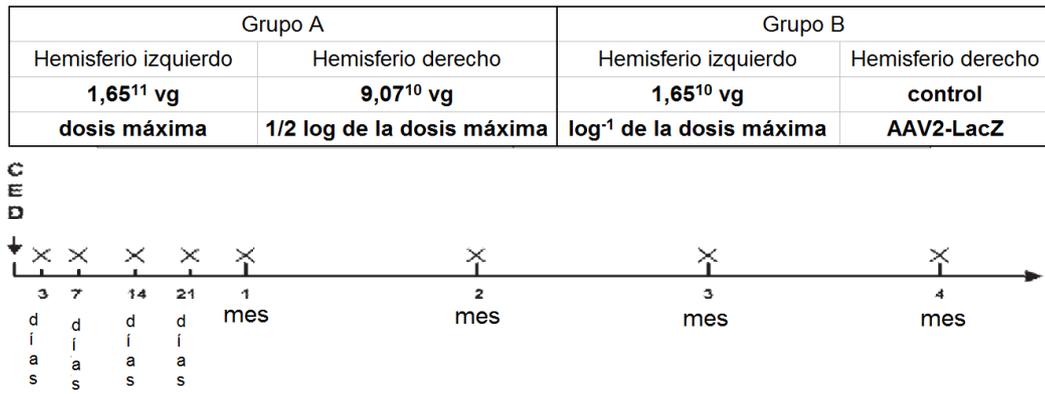


FIG. 8

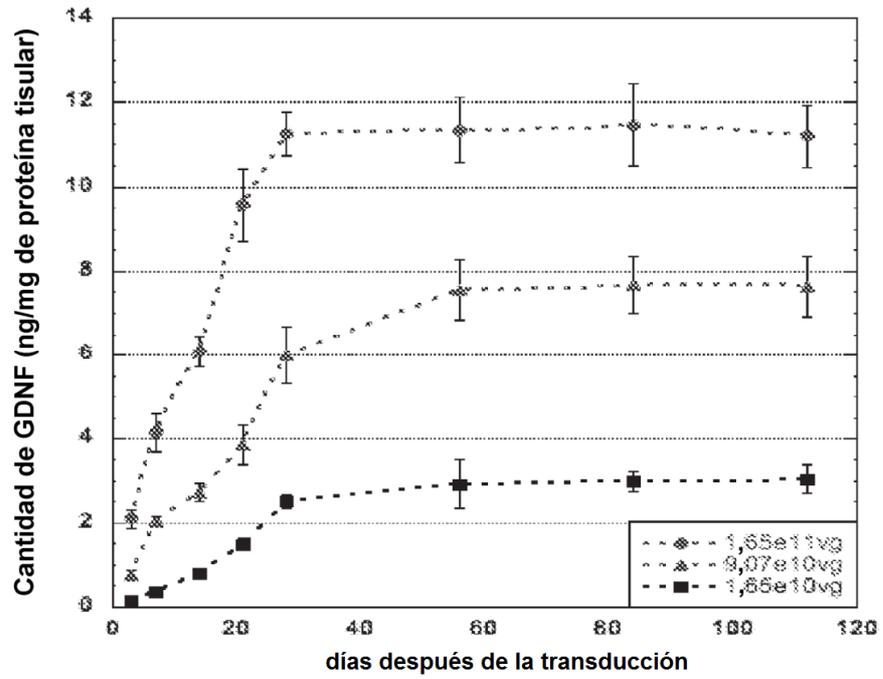
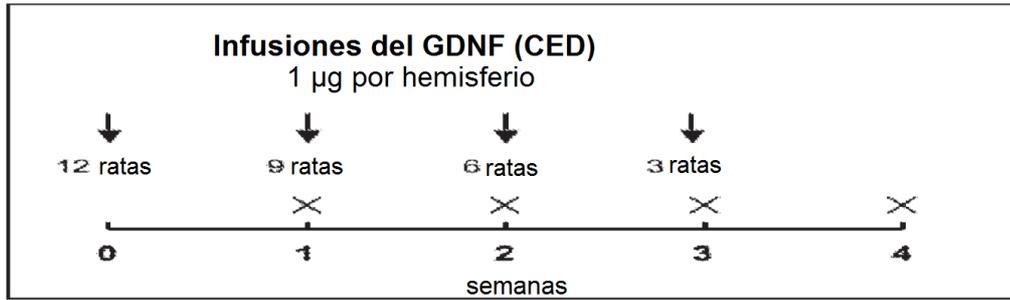


FIG. 9



X - eutanasia de 3 ratas y recolección del tejido cerebral

FIG. 10

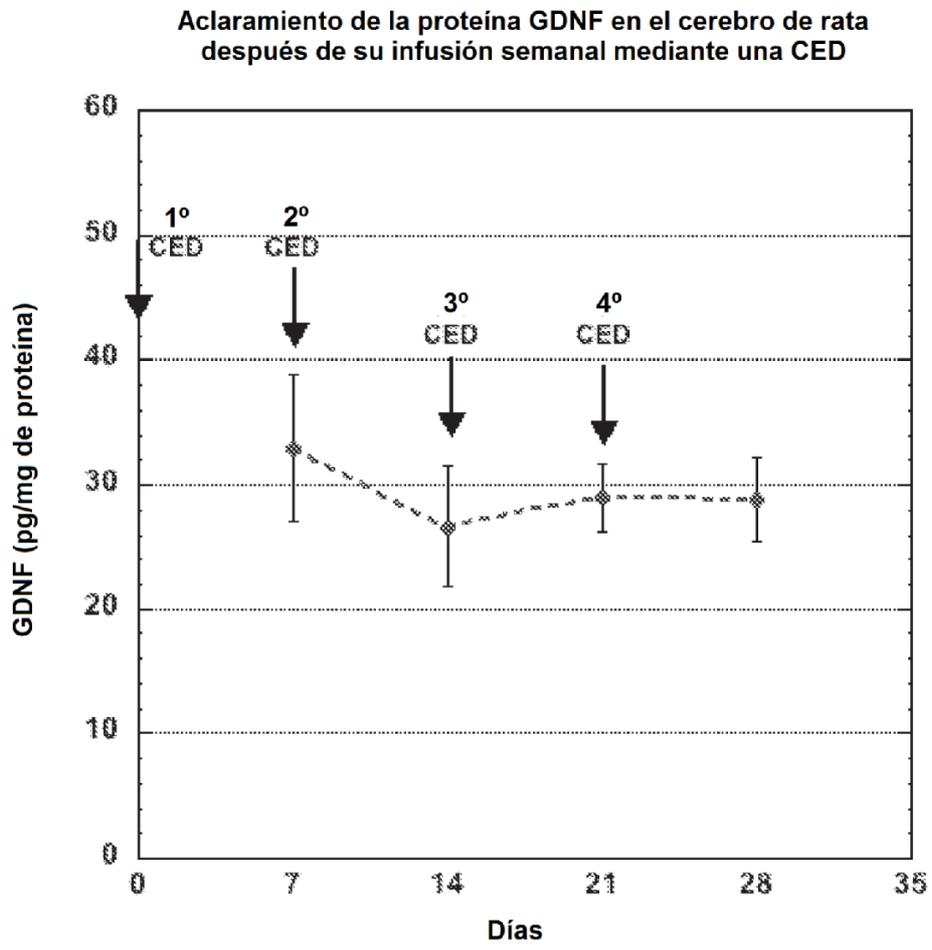


FIG. 11

**Aclaramiento del GDNF después de su infusión
intraestriatal (CED) en el cerebro de rata**

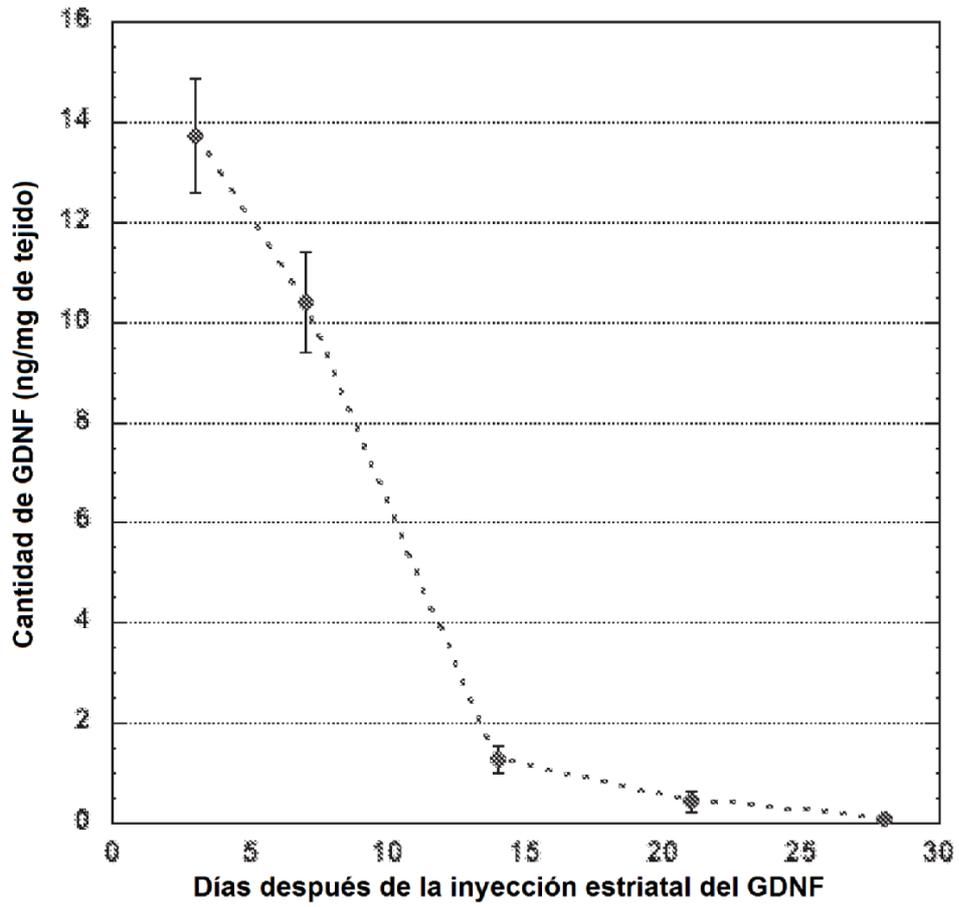


FIG. 12