

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 992**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06780613 .3**
96 Fecha de presentación: **11.08.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1948217**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Uso de factor de crecimiento nervioso en gotas oftálmicas para terapia de patologías del sistema nervioso central, tales como enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson**

30 Prioridad:
19.08.2005 IT RM20050447

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.03.2012

73 Titular/es:
ANABASIS S.R.L.
VIA DELLE ROBINIE, 45
00172 ROMA, IT

72 Inventor/es:
LAMBIASE, Alessandro y
BONINI, Stefano

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 376 992 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

5 Uso de factor de crecimiento nervioso en gotas oftálmicas para terapia de patologías del sistema nervioso central, tales como enfermedad de alzheimer y enfermedad de parkinson

10 La presente invención se refiere al uso del factor de crecimiento nervioso en gotas oftálmicas para la terapia de patologías del sistema nervioso central, tales como enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Más específicamente, la invención se refiere al uso de la neurotrofina llamada factor de crecimiento nervioso (NGF) para el tratamiento de patologías que afectan a estructuras encefálicas, tales como el hipocampo, la corteza cerebral, el prosencéfalo basal, septo medial, banda diagonal de Broca, núcleo basal de Meynert, parte compacta de la sustancia negra, cuerpo estriado y cerebelo, mediante una simple administración tópica sobre la superficie ocular, por ejemplo en forma de gotas oftálmicas o pomada oftálmica.

15 El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una molécula principal de una compleja familia de neurotrofina, y es bien conocido por su actividad trófica, trópica y diferenciadora sobre neuronas colinérgicas del sistema nervioso central y sobre el sistema nervioso periférico. El NGF es producido por muchos tejidos de mamífero, incluyendo el ser humano, y se libera en el torrente sanguíneo en mayores cantidades durante el crecimiento y la diferenciación del sistema nervioso. Estudios biológicos, bioquímicos y moleculares realizados en sistemas celulares *in vitro* han destacado una homología muy alta entre NGF murino y humano. Además, en el ser humano como en muchas otras especies animales, el NGF está presente normalmente tanto en el líquido cefalorraquídeo como en el torrente sanguíneo a concentraciones de 10-50 pg/ml, con un aumento en algunas patologías inflamatorias (enfermedades autoinmunes y alérgicas, etc.) y una disminución en otras (diabetes).

20 El NGF fue descubierto por el Prof. Rita Levi-Montalcini, en el Zoology Institute of Washington University de St. Louis (Levi-Montalcini R., Harvey Lect., 60: 217, 1966), y representa una etapa importante en el estudio de los mecanismos de crecimiento y diferenciación de células nerviosas, ya que es capaz de influir en el desarrollo y preservación de las funciones biológicas y la regeneración de las neuronas. Al Prof. R. Levi-Montalcini se le concedió el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1986 por descubrir esta molécula y por caracterizar su papel biológico tanto en el sistema nervioso periférico como en el central.

25 Muchos estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* han demostrado la importancia fisiopatológica del NGF en la prevención del daño neuronal de origen quirúrgico, químico, mecánico e isquémico, haciéndole de este modo el candidato ideal para su uso en la terapia de muchas patologías del sistema nervioso central y periférico (Hefti F., J. Neurobiol., 25: 1418, 1994; Fricker J., Lancet, 349: 480, 1997). De hecho, desde hace algunos años, se han realizado ensayos clínicos en pacientes que padecen enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer mediante administración intracerebral de NGF murino (véase, por ejemplo, Olson L. et al., J. Neural Trans.: Parkinson's Disease and Dementia Section, 4: 79, 1992). Los resultados de estos estudios han confirmado las observaciones realizadas en modelos animales y han destacado la ausencia de posibles efectos secundarios después de la administración de NGF murino. Esta característica fue confirmada más tarde para NGF humano recombinante (Petty B. G. et al., Annals of Neurology, 36: 244-246, 1994).

30 Dado que, desde su descubrimiento, se han realizado estudios sobre la caracterización de los efectos biológicos, bioquímicos, moleculares, preclínicos y clínicos del NGF, casi exclusivamente con NGF aislado de glándulas submandibulares de roedores adultos, la mayor cantidad de datos adquiridos actualmente se refiere a NGF murino. Las propiedades bioquímicas del NGF murino se han descrito, en particular, en un trabajo que data de 1968 (Levi-Montalcini R. & Angeletti P.U., Physiological Reviews, 48: 534, 1968).

35 El NGF contenido en las glándulas salivales murinas es un complejo molecular de 140 kdalton con un coeficiente de sedimentación de 7S, y está constituido por tres subunidades, α , β y γ - la segunda de las cuales representa la verdadera forma activa. Esta última, conocida como β NGF, tiene un coeficiente de sedimentación de 2,5S y normalmente se extrae y se purifica de acuerdo con tres metodologías no muy diferentes (Bocchini V., Angeletti P. U., Biochemistry, 64: 787-793, 1969; Varon S. et al., Methods in Neurochemistry, 203-229, 1972; Mobley W.C. et al., Molecular Brain Research, 387: 53-62, 1986).

40 El β NGF obtenido de esta manera es un dímero de aproximadamente 13.000 dalton compuesto por dos cadenas idénticas de 118 aminoácidos. Cada cadena es estabilizada por tres puentes disulfuro, mientras que enlaces no covalentes aseguran la estabilización de la estructura dimérica. La molécula es muy estable y es soluble en casi todos los disolventes, tanto acuosos como oleosos, y conserva sus características bioquímicas y su actividad biológica inalteradas. Detalles adicionales sobre la estructura y sobre las propiedades físicas y bioquímicas de la molécula se describen en el documento Greene, L.A. & Shooter, E.M., Ann. Rev. Neurosci. 3: 353, 1980.

45 La estructura del β NGF se aclaró adicionalmente recientemente por medio de análisis cristalográficos. El análisis reveló la presencia de tres pares antiparalelos de filamentos con una estructura secundaria de tipo $\alpha 2$, que permite la formación de una superficie plana a lo largo de la cual las dos cadenas se unen conjuntamente para dar el dímero activo. En estas cadenas de β NGF, se ha descubierto la presencia de cuatro regiones de "bucle", en las que se

incluyen muchos aminoácidos variables. Estos aminoácidos variables son, probablemente, responsables de la especificidad de reconocimiento del receptor.

5 El efecto biológico del NGF está mediado por dos receptores presentes en la superficie de las células diana correspondientes. La existencia de muchos anticuerpos que inhiben selectivamente el efecto biológico del NGF ha permitido una caracterización y modulación precisas de su actividad, tanto en sistemas celulares como *in vivo*.

10 Más recientemente, el NGF humano ha sido sintetizado por medio de técnicas de ingeniería genética (Iwane, M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171: 116, 1990), y actualmente pequeñas cantidades de NGF humano están disponibles en el mercado, también. Sin embargo, la experimentación directa ha mostrado que la actividad biológica del NGF humano es muy baja en comparación con la actividad del NGF murino. Además, hay que tener en cuenta que casi todos los datos disponibles actualmente en el ser humano - tanto *in vitro* como *in vivo* - se han obtenido usando NGF murino, y hasta ahora no se han descubierto efectos secundarios indeseables resultantes del origen murino de la molécula.

15 Estudios realizados en modelos animales desde los años 1970 sugirieron una posible implicación del NGF en patologías que afectan al sistema nervioso central. La implicación del NGF en mecanismos patológicos de patologías degenerativas del sistema nervioso central se sospechaba hace aproximadamente 30 años al observar que el NGF combate la atrofia de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal y las deficiencias cognitivas resultantes en ratas ancianas y lesionadas (Hefti F., *J. Neurosci.* 6(8): 2155-62, 1986). En particular, en los últimos años muchas confirmaciones experimentales han apuntado a una correlación consecuente entre una falta de síntesis endógena de la molécula de NGF y el desarrollo de algunas patologías específicas del sistema nervioso central (SNC), el sistema nervioso periférico (SNP) y enfermedades cutáneas (Tuszynski M. H. et al., *J. Mol. Neurosci.*, 19: 207, 2002; Nakagawara A. et al., *N. Engl. J. Med.*, 328: 847-854, 1993; De Santis S. et al., *Clin. Cancer Res.* 6: 90-95, 2000; Kaye D. M. et al., *Circ. Res.*, 86: e80-e84, 2000; Villoslada P. et al., *J. Exp. Med.*, 191: 1799-1806, 2000; Salvinelli F. et al., *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 16: 176-80, 2002).

20 Partiendo de estas observaciones, algunos investigadores iniciaron estudios centrados en el uso terapéutico del NGF en patologías de tejido de revestimiento humano, tales como úlceras corneales, úlceras de diabetes o de decúbito, y la vasculitis asociada a artritis reumatoide, por medio de la administración tópica de NGF (Costa N. et al., *Ann. 1st. Super. Sanita*, 38: 187-194, 2002; Aloe, L. e Calza, L. eds., *Prog. Brain Res.*, 146: 1-544, 2004; Lambiase A. et al., *New Engl. J. Med.*, 338: 1174-1180, 1998; Bemabei R. et al., *The Lancet*, 354: 182, 1999; Lambiase A. et al., *Arch. Ophthalmol.*, 118: 1446-1449, 2000; Tuveri M. et al., *The Lancet*, 356: 1739-1740, 2000; Chiaretti A. et al., *Arch. Dis. Child.*, 87: 446-48, 2002; Landi F. et al., *Ann. Int. Medicine*, 139: 635-641, 2003; Generini S. et al., *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 112: 542-4, 2004; Aloe L., *Progr. Brain Res.*, 146: 279-89, 2004). Desafortunadamente, a pesar del progreso conseguido para estas patologías de superficie, el NGF aún no se usa en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central a pesar de la gran evidencia que existe de la implicación de esta neurotrofina en la patogenia de enfermedades neurodegenerativas.

30 Como se sabe, la enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa en ancianos que conduce a la pérdida gradual de memoria y de las principales capacidades cognitivas (Selkoe D.J., *Physiol. Rev.*, 81 (2)741-66, 2001). Existe una forma esporádica de esta enfermedad (que atañe a más del 95% de los pacientes afectados) y una forma familiar (menos del 5% de los pacientes afectados), vinculada a mutaciones génicas debidas a APP (Proteína precursora de amiloide), PS1 (Presenilina 1) y PS2 (Presenilina 2). En ambas formas de la enfermedad, el declive cognitivo está acompañado por muerte neuronal, la pérdida de sinapsis y la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares constituidos por la proteína del citoesqueleto tau presente en una forma hiperfosforilada y dispuesta en agregaciones moleculares llamadas PHF (Filamentos Helicoidales Apareados). Otro signo histopatológico de la enfermedad de Alzheimer (AD) es la acumulación extracelular de proteína amiloide (péptido β -amiloide, A β), un péptido producido por la proteólisis patológica de APP. Esta acumulación llega a constituir lo que se conoce actualmente como placas amiloides o placas seniles. Estos trastornos celulares se encuentran principalmente en el hipocampo y en la corteza cerebral, mientras que en el prosencéfalo basal y el núcleo basal de Meynert, hay una disminución del número de células colinérgicas (Saper CB. et al., *Neurology*, 35(8): 1089-95, 1985; Palmer A.M., *Neurodegeneration*, 5(4): 381-91, 1996; Mufson EJ. et al., *J. Chem. Neuroanat*, 26(4): 233-42, 2003).

45 Este aspecto particular de la AD condujo a la formulación de terapias actuales que implican el uso de agentes que inhiben la colinesterasa (y que promueven, por lo tanto, la restauración del funcionamiento "colinérgico" normal). Debe destacarse que los efectos de todos los fármacos anti-AD disponibles actualmente son definitivamente insuficientes, dado que su acción está limitada a una ralentización parcial de la enfermedad, y a la condición de que el tratamiento comience en una fase suficientemente temprana de la enfermedad.

50 La enfermedad de Parkinson (PD) es la segunda patología neurodegenerativa más frecuente (tras AD) en la población y se caracteriza, desde un punto de vista anatómico-patológico, por una degeneración selectiva de la sustancia conocida como parte compacta de la sustancia negra - un núcleo poblado por neuronas dopaminérgicas que contienen melanina, que envían sus propias proyecciones al cuerpo estriado. La degeneración progresiva de esta población neuronal y la denervación dopaminérgica resultante del cuerpo estriado causan una cascada de alteraciones que alteran la arquitectura funcional de los núcleos basales, conduciendo a la aparición de los síntomas

motores de PD.

A pesar de que han pasado más de 40 años desde que el déficit de dopamina nigroestriatal fue identificado por primera vez como la alteración neurotransmisora responsable de la sintomatología de la enfermedad de Parkinson, la etiopatogenia y la fisiopatología de PD siguen presentando varias áreas poco conocidas. Esto ha significado, hasta ahora, una falta de alternativas terapéuticas válidas a L-DOPA (o levodopa), el precursor de dopamina, considerado aún como el "método de referencia" en el tratamiento de PD.

Estudios realizados durante los últimos veinte años en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* han proporcionado una información preciosa, permitiendo la experimentación de nuevas estrategias terapéuticas, algunas de las cuales - tales como la "estimulación cerebral profunda" (DBS) - se han incorporado con éxito en la práctica clínica. Sin embargo, incluso las estrategias terapéuticas más recientes no han sido capaces de desplazar a levodopa de su posición preponderante, a pesar de los efectos indeseables (disquinesia y fluctuaciones motoras, en particular) que acompañan de forma inevitable a la toma prolongada de este fármaco durante un periodo de años. El déficit más grave actualmente es la falta de herramientas terapéuticas para tratar la enfermedad no tanto, o no solamente, desde un punto de vista sintomático, como en el caso de L-DOPA, sino también para permitir una contención del proceso neurodegenerativo, no ya para desencadenar mecanismos de regeneración a nivel nigroestriatal. En otras palabras, un autentico salto adelante en el tratamiento de PD puede conseguirse solamente cuando se diseñen estrategias terapéuticas que impliquen realmente procesos neuroprotectores y/o neuroreparadores.

Volviendo al factor de crecimiento nervioso, el principal obstáculo para su uso en estas terapias se basa en el hecho de que hay que transportar a los tejidos cerebrales concentraciones de tal magnitud que no pueden tomarse mediante los métodos de administración normales. De hecho, todos los estudios realizados actualmente han demostrado la eficacia del NGF solamente si se administraba por vía intracerebral (por vía intracerebroventricular), dado que esta molécula es incapaz de pasar a través de la barrera hematoencefálica en concentraciones terapéuticas mediante administración sistémica. La estrategia terapéutica más reciente para el uso del NGF como fármaco anti-AD se basa en la inoculación intracerebral de células modificadas genéticamente de modo que liberen NGF a nivel local (Tuszynski M. H. et al., *J. Mol. Neurosci.*, 19(1-2): 207, 2002; Tuszynski M. H. et al., *Nat. Med.*, 11(5): 551-5, 2005).

Los trabajos experimentales mencionados han demostrado que la administración intracerebral de NGF es eficaz para prevenir, o al menos retardar, la muerte neuronal causada por las patologías mencionadas anteriormente. Además, ninguno de estos estudios mostraba efectos secundarios en animales. Sin embargo, debe observarse que, en todas las publicaciones mencionadas anteriormente, el NGF se administró a los tejidos cerebrales mediante inyección intracerebral.

La patente europea EP 0721343 (Syntex), por ejemplo, se refiere a formulaciones farmacéuticas basadas en NGF propuestas para el tratamiento de las patologías mencionadas anteriormente y recuerda que las preparaciones a base de NGF tienen la desventaja de ser mal absorbidas por el cuerpo si se administran por vía oral, y que la única solución posible era mediante administración parenteral, inyección o infusión. Dado que la preparación a base de NGF propuesta es incapaz de pasar a través de la barrera hematoencefálica, el documento proponía - para una administración del producto que debe alcanzar los tejidos cerebrales - inyecciones o infusiones intraventriculares a través de una cánula implantada de forma intracerebroventricular o a través de implantes intracerebrales de dispositivos o bombas de liberación retardada.

Las solicitudes de patente internacional PCT publicadas respectivamente con los N° WO 98/48002 y WO 00/44396, de las cuales es autor uno de los inventores de la presente invención, han resultado ser, hasta la fecha, la única documentación de patentes que contiene una descripción del uso del NGF para aplicación oftálmica externa, tal como en forma de gotas oftálmicas o como una pomada. El trabajo experimental descrito demuestra cómo la administración tópica del NGF puede resolver con éxito patologías de la superficie ocular (córnea y conjuntiva) e, inesperadamente, también patologías que afectan a tejidos oculares internos. Por lo tanto, el NGF resultó ser adecuado para tratar con éxito patologías oftálmicas para las cuales no existían terapias eficaces anteriores.

Aunque la actividad terapéutica del NGF para patologías del sistema nervioso central ya se ha descrito en la bibliografía, y específicamente para AD y PD, hasta la fecha no ha propuesto ninguna solución para el problema de una administración fácil del ingrediente activo a los tejidos afectados. En efecto, las técnicas que emplean inyecciones intracerebrales o la implantación de dispositivos dentro de los tejidos cerebrales, de modo que el ingrediente activo sea liberado de forma continua *in situ* - como en el caso de los dispositivos descritos en la patente europea mencionada anteriormente EP 0721343 - presentan el riesgo de diversas complicaciones, descritas en la bibliografía, tales como infecciones, hemorragias y lesiones de las estructuras anatómicas durante la inyección. Estas complicaciones pueden producirse de forma aún más frecuente en el tratamiento de patologías crónicas, y pueden conducir a la inaplicabilidad de la terapia causando una inversión del equilibrio riesgo-beneficio.

De acuerdo con la presente invención, se descubrió sorprendentemente que, administrando NGF en forma de gotas oftálmicas sobre la superficie ocular, es posible obtener un aumento de los niveles de esta neurotrofina en todos los tejidos cerebrales, incluyendo líquido cefalorraquídeo. Se confirmó que el NGF, cuando se administra en forma de

gotas oftálmicas, es capaz de pasar a través a nivel del sistema nervioso central, y puede ejercer *in situ* sus propias capacidades terapéuticas sobre enfermedades cerebrales (neurodegenerativas e isquémicas), incluyendo, específicamente, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

5 Como se ilustrará en detalle en el informe experimental a continuación, el paso de la molécula NGF desde la superficie del ojo sobre la que se administra, hacia los tejidos cerebrales, se demostró usando tanto un método autorradiográfico (Levi-Montalcini, R. & Aloe L., Proc. Natl. Sci. USA 82: 7111- 7115,1985), como una dosificación inmunoenzimática (Bracci-Laudiero, L. et al., Neurosci. Lett., 147: 9-12,1992). En particular, aplicando el último método en ratas tratadas con una instilación conjuntival de NGF en una solución salina, se descubrió que, dos horas
10 después de la administración, había un aumento de la concentración de NGF en todos los tejidos cerebrales examinados. Este aumento de la concentración se reducía gradualmente a niveles de base después de aproximadamente 24 horas.

15 Este efecto permite al NGF realizar una acción terapéutica no solamente en tejidos oculares internos no directamente afectados por su administración en superficie, como ya se había supuesto previamente, sino también - y de forma inesperada - en tejidos de la región cerebral fuera del ojo, y de este modo, específicamente, en el sistema nervioso central. Este aspecto es innovador para patologías cerebrales, para las cuales la eficacia terapéutica del NGF ya había quedado demostrada, pero no habiendo al mismo tiempo ningún método de administración farmacológica disponible que permitiera una administración fácil del ingrediente activo sin peligro o
20 efectos secundarios para el paciente.

Es obvio que la posibilidad de contar con una administración tópica externa de un agente terapéutico de tipo oftálmico, es decir en forma de gotas oftálmicas o pomada, cuando el sitio de acción deseado para el ingrediente activo es el sistema nervioso central, representa un beneficio considerable en comparación con la administración
25 mediante la vía parenteral ya conocida y mediante inyección intracerebral.

Por lo tanto, la presente invención proporciona específicamente el uso de factor de crecimiento nervioso (NGF) para la producción de una preparación oftálmica para administración sobre la superficie ocular, para la terapia y/o la profilaxis de patologías del sistema nervioso central, en el que dicha preparación oftálmica está en forma de gotas oftálmicas y contiene de 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$ de NGF.
30

La presente invención también proporciona factor de crecimiento nervioso (NGF) para la terapia y/o la profilaxis de patologías que afectan al sistema nervioso central, en el que el NGF es una preparación oftálmica para administración sobre la superficie ocular y en el que dicha preparación oftálmica está en forma de gotas oftálmicas y
35 contiene de 10 a 500 $\mu\text{g/ml}$ de NGF.

Específicamente, la preparación de acuerdo con la presente invención puede estar indicada para la terapia y/o la profilaxis de patologías que afectan a las estructuras encefálicas, o para la terapia y/o la profilaxis de patologías que afectan a la médula espinal. En ambos casos, la preparación oftálmica a base de NGF puede estar indicada para la
40 terapia de patologías de naturaleza post-traumática, o de naturaleza infecciosa, post-quirúrgica, autoinmune, distrófica, degenerativa, isquémica o post-inflamatoria. Entre éstas, además de las patologías que han sido el principal objeto de la investigación que conduce a la presente invención, también pueden incluirse diversas formas de demencia de tipo no degenerativo, tales como aquellas derivadas de traumatismos mecánicos repetidos y que se conocen a menudo como "demencia del boxeador", o las derivadas de trastornos cerebrovasculares.

Más específicamente, la preparación oftálmica a base de NGF de acuerdo con la presente invención está indicada para la terapia y/o la profilaxis de patologías cerebrales neurodegenerativas, entre las cuales, de acuerdo con algunas formas de realización preferida de la presente invención, enfermedad de Parkinson y enfermedad de
45 Alzheimer.

De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención, la preparación oftálmica también puede aplicarse a la terapia y/o la profilaxis de degeneraciones neuronales del tracto corticoespinal, de las cuales la esclerosis lateral amiotrófica constituye otro ejemplo sobre el cual el NGF puede tener efectos positivos.

55 En la presente descripción debe observarse que por "factor de crecimiento nervioso" o "NGF" se entiende cualquier forma biológicamente activa de NGF, preferible aunque no exclusivamente la subunidad β , natural o recombinante, pero también formas híbridas o modificadas del NGF que se unen a su receptor correspondiente y conservan la biodisponibilidad del NGF, o incluso fragmentos o híbridos del NGF en los que algunos aminoácidos han sido eliminados o sustituidos, obviamente a condición de que el producto resultante conserve una capacidad suficiente para unirse al receptor específico. En este contexto, la presente invención también incluye, por ejemplo, el uso de
60 proteínas a base de NGF junto con proteínas portadoras, tales como transferrina, y compuestos que ejercen una acción similar a NGF a través de enlaces al receptor del NGF.

Más específicamente, dicha preparación oftálmica a base de NGF está en forma de una solución o suspensión (colirio o gotas oftálmicas), pomada, gel o crema con un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable tolerado por el ojo y compatible con el ingrediente activo. También es posible prever formas particulares de administración
65

oftálmica basadas en liberación retardada, como insertos oculares erosionables o sistemas de “depósito” de membrana polimérica colocados dentro del saco conjuntival. Como alternativa, el NGF, o una preparación que lo contiene, puede añadirse a una venda local con una lente de contacto terapéutica.

5 Como ya se ha indicado y también confirmado mediante los datos experimentales descritos a continuación, la administración tópica externa del NGF también resultó ser capaz de inhibir la degeneración neuronal en modelos animales de enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Las administraciones del NGF mediante aplicaciones sobre la superficie ocular inducen la supervivencia neuronal y una mejora comportamental del animal en modelos animales de enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, cuando hay una pérdida de
10 neuronas cerebrales.

Más específicamente, los efectos del NGF administrado como gotas oftálmicas en enfermedad de Parkinson son los siguientes: 1) una disminución del número de neuronas apoptóticas en la sustancia negra compacta (SNc); 2) un aumento del número de neuronas dopaminérgicas (DAergic) en la SNc; 3) una disminución del número de cuerpos de Lewy (incluyendo los tipos citoplasmáticos típicos de enfermedad de Parkinson y que se consideran un
15 marcador); 4) un aumento del número de neuronas en otras regiones del cerebro incluyendo el locus cerúleo, el hipotálamo, la corteza cerebral y el núcleo basal; 5) una disminución del comportamiento de movimiento circular de ratas (desorientación espacial con movimiento circular, otro síntoma típico de la enfermedad).

20 Los efectos del NGF administrado en forma de gotas oftálmicas en enfermedad de Alzheimer son los siguientes: 1) una disminución del número de neuronas apoptóticas en el hipocampo y la región cortical; 2) un aumento del número de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal, el hipocampo y la región cortical; 3) una disminución del número de placas amiloides; 4) una disminución de los niveles de péptido A β 42 (un marcador de la enfermedad de Alzheimer, donde A β representa la proteína amiloide); 5) una disminución de la inflamación; 6) un aumento de los
25 niveles de acetilcolina.

La posibilidad de que NGF pudiera ejercer una acción biológica sobre el tejido cerebral después de la administración oftálmica tópica era apenas previsible, sobre todo, en vista de que - como se ha resaltado anteriormente - el NGF es una molécula de un tamaño considerable (26.800 dalton) con una estructura compleja. Para que una molécula tenga
30 cualquier acción sobre los tejidos cerebrales, a continuación - una vez instilada en la superficie del ojo - debe ser capaz de pasar a través de los tejidos del ojo y alcanzar el nervio óptico y el líquido cefalorraquídeo para ejercer su propia actividad biológica sobre la región cerebral. En la práctica actual, la administración ocular no se usa para tratar patologías cerebrales. Lo anterior se debe a que todos los estudios conocidos relativos al uso del NGF en patologías cerebrales han empleado solamente administración intracerebral.

35 En realidad, aunque tiene una estructura compleja y un alto peso molecular, el NGF tiene grupos estructurales tanto hidrófilos como hidrófobos que le permiten pasar a través de las barreras anatómicas homólogas (lípidos e hidrófilas). Además, una característica fundamental del NGF es que, una vez que alcanza los órganos diana incluso a concentraciones muy bajas, pero biológicamente activas, puede estimular la producción endógena del NGF por el propio tejido. La presencia de una fracción endógena del NGF es confirmada claramente por los resultados de
40 experimentos (que se ilustrarán a continuación) sobre el paso del NGF a través de los tejidos. Estos resultados también muestran que no se mantiene un gradiente de concentración desde la superficie externa del ojo hacia el cerebro, como se había formulado la hipótesis para un mecanismo de difusión sencilla a través de los tejidos.

45 Para producir la preparación de acuerdo con la presente invención, en la bibliografía mencionada anteriormente se han descrito procedimientos adecuado para la extracción y purificación del NGF. La técnica de Bocchini y Angeletti, descrita brevemente en este documento, se usó para experimentos relativos a la presente invención. Se extraen las glándulas submandibulares de ratones macho adultos en condiciones estériles y los tejidos de las mismas se homogeneizan, se centrifugan y se dializan. La suspensión se hace pasar a continuación a través de columnas de
50 celulosa sucesivas, en las que el NGF es adsorbido. El NGF se eluye a continuación de la columna por medio de un tampón de cloruro sódico 0,4 M. Las muestras obtenidas de este modo se analizan espectrofotométricamente a una longitud de onda de 280 nm para identificar las fracciones que contienen el NGF. Estas fracciones se dializan y el NGF se liofiliza en condiciones estériles y se refrigeran a -20°C.

55 Un producto medicinal de acuerdo con la presente invención y adecuado para administración sobre la superficie ocular contiene preferiblemente, en solitario o junto con uno o más ingredientes activos más, entre 10 y 500 μ g/ml y aún más preferiblemente en el intervalo de 200-250 μ g/ml. Una formulación específica para gotas oftálmicas puede contener, por ejemplo, 200 μ g/ml de NGF en una solución fisiológica de cloruro sódico al 0,9%, o en una solución salina equilibrada (BSS[®]): en ambos casos, la solución es isotónica con el líquido lacrimonal y, por lo tanto, es bien
60 tolerada por el ojo. Sin embargo, también es posible usar soluciones hipotónicas.

El NGF contenido en las soluciones salinas puede estar presente en solitario o junto con otras moléculas biológicamente activas y/o conjugado con otras moléculas portadoras (tales como transferrina). Para mejorar más su paso a través de la superficie ocular, pueden añadirse otros excipientes seleccionados entre aquellos usados
65 actualmente en técnicas farmacéuticas, tales como soluciones o suspensiones tampón para estabilizar el ingrediente

activo y hacer a la preparación bien tolerada. Más específicamente, los tampones deben conservar el pH en el intervalo de 4-8, y preferiblemente en el intervalo de pH=6,5 y pH=7,5. Por ejemplo, la solución de cloruro sódico mencionada anteriormente puede tamponarse con cualquiera de los tampones bien conocidos en el campo farmacéutico como adecuados para uso oftálmico, entre los cuales fosfato o trizma (tri-hidroximetilaminometano), para tener un pH fisiológico de 7,0-7,4, manteniendo al mismo tiempo osmolaridad fisiológica (295-305 mOsm/l).

La tolerabilidad puede mejorarse adicionalmente usando excipientes tales como polisorbato 80 (o Tween 80), dextrano, polietilenglicol (por ejemplo, PEG 400) y similares. La formulación también puede contener agentes que promueven la viscosidad tales como ácido hialurónico, metilcelulosa, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y similares, para mejorar la biodisponibilidad, la estabilidad y la tolerabilidad del ingrediente activo. La biodisponibilidad del NGF puede mejorarse adicionalmente usando sustancias que aumentan la penetración corneal del fármaco, tales como dimetilsulfóxido, taurocolatos, fosfolípidos de membrana y diversos agentes tensioactivos adecuados para uso oftálmico. Además, un agente conservante que tiene actividad antimicrobiana puede añadirse a la formulación para evitar la contaminación.

Pueden añadirse agentes como carboximetilcelulosa o similares a productos a administrar en forma de suspensión. Si se desea usar la formulación en forma de pomada, gel o crema oftálmica, el portador de NGF podría ser polietilenglicol, poliacrilatos, óxidos de polietileno, ácidos grasos y alcoholes o lanolina, parafina y similares.

Algunos resultados experimentales obtenidos en el marco de la presente invención se describen a continuación simplemente con fines ejemplificantes.

Estudios sobre el paso del NGF desde la superficie del ojo al cerebro

En una primera serie de ensayos para evaluar el paso de NGF por vía intraocular desde la superficie externa, en la que se administra, a los tejidos cerebrales, el método autorradiográfico mencionado anteriormente se usó en un grupo de seis conejos. Cada uno de los conejos recibió una gota de colirio (50 μ l) que contenía 10 μ g de NGF marcado con I^{125} (concentración: 200 μ g/ml) mediante instilación en el fórnix de la conjuntiva.

Se usó NGF murino, purificado de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente y conjugado posteriormente a Na- I^{125} (Amersham Italia, IMS30, 1 mCi) de acuerdo con el método de cloramina T (Lapack P.A., Exp. Neurol., 124: 1620, 1993). La cantidad de NGF marcado se determinó mediante cromatografía usando una columna Sephadex G-25. La cantidad de producto marcado con I^{125} recogible mediante precipitación estaba entre el 90 y el 95%, lo que demostraba que la mayor parte del producto radiactivo se unía a NGF. La actividad específica de NGF- I^{125} estaba entre 1 y 1,5 Ci/ μ mol

Dos horas después de la administración del NGF marcado, los animales fueron sacrificados y los cerebros se diseccionaron y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 48 horas. A continuación, después de la incubación en sacarosa al 30% durante 24 horas, las muestras se cortaron con criostato en secciones de 15 μ m de grosor, que se montaron sobre portaobjetos gelatinosos de histología, se sumergieron en emulsión fotográfica (Ilford K2) y se incubaron durante 4 semanas a 4°C. Las secciones se deshidrataron a continuación con etanol, se montaron con DPX después del tratamiento con xileno y se examinaron con un microscopio óptico de Zeiss.

Este experimento demostró que, una vez administrado sobre la superficie del ojo, el NGF marcado era capaz de penetrar en el ojo y de unirse a células de diversos tejidos del cerebro (incluyendo la corteza, el hipocampo, el prosencéfalo basal, la sustancia negra, el locus cerúleo, el hipotálamo y el núcleo basal) que expresan el receptor específico.

En una segunda serie de ensayos, usando el método inmunoenzimático mencionado anteriormente, los niveles cuantitativos de NGF en diversos tejidos cerebrales se determinaron después de la administración de una gota de NGF murino en el fórnix de la conjuntiva. Se usaron un total de 24 ratas, seis de las cuales se sacrificaron inmediatamente para determinar los valores de base de concentración del NGF en los diversos tejidos del cerebro. Los restantes animales se sacrificaron 2 horas (6 ratas), 6 horas (6 ratas) y 24 horas (6 ratas) después de la administración de la gota oftálmica.

En todos los casos, se recogieron líquido cefalorraquídeo y cerebro, y las diferentes regiones del cerebro (incluyendo la corteza, el hipocampo, el prosencéfalo basal, la sustancia negra, el locus cerúleo, el hipotálamo y el núcleo basal) se diseccionaron. Después de pesarlos, los tejidos se sonicaron (usando un sonicador Braun B) en una matriz de proteína tamponada que contenía inhibidores de proteasa (tampón de extracción). El homogenizado obtenido de este modo se centrifugó (10000 g durante 20 minutos) y el sobrenadante se usó para determinar los niveles de NGF mediante el método inmunoenzimático (ELISA). La técnica usada es extremadamente sensible y específica de NGF, y es capaz de detectar concentraciones de hasta 5 pg/ml. Se usó anticuerpo policlonal de cabra anti-NGF como primer anticuerpo, diluido en un tampón carbonato 0,05 M a un pH de 9,6. Como control, para determinar la señal inespecífica, se usaron inmunoglobulinas de cabra purificadas.

Las soluciones con el anticuerpo primario y con las inmunoglobulinas de control se distribuyeron en paralelo en

5 placas de poliestireno de 96 pocillos. Las placas se incubaron durante 12 horas a temperatura ambiente y a continuación los sitios inespecíficos se bloquearon con una solución tampón de carbonato más BSA al 1%. Después de lavar las placas con una solución de Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 200 mM, gelatina al 0,5% y Triton X-100 al 0,1%, las muestras de NGF y soluciones patrón se diluyeron adecuadamente con una solución de Tris-HCl 100 mM a pH 7,2, NaCl 400 mM, EDTA 4 mM, PMSE 0,2 mM, cloruro de bencetonio 0,2 mM, bencimidina 2 mM, aprotinina 40 U/ml, azida sódica al 0,05%, BSA al 2% y gelatina al 0,5%. Después de la distribución por triplicado de muestras de NGF y soluciones patrón en una cantidad de 50 µl/pocillo, las placas se incubaron con el anticuerpo secundario: 4 mU/pocillo de anti-β-NGF-galactosidasa (Boehringer, Mannheim, Alemania) durante 2 horas a 37°C. A continuación, después del lavado, se distribuyeron 100 µl/pocillo de una solución que contenía 4 mg de β-galactosil-rojo clorofenol (Boehringer, Mannheim, Alemania) por ml de una solución que contenía HEPES 100 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ mM, azida sódica al 0,1% y BSA al 1%.

15 Después de la incubación del cromógeno durante dos horas a 37°C, la densidad óptica se determinó a una longitud de onda de 575 nm por medio de un lector de ELISA (Dynatech). Los valores de concentración de los patrones y muestras de NGF se calcularon después de restar los valores de fondo debidos a enlaces no específicos. Los datos expresados como pg/ml o como pg/g se refieren a tejidos recién pesados. Los resultados, resumidos en la Tabla 1 a continuación, muestra cómo hay un aumento de los niveles de NGF en todos los tejidos cerebrales 2 horas después de la administración de la gota oftálmica; estos valores siguen siendo altos, aunque reducidos, y a continuación vuelven a niveles de base después de 24 horas.

TABLA 1
Niveles de NGF en diversos tejidos cerebrales después de la administración de NGF en forma de gotas oftálmicas (NGF pg/g de tejido)

HORAS	líquido cefalorraquídeo	corteza	hipocampo	proscéfalobasal	sustancia negra	locus cerúleo	hipotálamo	núcleo basal
0	20 ± 7	70 ± 12	135 ± 32	102 ± 23	98 ± 34	75 ± 36	170 ± 45	112 ± 24
2	90 ± 15	120 ± 17	176 ± 14	153 ± 34	178 ± 25	154 ± 71	286 ± 71	165 ± 31
6	530 ± 59	312 ± 52	212 ± 23	264 ± 68	329 ± 60	312 ± 79	396 ± 54	254 ± 42
24	30 ± 12	81 ± 20	127 ± 21	120 ± 31	135 ± 59	91 ± 84	198 ± 38	131 ± 39

Estudios sobre el efecto de la administración de NGF en forma de gotas oftálmicas en enfermedad de Parkinson

Para evaluar la eficacia de la administración de NGF sobre la superficie ocular para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, se administró NGF en forma de gotas oftálmicas en un modelo animal 4 veces al día, a una concentración de 200 µg/ml diluida en una solución salina equilibrada.

Las características de la enfermedad de Parkinson (PD) incluyen bradiquinesia, temblor en reposo y trastornos motores. Las características patológicas incluyen principalmente degeneración de neuronas dopaminérgicas (DAergic) en la sustancia negra compacta (SNc) y presencia de cuerpos de Lewy. La degeneración de otros sistemas también se ha descrito, incluyendo el locus cerúleo, el hipotálamo, la corteza cerebral, el núcleo basal, los componentes centrales y periféricos del sistema nervioso autónomo. Los síntomas de la enfermedad de Parkinson se observan cuando hay aproximadamente una disminución del 80% de neuronas DAergic en la SNc. En ausencia de marcadores biológicos, la predictibilidad de una disfunción temprana del sistema DAergic es problemática. Aunque no hay manifestaciones espontáneas de enfermedad de Parkinson (PD) en animales, los muchos modelos experimentales en animales de PD se han usado para obtener las mismas características clínicas en animales. Las técnicas que emplean neurotoxinas para producir lesiones en el sistema dopaminérgico nigroestriatal tienen una selectividad y reproducibilidad considerables. En este experimento, la neurotoxina usada era 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

Las ratas se anestesiaron mediante inyección i.p. de cloruro hidratado. Lesiones dopaminérgicas mediante inyección estereotáctica de 6-OHDA (Sigma), 8 µg/3 ml de solución salina en el cuerpo del prosencéfalo medio derecho (coordenadas del atlas de Paxinos & Watson: AP 4.4 mm, L +1.2 mm y V 7.8 mm desde la duramadre, incisión 2.4 mm por debajo de la línea interaural).

Un mes después de la lesión, el comportamiento de movimiento circular se descubrió en todas las ratas con D-anfetamina (con 5 mg/kg en solución salina) i.p. e hidrocloreto de apomorfina (50 µg/kg) por vía subcutánea. El comportamiento de movimiento circular se evaluó usando un rotómetro automático (Rotorcid, Cuba) y el número de círculos completos de 360º/minuto se registró automáticamente. Solamente aquellas ratas que muestran comportamiento de movimiento circular durante al menos 7 vueltas ipsilaterales completas por minuto con una inyección de D-anfetamina en 90 minutos, y 3,3 vueltas controlaterales completas por minuto en un periodo de 45 minutos con apomorfina se incluyeron en el estudio experimental.

Se administró NGF en forma de gotas oftálmicas durante 2 meses, 4 veces al día, a una concentración de 200 µg/ml en una solución salina equilibrada, en el fórnix de la conjuntiva de 10 ratas, mientras que solamente una solución salina equilibrada se administró a otro grupo de 10 ratas como controles.

Al final del periodo de tratamiento (dos meses), el ensayo comportamental se realizó de nuevo, después de lo cual los animales fueron sacrificados, sus cerebros se extirparon y se evaluaron histológicamente así como inmunohistoquímicamente. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 2 a continuación.

TABLA 2

Efecto del tratamiento con NGF en forma de gotas oftálmicas en un modelo animal de enfermedad de Parkinson					
	Número de neuronas apoptóticas en la SNc*	Número de neuronas dopaminérgicas en la SNc**	Número de cuerpos de Lewy***	Número de neuronas en otras regiones del cerebro***	Comportamiento de movimiento circular
2 meses después del tratamiento con NGF	disminución del 60%	aumento del 220%	aumento del 130%	aumento del 95%	disminución del 70%
* determinado usando el método TUNEL y anticuerpo anti-caspasa 3 ** determinado inmunohistoquímicamente *** determinado histológicamente					

El experimento anterior muestra que el NGF en forma de gotas oftálmicas es capaz de: 1) reducir el número de neuronas apoptóticas en la sustancia negra compacta (SNc); 2) aumentar el número de neuronas dopaminérgicas (DAergic) en la SNc; 3) reducir el número de cuerpos de Lewy; 4) aumentar el número de neuronas en otras regiones del cerebro incluyendo el locus cerúleo, el hipotálamo, la corteza cerebral y el núcleo basal; 5) reducir el comportamiento de movimiento circular de ratas.

Estudios sobre el efecto de NGF en forma de gotas oftálmicas para enfermedad de Alzheimer

Para evaluar la eficacia de la administración de NGF sobre la superficie ocular para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, se administró NGF en forma de gotas oftálmicas en un modelo animal 4 veces al día, a una

concentración de 200 µg/ml diluida en una solución salina equilibrada.

En el experimento descrito, se usaron ratones doblemente transgénicos que expresan ambas mutaciones humanas APP^{swe} y PS1 A246E (ratones APP PS1). Estos ratones desarrollan altos niveles de péptido Aβ42 altamente fibrilogénicos que desarrolla placas amiloides a partir de de aproximadamente los 9 meses de edad. Las primeras placas amiloides están presentes en el subículo (y en la corteza caudal), y estos depósitos se extienden después al hipocampo y a todas las regiones corticales. Esta característica es, en cierta manera, similar a las fases tempranas de la enfermedad de Alzheimer, donde las placas amiloides también están ampliamente restringidas a las estructuras corticales mediales temporales.

Se administró NGF en forma de gotas oftálmicas durante 2 meses, 4 veces al día, a una concentración de 200 µg/ml en una solución salina equilibrada, en el fórnix de la conjuntiva de 10 ratones macho (9 meses de edad), mientras que solamente se administró una solución salina equilibrada a otro grupo de 10 ratones (misma edad y género) a usar como controles.

Al final del periodo de tratamiento (dos meses) los animales fueron sacrificados, sus cerebros se extirparon y se evaluaron histológica e inmunohistoquímicamente. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 3 a continuación.

TABLA 3

Efecto del tratamiento con NGF en forma de gotas oftálmicas en un modelo animal de enfermedad de Alzheimer						
	Número de neuronas apoptóticas en el hipocampo y la corteza*	Número de neuronas colinérgicas**	Número de placas amiloides***	Niveles del péptido Aβ42**	Microglia activada (GFAP+ y CD11b+)**	Niveles de acetilcolina****
2 meses después del tratamiento con NGF	disminución del 65%	aumento del 190%	disminución del 60%	aumento del 76%	disminución del 50%	aumento del 120%
* determinado usando el método TUNEL y anticuerpo anti-caspasa 3 ** determinado inmunohistoquímicamente *** determinado mediante tinción con Rojo Congo **** determinado con ELISA específico						

El experimento anterior muestra que NGF en forma de gotas oftálmicas es capaz de: 1) reducir el número de neuronas apoptóticas en el hipocampo y la región cortical; 2) aumentar el número de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal, el hipocampo y la región cortical; 3) reducir el número de placas amiloides; 4) reducir los niveles de péptido Aβ42; 5) reducir la inflamación; 6) aumentar los niveles de acetilcolina.

La presente invención se ha descrito en referencia a algunas realizaciones específicas de la misma, pero debe entenderse que variaciones o modificaciones pueden ser presentadas por especialistas en la técnica sin alejarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Factor de crecimiento nervioso (NGF) para su uso en la terapia y/o la profilaxis de patologías que afectan al sistema nervioso central, en el que el NGF es una preparación oftálmica para administración sobre la superficie ocular y en el que dicha preparación oftálmica está en forma de gotas oftálmicas y contiene de 10 a 500 µg/ml de NGF.
- 10 2. Factor de crecimiento nervioso para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha preparación oftálmica está indicada para la terapia y/o la profilaxis de patologías que afectan a las estructuras encefálicas.
- 15 3. Factor de crecimiento nervioso para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha preparación oftálmica está indicada para la terapia y/o la profilaxis de patologías que afectan a la médula espinal.
- 20 4. Factor de crecimiento nervioso para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dichas patologías son patologías de origen post-traumático, infeccioso, post-quirúrgico, autoinmune, distrófico, degenerativo, isquémico y post-inflamatorio.
- 25 5. Factor de crecimiento nervioso para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha preparación oftálmica está indicada para la terapia y/o la profilaxis de patologías cerebrales neurodegenerativas.
- 30 6. Factor de crecimiento nervioso para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha preparación oftálmica está indicada para la terapia y/o la profilaxis de degeneraciones neuronales del tracto corticoespinal.
- 35 7. Factor de crecimiento nervioso para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicha preparación oftálmica está indicada para la terapia y/o la profilaxis de enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.
- 40 8. Factor de crecimiento nervioso para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicha preparación oftálmica está en forma de una solución o suspensión (gotas oftálmicas), pomada, gel o crema con un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, o en forma de un inserto ocular erosionable o sistema de "depósito" de membrana polimérica a colocar en el saco conjuntival, o se añade a una venda local con una lente de contacto terapéutica.
- 45 9. Factor de crecimiento nervioso para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dichas gotas oftálmicas contienen 200-250 µg/ml de NGF.
- 50 10. Factor de crecimiento nervioso para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el NGF en dicha preparación oftálmica está en combinación con uno o más ingredientes activos y/o conjugado con una molécula portadora.
11. Factor de crecimiento nervioso para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que dicho NGF es de origen murino o humano, o es NGF humano recombinante o un compuesto que ejerce una acción similar a NGF a través de una unión con receptores de NGF.
12. Uso de factor de crecimiento nervioso (NGF) para la producción de una preparación oftálmica para administración sobre la superficie ocular, para la terapia y/o la profilaxis de patologías que afectan al sistema nervioso central, en el que dicha preparación oftálmica está en forma de gotas oftálmicas y contiene de 10 a 500 µg/ml de NGF.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicha preparación oftálmica está indicada para la terapia y/o la profilaxis de enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.