

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 976**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2010 E 10809037 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2501362**

54 Título: **Preparaciones oftálmicas basadas en el BDNF (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro) y sus usos**

30 Prioridad:

**16.11.2009 IT MI20092012**

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

**16.12.2014**

73 Titular/es:

**HMFA HUNGARY LIMITED LIABILITY COMPANY  
(100.0%)  
Villanyi Ut 47  
1118 Budapest, HU**

72 Inventor/es:

**DOMENICI, LUCIANO;  
GIOVANNINI, LUCA y  
SANSO', MARCO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 524 976 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

Preparaciones oftálmicas basadas en el BDNF (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro) y sus usos

**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención se refiere a preparaciones oftálmicas en la forma de gotas oculares, que contienen el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y un agente controlador de la viscosidad, preferentemente un galactoxiloglucano extraído de semillas de tamarindo, también conocido como polisacárido TS o TSP.

10 Dichas preparaciones son útiles en la prevención y el tratamiento de trastornos retinianos neurodegenerativos, especialmente retinitis pigmentaria, glaucoma (incluyendo glaucoma congénito, glaucoma infantil, glaucoma juvenil, glaucoma adulto, glaucoma primario de ángulo abierto, glaucoma primario de ángulo cerrado, glaucoma secundario, glaucoma iatrogénico y glaucoma agudo), retinopatías relacionadas con la edad, tales como degeneración macular relacionada con la edad, trastornos retinianos vascular y proliferativo, desprendimiento de retina, retinopatía del prematuro (ROP) y retinopatía diabética, todos ellos trastornos que dan lugar a ceguera.

**Técnica anterior**

15 Las neurotrofinas son proteínas sintetizadas por las células nerviosas que controlan la supervivencia y el trofismo normal de diversas células presentes en el sistema nervioso.

El factor de crecimiento nervioso (NGF), descubierto por R. Levi-Montalcini y S. Cohen a mediados del siglo 20, es el que mejor se conoce.

20 Posteriormente se descubrieron otros factores, cuya estructura proteica presenta similitudes estructurales con las del NGF; por consiguiente, ahora se considera una clase de factores NGF (neurotrofinas) a la que pertenecen el BDNF, NT-3, NT-4/5 y NT-6 así como el NGF (los tres primeros se expresan principalmente en el sistema nervioso de mamíferos, mientras que el NT-6 es un nuevo miembro de las neurotrofinas identificado en peces teleósteos y ausente en el cerebro de mamíferos).

Los factores neurotróficos, que incluyen las neurotrofinas, se liberan por las células nerviosas que los sintetizan, y se unen a receptores específicos en la membrana.

25 A pesar de sus similitudes estructurales, las diversas neurotrofinas actúan a través de diferentes receptores, y en consecuencia a través de diferentes mecanismos de acción.

La unión de un factor neurotrófico a su receptor específico (TrkA para NGF; TrkB para BDNF y en parte para NT-4; TrkC para NT-3) genera una cascada de sucesos, que provoca una respuesta específica por la célula nerviosa.

30 En diferentes zonas se expresan diferentes receptores de neurotrofinas y, en la misma zona, en células diferentes, activan rutas específicas de transducción de señales intracelulares. De ello se deduce lógicamente que no todas las zonas o células nerviosas pueden responder a cada una de las cuatro neurotrofinas; el factor limitante es la distribución celular del receptor específico para una neurotrofina determinada.

35 La distribución de las células retinianas capaces de sintetizar y liberar NGF, el arquetipo de las neurotrofinas y la distribución de las células retinianas que expresan el receptor de NGF (TrkA), parece muy limitado, y se restringe en la práctica a un subgrupo de células ganglionares y células gliales astrocíticas (García et al., 2003).

El documento EP 1 161 256 B1 describe preparaciones oftálmicas que contienen de 200 a 500 µg/ml de NGF, para administrar en la superficie ocular intacta para el tratamiento y/o profilaxis de trastornos que afectan a la esclerótica, a los cuerpos ciliares, al cristalino, a la retina, al nervio óptico, al humor vítreo y/o a la coroides.

40 Como informaron Lambiase et al., estas preparaciones aumentan los niveles retinianos de NGF; sin embargo, puede demostrarse que el NGF no puede realizar un efecto neuroprotector en la retina.

Esto concuerda con los hallazgos recientemente comunicados por Shi et al. (2007). El NGF puede unirse a dos tipos de receptores en la retina, TrkA y P75, que ejercen efectos opuestos en el trofismo y la supervivencia de las células nerviosas. Cuando el NGF exógeno alcanza la retina, puede por lo tanto inducir dos efectos opuestos en las células retinianas, que tienden a cancelarse entre sí.

45 Por lo demás, el BDNF, junto con su receptor, TrkB, se expresa abundantemente en la retina de mamíferos. La retina consiste en numerosos tipos de células dispuestas en capas. En particular, el BDNF se sintetiza por algunas células ganglionares y células amacrinas, tales como las células dopaminérgicas, presentes en la capa interna de la retina (Herzog et al., 1994; Perez y Caminos, 1995; Hallbook et al., 1996; Herzog y von Bartheld, 1998; Karlsson y Hallbook, 1998; Bennett et al., 1999; Pollock y Frost, 2003; Seki et al., 2003; Chytrova y Johnson, 2004).

50 El receptor de BDNF, denominado TrkB, se expresa en numerosos tipos de células retinianas, incluyendo células ganglionares, células amacrinas y células gliales de Müller (Jelsma et al., 1993; Cellerino y Kohler, 1997; Di Polo et

al, 2000).

El documento WO 97/45135 se refiere a composiciones farmacéuticas estables de BDNF en forma de una solución acuosa o un liofilizado. En ese documento, especialmente en la sección dedicada a la técnica anterior, el BDNF se menciona como que es útil en el tratamiento de diversos trastornos, que incluyen retinitis pigmentaria. La única forma de administración expresamente mencionada es preparaciones inyectables.

El documento JP 2003048851 se refiere a formulaciones oftálmicas basadas en BDNF, para administrarse en forma de gotas en la conjuntiva. Las formulaciones descritas contienen diversos agentes controladores de la viscosidad, descritas como que son igualmente efectivas transportando el BDNF a la retina.

La evidencia de la actividad indicada en dicho documento no es convincente, porque el intervalo de concentración indicado para el BDNF es muy amplio: 0,001-1 % en peso/volumen, que corresponde a un intervalo de concentración de entre  $1 \times 10^{-2}$  y  $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  [reivindicación 3, ámbito de patente; de acuerdo con la descripción detallada de la invención [0006], párrafo 3, pero en el ejemplo se describe la concentración usada es = 0,004 % (% en peso/volumen), que corresponde a  $4 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , es decir mucho menor que las concentraciones efectivas capaces de aumentar los niveles retinianos de BDNF y prevenir las alteraciones retinianas inducidas por la larga exposición a la luz, que son iguales a o mayores de  $15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , en el intervalo de  $15\text{-}200 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , de acuerdo con la presente invención. Deberá hacerse notar que en el documento JP 2003048851 la aplicación se repitió tres veces al día ( $10 \mu\text{l}$ /aplicación, 0,004 % en peso/volumen) durante 5 días, igual a una dosis de  $1,2 \mu\text{g}/\text{día}$  y una dosis total de  $6 \mu\text{g}$ . Incluso si la dosis diaria y la dosis total se tienen en cuenta, son demasiado bajas para ejercer efectos neuroprotectores; de hecho, de acuerdo con la presente invención, una dosis total mínima de  $150 \mu\text{g}$  debió administrarse por vía tópica para obtener efectos neuroprotectores en la retina sometida a daño lumínico. Nuevos datos obtenidos con otro modelo experimental, es concreto un ratón que desarrolla glaucoma, confirman que de las tres concentraciones de BDNF usadas ( $1,5$  y  $15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), sólo es efectiva la más elevada ( $15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

Además, el documento JP 2003048851 se refiere a un efecto protector de la retina verificado por técnicas histológicas (tinción de secciones de retina con hematoxilina-eosina) diseñadas para medir el grosor retiniano, pero no acompañado de una demostración del restablecimiento de la función retiniana medida por un registro electroretinográfico por destello, como se indica en la presente invención. Es bien conocido que para demostrar la eficiencia neuroprotectora a nivel retiniano de cualquier tratamiento, los resultados obtenidos solamente con técnicas histológicas/morfológicas son insuficientes; también es requisito la evidencia del restablecimiento de las funciones retinianas. Se puede concluir por lo tanto que en el documento JP 2003048851, las composiciones oftálmicas de BDNF en las concentraciones indicadas en los ejemplos, y más generalmente en el intervalo preferido, administradas externamente, no pueden pasar desde la superficie ocular al tejido interno en cantidades suficientes para ejercer un efecto neuroprotector que puede restablecer la función retiniana.

El documento WO 2006/046584 se refiere a composiciones de liberación sostenida que contienen HGF. El BDNF o el PEDF, impregnado con una gelatina de hidrógeno reticulada, útil en el tratamiento de trastornos que implican lesiones de las células visuales, tales como degeneración por retinitis pigmentaria. En los ejemplos específicos, las composiciones toman la forma de microesferas que contienen dosis de BDNF de entre  $0,001\text{-}1000 \mu\text{g}$ , y pueden administrarse por inyección intraocular o implante subretiniano.

El documento EP 0 958 831 describe composiciones oftálmicas que contienen un factor neurotrófico seleccionado de un grupo de factores que incluyen BDNF. Dichas composiciones pueden aplicarse externamente, por ejemplo, en forma de pomadas o soluciones oftálmicas o pueden formularse como lentes de contacto.

La concentración del factor neurotrófico descrito en el documento EP0958831 varía del 0,0001 al 0,5 % (peso/volumen), es decir de  $1 \times 10^{-3}$  a  $5 \mu\text{g}/\text{l}$ . Los intervalos de concentración indicados son por lo tanto muy amplios. El documento EP0958831 es altamente genérico, porque se refiere a diversos factores neurotróficos, incluyendo el BDNF, que sería igualmente eficaz en el intervalo de concentración. Se sabe que los factores neurotróficos no son igualmente eficaces en el mismo intervalo de concentración, debido a las distintas densidades y distribuciones de los receptores que determinan sus efectos biológicos en las distintas áreas cerebrales y células nerviosas individuales.

Además, el documento EP 958831 es extremadamente ambiguo y poco conciso acerca del intervalo de las concentraciones eficaces de BDNF para uso tópico: en la pág. 3 línea 44 (véanse los párrafos 0022 y 0033, reivindicaciones 19 y 20) se dan dos intervalos de concentración, que no concuerdan (intervalo A máximo, entre 0,0001 y 0,5 % (P/V), igual a un intervalo de concentración de entre  $10^{-3}$  y  $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , e intervalo B, entre  $10^{-3}$  y  $2 \times 10^5 \mu\text{g}/\text{l}$ ; los dos intervalos de concentración no corresponden claramente). Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, las concentraciones eficaces de BDNF son iguales a/mayores de  $15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (intervalo  $15\text{-}200 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , es decir mayor que el intervalo A indicado en el documento EP 958831, es decir el intervalo de concentración máxima. Los ejemplos en el documento EP 958831 se refieren a composiciones oftálmicas caracterizadas por una concentración de BDNF de 0,02, 0,04 y  $10 \mu\text{g}/\text{l}$ , es decir concentraciones que son mucho menores ( $1 \times 10^6$  veces menores) que la concentración más baja que, de acuerdo con la presente invención, ha demostrado eficacia en elevar los niveles de BDNF en la retina y prevenir tanto daño lumínico como daño por glaucoma, es decir  $15 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Puede concluirse por lo tanto que las composiciones oftálmicas de BDNF a las concentraciones indicadas en el documento EP 958831, administradas externamente, no pueden pasar de la superficie ocular a los tejidos internos en cantidades suficientes para aumentar los niveles retinianos de BDNF, y en consecuencia para realizar un efecto terapéutico.

- 5 La NT-4, otra neurotrofina que se une al TrkB, se expresa a un nivel bajo en la retina, y sólo actúa en un sub-grupo de células amacrinias, es decir, aquellas que sintetizan dopamina (Calamusa et al., 2007).

La ausencia del BDNF o su receptor causa serias alteraciones en la función retiniana; por ejemplo, ratones que carecen del receptor TrkB (ratones *knock-out*) se caracterizan por la pérdida completa de la respuesta retiniana a luz (ausencia total de onda-b en el electroretinograma por destello; Roher et al., 1999).

- 10 El grupo LaVail ha demostrado que las inyecciones intraoculares de BDNF, pero no de NGF, previenen eficazmente la degeneración morfológica de los fotorreceptores inducida por el daño lumínico.

Las inyecciones intraoculares de BDNF junto con otros factores neurotróficos han reducido el daño a las células ganglionares de la retina que dan como resultado lesiones del nervio óptico, a pesar de que no está todavía claro si el BDNF puede realizar efectos neuroprotectores solo, es decir independientemente de otros factores neurotróficos (Watanabe et al., 2003; Yata et al., 2007).

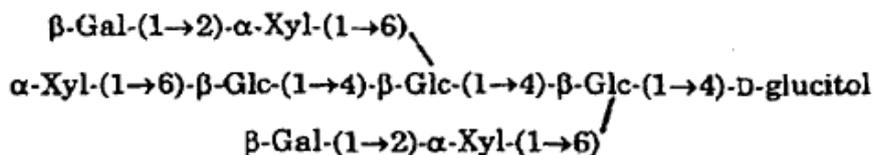
15 Otros factores neurotróficos, tales como el FGF2, también han demostrado eficacia previniendo alteraciones morfológicas causadas por el daño lumínico, pero a diferencia del BDNF, su administración tiene el efecto indeseable de activar factores involucrados en la respuesta inflamatoria (LaVail et al., 1987).

20 Otro factor neurotrófico, CNTF, también previene la degeneración morfológica resultante del daño lumínico (LaVail et al., 1978); desafortunadamente, experimentos recientes demuestran que el tratamiento en base a CNTF altera la respuesta retiniana a la luz, imponiendo así una serie de limitaciones en su posible uso terapéutico (McGill et al., 2007).

Estos resultados indican que, para los fines neuroprotectores en los modelos de trastornos retinianos, no es suficiente evaluar los efectos morfológicos de las moléculas neuroactivas; sobre todo, es esencial asegurar si aquellas moléculas ejercen efectos protectores en la función retiniana, y asegurarse de que no deterioran la respuesta de las células retinianas a estímulos visuales. Existe actualmente la necesidad de nuevas preparaciones de BDNF que pueden administrarse por técnicas no invasivas para transportar el BDNF a la retina, evitando técnicas de administración altamente invasivas tales como inyecciones intraoculares, subretinianas o retrobulbares, que son inadecuadas para el tratamiento crónico a largo plazo debido al riesgo de causar, por ejemplo, perforación del globo ocular, infecciones o sangrado.

La presente patente propone aplicaciones conjuntivales tópicas en diversas formulaciones que contienen BDNF en un intervalo de concentración de entre 15 y 200 µg/µl, con una dosis total de BDNF de entre 50 y 4000 µg por administración, de acuerdo con el tamaño del ojo a tratar, lo que dependerá de la especie animal en cuestión, incluyendo seres humanos.

- 35 La formulación contendrá preferentemente un agente controlador de viscosidad. Dicho agente controlador de viscosidad es preferentemente un galactoxiloglucano extraído de semillas de tamarindo (polisacárido TS o TSP) que tiene un peso molecular de entre 500000 y 800000 Da y la siguiente fórmula estructural:



- 40 Los inventores demuestran que dicha preparación, a las concentraciones y dosis por administración indicadas, aumenta significativamente los niveles de BDNF retinianos y previene i) alteraciones retinianas inducidas por larga exposición a la luz, y ii) alteraciones retinianas en el glaucoma.

Se ha demostrado previamente (Uccello-Barretta G et al., 2008; Ghelardi E et al., 2004; Burgalassi S et al., 2000; Ghelardi E et al., 2000) que el TSP puede transportar moléculas farmacológicamente activas para el tratamiento tópico de la superficie ocular. Aumentando los tiempos de retención de la formulación en la superficie ocular, se ha observado absorción aumentada de las moléculas activas. Esta propiedad del TSP se ha descrito en combinación con antibióticos (rifaximina, gentamicina y ofloxacina), antihistaminas (ketotifeno) y antihipertensivos (timolol), siendo todos ellos moléculas pequeñas.

En el caso de preparaciones farmacológicas que contienen proteínas recombinantes, tales como el BDNF, el principio activo es una proteína, una molécula con alto peso molecular sometida a modificaciones post-traduccionales y adaptación de su flexión espacial hasta que alcanza la configuración tridimensional activa. La actividad biológica de las proteínas es estrechamente dependiente de su configuración tridimensional, porque las interacciones con los receptores y enzimas específicos que las reconocen, y en consecuencia, la capacidad de intervenir en los procesos bioquímicos de la célula diana, dependen de ella. La configuración proteica puede modificarse considerablemente por el medio en el que ha de encontrarse una proteína recombinante. Las formulaciones que contienen proteínas recombinantes deben por tanto asegurar que la proteína se mantiene en solución en su configuración activa, y garantizar su estabilidad.

La presente invención demuestra que el TSP garantiza la estabilidad del BDNF en la formulación, aumenta su absorción ocular debido al largo tiempo de residencia de la formulación en la superficie, y sobre todo, mantiene el BDNF en su configuración biológicamente activa.

### **Sumario de la invención**

Se ha encontrado ahora que las formulaciones oftálmicas que contienen BDNF en concentraciones de al menos 15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  previenen alteraciones de la retina inducidas por larga exposición a la luz, y aquellas asociadas con presión intraocular aumentada en un modelo de glaucoma.

Por lo tanto, la invención se refiere a preparaciones oftálmicas en forma de gotas oculares que contienen factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). De acuerdo con un aspecto preferido de la misma, las composiciones a las que se refiere la invención contienen galactoxiloglucano extraído de semillas de tamarindo, conocido como TSP.

La presente invención también se refiere al uso del BDNF para preparar un medicamento en forma de gotas oculares para la prevención y/o tratamiento de trastornos neurodegenerativos de la retina, del nervio óptico y del cuerpo geniculado lateral.

La presente invención también se refiere a una preparación oftálmica en forma de gotas oculares que contienen BDNF para su uso en la prevención y/o tratamiento de trastornos neurodegenerativos de la retina, del nervio óptico y del cuerpo geniculado lateral.

### **Listado de figuras**

Figura 1 - Determinación de niveles del BDNF en la retina (A), nervio óptico (B) y humor vítreo (C) después de la aplicación tópica del BDNF en solución salina. Los niveles de BDNF se muestran en el eje y, y se midieron en el ojo tratado con BDNF y el ojo control tratado con solución salina; \* indica el significado de las diferencias.

Figura 2 - Determinación de niveles del BDNF en la retina (A), nervio óptico (B) y humor vítreo (C) después de la aplicación tópica del BDNF en solución con carboximetilcelulosa sódica. Para normas y símbolos, véase la Figura 1.

Figura 3 - Determinación de niveles del BDNF en la retina (A), nervio óptico (B) y humor vítreo (C) después de la aplicación tópica del BDNF en solución con TSP. Para normas y símbolos, véase la Figura 1.

Figura 4 - Eficiencia comparativa del TSP, solución salina (NaCl) y carboximetilcelulosa sódica (CMC) sobre el transporte del BDNF y el aumento de sus concentraciones retinianas ( $\text{pg}/\text{mg}$  de proteína, véase eje x). Los niveles retinianos del BDNF después del tratamiento tópico con BDNF en TSP (\*) aumentaron significativamente, en comparación con el nivel del BDNF después del tratamiento tópico con BDNF en solución salina y carboximetilcelulosa sódica. Los datos proceden del panel A en las Figuras 1, 2 y 3.

Figura 5 - Cinéticas de los niveles del BDNF en la retina, nervio óptico y humor vítreo después de la aplicación tópica del BDNF en solución con TSP. Los niveles del BDNF permanecen significativamente altos en las 6 primeras horas después del tratamiento (\*).

Figura 6 - La aplicación tópica del BDNF en TSP reduce las alteraciones inducidas por daño lumínico de la respuesta retiniana al destello (ERG por destello). Se midió la amplitud ( $\mu\text{V}$ , véase eje y) de la onda-b del electroretinograma provocada por destellos de diferentes luminancias ( $\text{cd}/\text{m}^2$ , véase eje x) y registrado por el ojo tratado con BDNF (símbolos negros) o por el ojo control tratado solo con TSP (control dañado por luz, símbolos blancos); \* indica que las diferencias son significativas.

Figura 7 - El tratamiento tópico con BDNF en TSP aumenta el número de fotorreceptores que sobreviven al daño lumínico. Los fotorreceptores se marcan con yoduro de propidio en secciones transversales de la retina. Independientemente del procedimiento usado (recuento en filas de cuerpos celulares de fotorreceptores (Figura 7B) o medida de la grosor de la capa nuclear externa (ONL) (Fig.7C)), los fotorreceptores presentes en la retina central y periférica son significativamente (\*) más numerosos en el ojo tratado con BDNF que en el ojo tratado con el portador (control).

Figura 8 - La aplicación tópica del BDNF en solución salina (NaCl) reduce el deterioro inducido por daño lumínico en la respuesta de la retina a la luz. Para una explicación de normas y símbolos, véase la Figura 6.

Figura 9 - El tratamiento tópico con BDNF en solución salina aumenta la supervivencia de los fotorreceptores después del daño lumínico. Para normas y los símbolos, véase la Figura 7.

Figura 10 - Aplicación tópica de BDNF en solución con carboximetilcelulosa sódica y respuesta deteriorada a la luz inducida por el daño lumínico. Para normas y los símbolos, véase la Figura 6.

Figura 11 - Efectos del tratamiento tópico con BDNF en solución con carboximetilcelulosa sódica sobre la supervivencia de los fotorreceptores después del daño lumínico en el ojo tratado con BDNF y en el ojo tratado con el portador (control). Para normas y símbolos, véase la Figura 7.

Figura 12 - Aumento en la presión intraocular (PIO, mmHg) en un modelo de glaucoma murino experimental, ratón DBA/2J frente a ratón normal (C57bl/6J). El aumento en la PIO en el DBA/2J es significativo (\*) a partir de 6 ½ meses de vida.

Figura 13 - La respuesta de la retina a patrones visuales (patrón ERG, P-ERG; estímulos que consisten en una frecuencia espacial =0,2 C/deg, contraste del 90 %) se registró en ratones normales (C57bl/6J, barra oscura) y ratones con desarrollo de glaucoma (DBA/2J); las amplitudes de las respuestas de P-ERG ( $\mu\text{V}$ , véase eje y) se midieron estimulando el ojo tratado durante dos semanas con diferentes concentraciones de BDNF (1, 5 y 15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y estimulando el ojo tratado con el portador, considerado como ojo control (CTRL); (\*) indica el significado de las diferencias. El P-ERG se registró a los 7 meses de vida del ratón DBA/2J, es decir, después del aumento en la presión intraocular (PIO).

Figura 14 - Células ganglionares de la retina (preparación de montaje completo) del ratón DBA/2J con desarrollo de glaucoma (de 7 meses de vida), marcadas con un anticuerpo fluorescente que se une a un factor de transcripción (Brn3b). A. La columna de la izquierda muestra los efectos de un tratamiento tópico de dos semanas con BDNF en TSP en la retina central (fila superior) y en la retina periférica (fila inferior). Tras el tratamiento con BDNF (columna de la izquierda), las células marcadas eran más numerosas que en la retina del ojo control (CTRL), que se trató sólo con el portador (columna de la derecha). B. Cuantificación de los efectos del tratamiento tópico con BDNF en células ganglionares (densidad medida en células/ $\text{mm}^2$ , mostrada en el eje y) marcadas con Brn3b en el ratón con desarrollo de glaucoma (DBA/2J; ojo tratado con BDNF; ojo tratado con portador, CTRL) y en el ratón normal (C57bl/6J).

#### **Descripción detallada de la invención**

De manera sorprendente se ha encontrado que administrando factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) exógeno, aplicado por vía tópica en la superficie ocular intacta, en particular en el saco conjuntival, el BDNF realiza un efecto neuroprotector en las células retinianas a nivel funcional y morfológico, permitiendo de esta manera la prevención y/o el tratamiento de los trastornos retinianos neurodegenerativos.

El BDNF ha demostrado eficiencia neuroprotectora no sólo hacia los fotorreceptores, sino también hacia las células ganglionares, es decir las células de (i) la capa más interna de la retina, que envían sus fibras a los centros visuales, (ii) las fibras nerviosas ópticas, y (iii) los centros visuales extra-retinianos, tales como el cuerpo geniculado lateral.

La presente invención se refiere a una preparación oftálmica que contiene BDNF (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro).

Dicha preparación oftálmica contiene BDNF en una concentración que puede variar entre el límite inferior de 15  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y 200  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , preferentemente entre 20 y 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  e incluso más preferentemente entre 30 y 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La dosis biodisponible total puede estar entre 50 y 4000  $\mu\text{g}$  por administración, de acuerdo con el volumen de la formulación oftálmica administrado y la especie a la que pertenece el ojo tratado, incluyendo seres humanos.

El BDNF puede administrarse solo o en combinación con otros principios activos, tales como  $\beta$ -bloqueantes, prostaglandinas e inhibidores de anhidrasa carbónica.

La preparación se fabrica en forma de gotas oculares, y puede ser una solución, una suspensión, un gel o una pomada oftalmológica con el principio activo BDNF, o principios activos, en un portador farmacéuticamente aceptable compatible con el principio activo y tolerado por los ojos.

El portador farmacéuticamente aceptable puede ser una solución salina, que contiene preferentemente un 0,9 % de cloruro sódico.

También se ha encontrado que los niveles de absorción del BDNF mejorado pueden aumentarse si en la preparación se usa al menos un portador farmacéuticamente aceptable, preferentemente un galactoxiloglucano extraído de semillas de tamarindo (TSP) que, debido a su viscosidad, permite un tiempo de residencia más largo del BDNF en la superficie ocular que la administración en solución salina, que se limpia con agua de la conjuntiva más rápidamente.

La concentración del TSP puede variar, preferentemente del 0,05 al 2 % (peso/volumen - w/v), e incluso más preferentemente del 0,25 al 0,5 % (p/v).

El TSP es transparente, viscoelástico y estéril, y se usa para la protección de la córnea. El TSP también forma una película de larga duración en la superficie ocular, que lubrica y humedece la córnea y la conjuntiva.

De acuerdo con un aspecto preferido adicional, la solución viscosificada contiene ácido hialurónico, e incluso más preferentemente, ácido hialurónico combinado con TSP.

La concentración de ácido hialurónico puede variar, preferentemente del 0,05 % al 0,8 % (p/v), e incluso más

preferentemente del 0,2 al 0,4 % (p/v).

De acuerdo con una realización preferida, la preparación puede incluir BDNF en la concentración de 15 µg/µl en una solución salina que contiene un 0,9 % de NaCl.

5 De acuerdo con una realización preferida adicional, la preparación puede contener BDNF en la concentración de 15 µg/µl en solución salina con TSP, preferentemente una solución del 0,25 %.

La preparación de gotas oculares puede administrarse por vía tópica directamente a la superficie ocular intacta, es decir, de manera no invasiva, evitando el uso de procedimientos invasivos, tales como, inyecciones intraoculares, subretinianas y retrobulbares. En particular, la preparación puede administrarse en el saco conjuntival. La preparación también puede formularse como un parche ocular o en lentes de contacto.

10 La retina es una parte parcialmente separada del sistema nervioso central; existen diversos tipos de barrera, que incluyen la barrera hemato-retiniana, que impide la difusión no específica de compuestos tales como moléculas grandes a la retina. La penetración intraocular de compuestos farmacológicamente activos aplicados por vía tópica está regulada por barreras localizadas en la córnea y en la conjuntiva, por absorción sistémica y por degradación metabólica efectuada por las enzimas presentes en esos tejidos. Una vez instilados, los compuestos  
15 farmacológicamente activos deben atravesar un complejo sistema de barreras sanguíneas, que incluyen la barrera hemato-retiniana, para penetrar a los tejidos subyacentes hasta la retina.

Además, la retina, a través de las células ganglionares, de las que se originan las fibras del nervio óptico, se conecta mediante el nervio óptico a centros visuales tales como la parte dorsal del cuerpo geniculado lateral (dLGN).

20 Como se demuestra en la parte experimental, cuando el BDNF se administra por vía tópica, de acuerdo con la presente invención, puede transportarse a la retina, induciendo un aumento en su concentración retiniana a niveles que realizan efectos neuroprotectores tanto desde el punto de vista funcional como morfológico.

De manera sorprendente también se ha encontrado, como lo demuestran pruebas experimentales, que las células ganglionares permiten el transporte anterógrado del BDNF, permitiendo al BDNF prevenir y tratar la degeneración no sólo de las células ganglionares sino también de las fibras nerviosas ópticas, y la extensión del trastorno a los  
25 centros visuales extra-retinianos, tales como el cuerpo geniculado lateral.

La presente invención también se refiere al uso del BDNF para preparar un medicamento oftálmico en forma de gotas oculares para la administración tópica a la superficie ocular intacta para la prevención y/o el tratamiento de trastornos neurodegenerativos de la retina, nervio óptico y cuerpo geniculado lateral, en particular retinopatías degenerativas (tales como retinitis pigmentaria y glaucoma), retinopatías relacionadas con la edad (tales como  
30 degeneración macular relacionada con la edad), trastornos vasculares y proliferativos de la retina, desprendimiento de la retina y retinopatía del prematuro (ROP) y retinopatía diabética, que da lugar a ceguera. Las preparaciones de acuerdo con la presente invención son útiles para la prevención y/o el tratamiento de trastornos degenerativos de la retina, nervio óptico y cuerpo geniculado lateral, especialmente, por ejemplo, retinitis pigmentaria y glaucoma (incluyendo glaucoma congénito, glaucoma infantil, glaucoma juvenil, glaucoma adulto, glaucoma primario de ángulo  
35 abierto, glaucoma primario de ángulo cerrado, glaucoma agudo, glaucoma iatrogénico y glaucoma secundario).

El glaucoma es un trastorno de una serie de trastornos progresivos que afectan al ojo que, si no se trata adecuadamente, da lugar a ceguera debido a la pérdida de células ganglionares y a la atrofia progresiva de las fibras del nervio óptico.

40 El glaucoma se caracteriza por un aumento en la presión intraocular (PIO) que puede dañar las células ganglionares y las fibras del nervio óptico directa (mecánica) o indirectamente induciendo la isquemia de los vasos retinianos que suministran a la retina interna. En la fase progresiva, así como a la retina, el glaucoma puede afectar a los centros visuales, tales como el cuerpo geniculado lateral, hasta que el córtex visual se involucra eventualmente.

También se ha encontrado que el tratamiento con BDNF en concentraciones eficaces no sólo previene y reduce la degeneración de los fotorreceptores inducida por exposición prolongada a la luz (daño lumínico) y preserva la  
45 respuesta retiniana a la luz; además, el uso de un modelo de glaucoma experimental demuestra que la aplicación tópica de BDNF previene la degeneración de las células ganglionares de la retina que se produce por un aumento en la presión intraocular (PIO) en un modelo de glaucoma animal; en ambos modelos animales, el BDNF no alteró la respuesta retiniana a los estímulos visuales.

Los ejemplos que se proporcionan a continuación ilustran adicionalmente la invención.

50

## Ejemplos

### Ejemplos de preparaciones

- 5     ▪ Preparación 1 - BDNF en solución salina: se disuelven 150 µg de BDNF en 10 µl de solución salina que contiene NaCl al 0,9 %;
- 5     ▪ Preparación 2 - BDNF en solución salina con carboximetilcelulosa sódica: se disuelven 150 µg de BDNF en una solución que consiste en 5 µl de solución salina que contiene NaCl al 0,9 % y 5 µl de carboximetilcelulosa sódica al 0,4 %.
- 10    ▪ Preparación 3 - BDNF en solución salina con TSP: se disuelven 150 µg de BDNF en 5 µl de solución salina que contiene NaCl al 0,9 % y 5 µl de TSP al 0,5 %.
- 10    ▪ Preparación 4 - BDNF en solución salina con ácido hialurónico (0,2 %): se disuelven 150 µg de BDNF en 5 µl de solución salina que contiene NaCl al 0,9 % y 5 µl de ácido hialurónico al 0,4 %.
- 15    ▪ Preparación 5 - BDNF en solución salina con ácido hialurónico (0,4 %): se disuelven 150 µg de BDNF en 5 µl de solución salina que contiene NaCl al 0,9 % y 5 µl de ácido hialurónico al 0,8 %.
- 15    ▪ Preparación 6 - BDNF en solución salina con ácido hialurónico y TSP (I): se disuelven 150 µg de BDNF en 5 µl de solución salina que contiene NaCl al 0,9 % y 5 µl de ácido hialurónico al 0,4 % y TSP al 0,4 %.
- 15    ▪ Preparación 7 - BDNF en solución salina con ácido hialurónico y TSP (II): se disuelven 150 µg de BDNF en 5 µl de solución salina que contiene NaCl al 0,9 % y 5 µl de ácido hialurónico al 0,8 % y TSP al 0,4 %.
- 20    ▪ Preparación 8 - BDNF en solución salina con ácido hialurónico y TSP (II): se disuelven 150 µg de BDNF en 5 µl de solución salina que contiene NaCl al 0,9 % y 5 µl de ácido hialurónico al 0,4 % y TSP al 0,6 %.

## 20 Bioensayos

### 2.1 Ejemplo - Determinación de niveles de BDNF en humor vítreo, retina y nervio óptico después del tratamiento tópico de 6 horas del ojo con preparaciones basadas en BDNF.

- 25    ▪ Se usaron las preparaciones 1, 2 y 3 que contienen BDNF, como se describe anteriormente:

25    El ensayo se realizó en ratas albinas (ratas Wistar, Harlan, Italia); se aplicó por vía tópica BDNF en solución salina con carboximetilcelulosa sódica, o en solución salina con TSP, instilándose en el saco conjuntival de un ojo, mientras que el otro ojo, usado como control, se trató con la solución ("placebo") usada para incluir y transportar BDNF.

- 30    ▪ Determinación de los niveles de BDNF en la retina, humor vítreo y nervio óptico

30    Los animales se sacrificaron 6 horas después de la aplicación, después de inducir anestesia profunda con una inyección de uretano intraperitoneal (20 %). Después se extirpó el ojo, y el nivel de BDNF se midió en el humor vítreo, en el homogeneizado de retina y en el homogeneizado de nervio óptico tanto del ojo tratado con BDNF como del otro ojo tratado sólo con la solución de portador (ojo control). Las mediciones se realizaron por inmunoensayo (ELISA; sistema de inmunoensayo EMAX de BDNF, Promega, Madison, WI, EEUU). La cantidad de BDNF en el nervio óptico también se determinó, para establecer si el BDNF introducido desde el exterior por aplicación tópica se había absorbido y transportado por las células retinianas, en particular por las células ganglionares de la retina que, con sus fibras, forman el nervio óptico.

35    Los resultados mostrados en el gráfico de la Figura 1 se obtuvieron con una aplicación tópica de BDNF en solución salina (NaCl al 0,9 %), y se expresaron como valores de concentración media de BDNF en la retina (A), el nervio óptico (B) y el humor vítreo (C), expresados como pg/mg de proteína.

40    El análisis estadístico se realizó con el ensayo de la t de Student, comparando el ojo tratado con BDNF con el ojo control: en todos los casos, las diferencias entre el ojo tratado y el ojo control fueron estadísticamente significativas (\*, p<0,05).

45    Los resultados mostrados en los gráficos de la Figura 2 se refieren a una aplicación tópica de BDNF en solución con carboximetilcelulosa sódica (0,2 %), mientras que los resultados mostrados en los gráficos de la Figura 3 se obtuvieron con una aplicación tópica de BDNF en solución con TSP (0,25 %); en ambos casos, el análisis estadístico se realizó con el ensayo de la t de Student, comparando el ojo tratado con BDNF con el ojo control. En todos los casos, las diferencias entre el ojo tratado y el ojo control fueron estadísticamente significativas (\*, p<0,05).

50    La Figura 4 muestra los niveles comparativos de BDNF en la retina para cada tipo de solución/portador usados; este análisis hace que sea más fácil comparar la eficiencia de las diferentes soluciones/portadores a la misma concentración de BDNF (10 µl de solución que contiene 150 µg de BDNF). El tratamiento tópico con BDNF en TSP produjo niveles retinianos de BDNF significativamente mayores que las otras dos formulaciones usadas, es decir, BDNF en solución salina y BDNF en solución con carboximetilcelulosa sódica (ensayo de la t de Student \*, p<0,05). El tratamiento tópico con BDNF en solución con carboximetilcelulosa sódica demostró ser el menos efectivo aumentando el nivel de BDNF retiniano.

## 2.2 Ejemplo - Determinación de niveles de BDNF en la retina, humor vítreo y nervio óptico a diferentes tiempos después del tratamiento tópico del ojo con BDNF en TSP

Se estudió hasta qué nivel el BDNF permanecía elevado en la retina, en el humor vítreo y en el nervio óptico después de una sola aplicación tópica. Este estudio se realizó con el portador que contenía TSP, que demostró la mayor eficacia facilitando el paso transescleral del BDNF a la retina, al nervio óptico y al humor vítreo. Después del tratamiento tópico en el ojo, se estudiaron las cinéticas de los niveles de BDNF en la retina, en el nervio óptico y en el humor vítreo, usando TSP. Se trataron N=5 ojos en cada grupo de ensayo. La concentración de BDNF en la retina, el nervio óptico y el humor vítreo se midió a diferentes intervalos de tiempo después de la aplicación de una solución al 0,25 % de TSP que contenía BDNF (10  $\mu$ l de una solución que contenía 150  $\mu$ g de BDNF). El ojo control solo se trató con la solución de portador que contenía TSP al 0,25 %. Este experimento se realizó para establecer la tendencia de tiempo de los niveles de BDNF después de una sola aplicación tópica. Los gráficos muestran los valores de BDNF medios (eje y; pg/ml) en la retina, el nervio óptico y el humor vítreo 6, 12 y 24 horas después de la aplicación, la Figura 5 muestra que el nivel de BDNF en la retina se mantiene estadísticamente alto, volviendo a los niveles basales en 12-24 horas. El análisis estadístico se realizó con el ensayo de la t de Student: en A \*,  $p < 0,01$  comparado con el ojo control. Los resultados de este experimento sugieren que en un tratamiento a largo plazo con BDNF, transportado en lágrimas artificiales, en particular en base a TSP, una aplicación tópica cada 12 horas es suficiente para mantener niveles de BDNF altos en la retina.

## 2.3 Ejemplo – Efectos neuroprotectores de la aplicación tópica de preparaciones basadas en BDNF

Para establecer los efectos neuroprotectores del BDNF después del tratamiento por aplicación tópica en el saco conjuntival, se usó un modelo experimental en el que la degeneración de la retina se induce por daño lumínico en modelos animales; este modelo se usa ampliamente para estudiar la degeneración de los fotorreceptores retinianos inducida por larga exposición a una fuerte fuente de luz (La Vail et al., 1987; Rex et al., 2003). La destrucción de los fotorreceptores se produce por apoptosis, y está causada por una absorción excesiva de fotones por el pigmento visual, la rodopsina, dando lugar a la alteración del ciclo de regeneración del pigmento que, con el tiempo, involucra a las células epiteliales pigmentadas. El modelo animal experimental ensayado fue la rata albina (Surace et al., 2005), en vista de la sensibilidad marcada de sus fotorreceptores a la luz. El protocolo experimental usado se modificó (Rex et al., 2003) y se amplió a partir del propuesto originalmente por el grupo LaVail (LaVail et al., 1987).

Se usaron las siguientes preparaciones basadas en BDNF:

- a) BDNF en solución de TSP al 0,25 % (10  $\mu$ l de una solución que contiene 150  $\mu$ g de BDNF).
- b) BDNF en solución salina (NaCl al 0,9 % - 10  $\mu$ l de una solución que contiene 150  $\mu$ g de BDNF).
- c) BDNF en una solución al 0,2 % de carboximetilcelulosa sódica (10  $\mu$ l de una solución que contiene 150  $\mu$ g de BDNF).

Los ojos de las ratas se trataron con las preparaciones indicadas anteriormente, y las ratas se sometieron a daño lumínico. Los ojos control se trataron sólo con la solución de portador. Se trataron N=4 ojos en cada grupo de ensayo. En particular, después del tratamiento de 6 horas (ojo tratado con BDNF y ojo control tratado sólo con solución de portador), estas ratas se sometieron a larga exposición a la luz durante 48 horas (modelo de daño lumínico animal, intensidad de la fuente de luz de 1000 lux). Esta larga exposición a la luz induce la degeneración de muchos de los fotorreceptores en la retina de las ratas albinas. La neuroprotección ejercida por el BDNF se verificó por procedimientos morfológicos, diseñados para evaluar la supervivencia de los fotorreceptores, y por procedimientos funcionales, registrando la respuesta retiniana a la luz (electrorretinograma [ERG] por destello, que se usa ampliamente para evaluar el estado funcional de la retina externa en pacientes que sufren trastornos retinianos). En vista del pequeño número de conos en la rata, que forman la base de la respuesta ERG en condiciones fotópicas, y de la amplitud reducida del ERG en condiciones fotópicas en la rata albina el ERG por destello, sólo se registró en condiciones de adaptación escotópica, expresando la respuesta de los bastoncillos de los que se compone principalmente la retina de rata. El ERG por destello (escotópico) se registró 7 días después del final del periodo de daño lumínico.

### - Preparación a)

La Figura 6 muestra la amplitud de la onda b del ERG por destello de acuerdo con la luminancia en condiciones de adaptación escotópica. Como se muestra claramente en el gráfico de la Figura 6, el BDNF en TSP, aplicado por vía tópica, reduce significativamente los efectos del daño lumínico en la respuesta retiniana a los destellos (ERG por destello). De hecho, las amplitudes (valores de amplitud media expresados en  $\mu$ V) del ojo tratado con BDNF son significativamente mayores que aquellas del ojo control, \*,  $p < 0,05$  (ANOVA de una vía).

### - Preparación b)

La Figura 8 muestra las amplitudes de la onda b de acuerdo con la luminancia en condiciones de adaptación escotópica. Los resultados indican que el BDNF en solución salina también puede reducir las alteraciones de la respuesta retiniana a la luz inducidas por el daño lumínico (ERG por destello). Las amplitudes de la onda b en los ojos dañados por luz de las ratas tratadas con BDNF son mayores que aquellas registradas para el ojo control; las

amplitudes (valores de amplitud media expresados en  $\mu\text{V}$ ) del ojo tratado con BDNF en solución salina son significativamente mayores que aquellas del ojo control, \*,  $p < 0,05$  (ANOVA de una vía).

- Preparación c)

5 La Figura 10 muestra la amplitud de la onda b de acuerdo con la luminancia en condiciones de adaptación a la oscuridad. La figura demuestra que las amplitudes (valores de amplitud media expresados en  $\mu\text{V}$ ) del ojo tratado con BDNF en solución con carboximetilcelulosa sódica son sólo significativamente mayores que aquellas del ojo control, \*,  $p < 0,05$  (ANOVA de una vía) a los valores de luminancia más altos. En conclusión, en términos de recuperación funcional de la respuesta de la retina a la luz, la carboximetilcelulosa sódica demostró menos eficacia que el TSP y la solución salina previniendo el deterioro de la respuesta de la retina a la luz.

10 Posteriormente, se evaluaron los efectos del tratamiento tópico con las preparaciones basadas en BDNF indicadas anteriormente sobre la degeneración de los fotorreceptores de la retina en las retinas de los ojos cuyo ERG por destello se registró.

15 Los efectos del tratamiento tópico con BDNF sobre la degeneración de fotorreceptores se cuantificaron contando las filas de fotorreceptores que sobrevivieron al daño lumínico y midiendo el grosor de la capa nuclear externa (ONL) de la retina que contiene los cuerpos celulares de los fotorreceptores. Para realizar esas mediciones, los núcleos de los fotorreceptores se marcaron con yoduro de propidio.

- Preparación a)

20 Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7. La Figura 7A muestra las secciones transversales de la retina del ojo tratado con BDNF (en TSP al 0,25 %) y del ojo control. Para realizar esas mediciones, los núcleos de los fotorreceptores se marcaron con yoduro de propidio. Independientemente del procedimiento usado (recuento de filas de cuerpos celulares de fotorreceptores (Figura 7B) o grosor de la capa nuclear externa (ONL) (Figura 7C)), los fotorreceptores presentes en la retina central y periférica son significativamente (ensayo de la t de Student \*,  $p < 0,001$ ) más numerosos en el ojo tratado con BDNF que en el ojo tratado con el portador (control).

25 A continuación se demostró que, cuando el BDNF en TSP, se aplica por vía tópica en el saco conjuntival, protege a la retina del daño lumínico.

- Preparación b)

30 La Figura 9 (A) muestra las secciones transversales de la retina del ojo derecho tratado con BDNF (en solución salina, NaCl al 0,9 %) y del ojo izquierdo (control) tratado sólo con solución salina. Se cuantificaron los efectos del tratamiento tópico con BDNF en la degeneración de fotorreceptores contando las filas de cuerpos celulares de los fotorreceptores que sobrevivieron al daño lumínico (Figura 9B) o midiendo el grosor de la capa nuclear externa (ONL) de la retina que contiene los cuerpos celulares de los fotorreceptores (Figura 9C). Las diferencias entre las retinas del ojo tratado y del ojo control (recuento de filas de fotorreceptores o grosor de la ONL) demostró significado tanto en la retina central como en la periférica (ensayo de la t de Student \*,  $p < 0,001$ ).

35 El tratamiento tópico con BDNF en solución salina aumenta el número de fotorreceptores que sobreviven al daño lumínico en el ojo en comparación con el ojo control.

- Preparación c)

40 Finalmente, se cuantificaron los efectos del tratamiento tópico con BDNF (en solución con carboximetilcelulosa sódica) en la degeneración de fotorreceptores midiendo las filas de los cuerpos celulares de los fotorreceptores que sobrevivieron al daño lumínico (Figura 11B) y el grosor de la retina nuclear externa (ONL) que contiene los cuerpos celulares de los fotorreceptores (Figura 11 C).

Considerando los resultados obtenidos, en términos de recuperación funcional y prevención de la degeneración de fotorreceptores después de daño lumínico, se puede llegar a la conclusión de que el tratamiento tópico con BDNF en TSP y en solución salina ejerce efectos neuroprotectores frente al daño lumínico, mientras que el tratamiento con BDNF en solución con carboximetilcelulosa sódica es menos efectiva a la misma concentración de BDNF.

45 También se demostró que el tratamiento con BDNF no induce alteraciones funcionales en la retina, deteriorando su respuesta a los estímulos visuales.

**2.4 Ejemplo. Efectos neuroprotectores inducidos por la aplicación tópica repetida de BDNF en un modelo de glaucoma experimental**

50 El glaucoma es un trastorno degenerativo de la retina que tiene diversas causas, y se presenta en diferentes formas (se clasifica en base a la edad como glaucoma congénito, glaucoma infantil, glaucoma juvenil o glaucoma adulto; y en base a la etiopatogénesis como glaucoma primario: glaucoma primario de ángulo abierto o glaucoma primario de ángulo cerrado; y glaucoma secundario inducido por otros trastornos, incluyendo glaucoma iatrogénico). La forma más común de glaucoma, en concreto, glaucoma primario de ángulo abierto (POAG), se caracteriza por presión

5 intraocular aumentada que causa disfunción y posterior degeneración de las células ganglionares asociadas con atrofia del nervio óptico; los síntomas son pérdida gradual de visión, culminando en ceguera. El mecanismo que causa la disfunción y la degeneración de las células ganglionares, con atrofia del nervio óptico, no está totalmente claro todavía, aunque la hipótesis frecuente es que la presión intraocular (PIO) aumentada induce daño mecánico a las fibras del nervio óptico en la lámina cribosa, y una alteración isquémica de la cabeza del nervio óptico y la retina interna. En los últimos años, el tratamiento farmacológico ha tenido como objetivo reducir la PIO, aunque un número considerable de pacientes son resistentes al tratamiento farmacológico actual y sufren pérdida de la función visual progresiva e irreversible. Actualmente no hay fármacos diseñados para lograr la neuroprotección de las células ganglionares de la retina y de las fibras del nervio óptico para prevenir la reducción de la capacidad visual y restablecer la visión normal. En la presente patente, los inventores proponen el uso de tratamientos tópicos con BDNF en el saco conjuntival para aumentar los niveles retinianos de BDNF en una forma estable para contrarrestar la disfunción progresiva de las células ganglionares, seguido de su degeneración y destrucción. Esta propuesta se basa parcialmente en la demostración de que el receptor de BDNF, denominado TrkB, se expresa en las células ganglionares (Jelsma et al., 1993). Para verificar su hipótesis, los autores de la invención usaron el modelo experimental más común de glaucoma espontáneo, un ratón doble mutante denominado DBA/2J (John et al., 1998; Chang et al., 1999). El ratón DBA/2J presenta mutaciones homocigotas de dos genes distintos; el primero es la proteína relacionada con la tirosina (*tyro1*<sup>-/-</sup>) que codifica una proteína del melanosoma, y el segundo es una glucoproteína de membrana (*Gpnmb*<sup>-/-</sup>). Este ratón se caracteriza por un aumento progresivo en la presión intraocular con pérdida progresiva de la respuesta de la retina a los estímulos visuales estructurados, que depende de las células de la retina interna/ganglionares; en seres humanos y en el modelo animal, esta respuesta retiniana se denomina electroretinograma patrón (P-ERG; Domeinici et al., 1991; Ventura y Porciatti, 2006; Falsini et al., 2008). La disfunción de las células ganglionares se produce después de una degeneración de dichas células con atrofia progresiva de las fibras del nervio óptico (Ventura et al., 2006). Como se muestra en la Figura 12, en este modelo de glaucoma murino (DBA/2J), la PIO empieza a aumentar después de 5 meses de vida postnatal: a los 6½ meses la PIO en el ratón DBA/2J (N=10) ya aparece significativamente mayor (ensayo de la t, \* p<0,05) que la medida en el ratón normal (C57bl/6J; N=5) y en el ratón DBA/2J a los 5 meses de vida (N=9). El gráfico de la Figura 13 muestra las amplitudes de la respuesta de las células de la retina interna/ganglionares (P-ERG) a los estímulos visuales estructurados (los patrones visuales usados como estímulos fueron perfiles de luminancia con frecuencia espacial=0,2 C/grado y contraste del 90 %), registrados con electrodos corneanos conectados a un amplificador y a un ordenador para un análisis en línea. Como se muestra en la Figura 13, el P-ERG ya está alterado en el ratón DBA/2J (CTRL, N=4) a los 7 meses de vida (reducción significativa en las amplitudes de P-ERG, ensayo de la t de Student, \* p<0,05). Desde los 6,5 meses de vida, es decir desde el tiempo en que la PIO aumentó establemente (Figura 12), se realizó un tratamiento de dos semanas que implicó aplicaciones tópicas repetidas de BDNF en TSP (un tratamiento cada 48 horas) en un ojo, y el portador en el otro (ojo control). Se usaron tres concentraciones de BDNF diferentes (N=4 ratones DBA/2J por grupo): 1, 5 y 15 µg/µl. Como se muestra en el histograma, el tratamiento tópico con BDNF a la concentración de 15 µg/µl (150 µg en 10 µl de solución que contiene TSP al 0,25 %, preparación oftálmica a), pero no a las concentraciones de 1 y 5 µg/µl, previno alteraciones del P-ERG en el ratón DBA/2J (compárense los datos del ojo tratado con el ojo control; ensayo de la t de Student, \* p<0,05). Para establecer si una alteración del P-ERG corresponde a una alteración de las células ganglionares, marcadas con procedimientos inmunohistoquímicos, se usó un factor de transcripción, *Brn3b*, expresado en las células ganglionares; los ratones mutantes (*Brn3b*<sup>-/-</sup>) para este factor se asocian con una alteración de las células ganglionares (Badea et al., 2009). La Figura 14 A muestra ampliaciones de preparaciones retinianas en las que las células ganglionares se marcan en verde con un anticuerpo fluorescente y se analizan con microscopía confocal. El número de células ganglionares marcadas es claramente menor en el ojo del ratón DBA/2J, tanto en la retina central como en la periférica. La Figura 14 B muestra la cuantificación de las células marcadas en términos de densidad (células/mm<sup>2</sup>). Un tratamiento de dos semanas con BDNF en TSP a la concentración de 15 µg/µl previno la reducción en células marcadas con *Brn3b* en comparación con el ojo control tratado sólo con el portador (ensayo de la t de Student, \* p<0,05).

50 Los datos comunicados conducen a la conclusión de que los tratamientos tópicos repetidos con BDNF previenen las alteraciones funcionales de las células ganglionares y restablecen la capacidad visual de la retina en un modelo de glaucoma experimental. La concentración efectiva mínima de BDNF capaz de ejercer efectos protectores en la función de las células ganglionares es de 15 µg/µl.

### **Bibliografía**

- 55 - Badea TC, Cahill H, Ecker J, Hattar S, Nathans J. Distinct roles of transcription factors *brn3a* and *brn3b* in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron*. Marzo de 2009 26;61(6):852-64.
- Bennett JL, Zeiler SR & Jones KR (1999) Patterned expression of BDNF and NT-3 in the retina and anterior segment of the developing mammalian eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2996-3005.
- 60 - Burgalassi S, Raimondi L, Pirisino R, Banchelli G, Boldrini E, Saettoni MF. Effect of xyloglucan (tamarind seed polysaccharide) on conjunctival cell adhesion to laminin and on corneal epithelium wound healing. *Eur J Ophthalmol*. Enero-Marzo de 2000; 10(1):71-6.
- Calamusa M, Pattabiraman PP, Pozdeyev N, Iuvone PM, Cellerino A, Domenici L (2007) Specific alterations of tyrosine hydroxylase immunopositive cells in the retina of NT-4 knock out mice. *Vision Res*. 47, 1523-1536.

- Caleo M, Medini P, von Bartheld CS, Maffei L (2003) Provision of Brain-Derived Neurotrophic Factor via Anterograde Transport from the Eye Preserves the Physiological Responses of Axotomized Geniculate Neurons. *J Neurosci* 23, 287-296.
- 5 - Cellerino A, Carroll P, Thoenen H & Barde YA. (1997) Reduced size of retinal ganglion cell axons and hypomyelination in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci* 9, 397-408.
- Cellerino A & Kohler K (1997) Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor TrkB is localized on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in the vertebrate retina. *J Comp Neurol* 386,149-160.
- Chang B, Smith RS, Hawes NL, Anderson MG, Zabaleta A, Savinova O, Roderick TH, Heckenlively JR, Davisson MT, John SW. Interacting loci cause severe iris atrophy and glaucoma in DBA/2J mice. *Nat Genet.* Abril de 1999; 10 21(4):405-9.
- Chytrava G & Johnson JE (2004) Spontaneous retinal activity modulates BDNF trafficking in the developing chick visual system. *Mol Cell Neurosci* 25, 549-57.
- Di Polo A, Cheng L, Bray GM & Aguayo AJ (2000) Colocalization of TrkB and brain-derived neurotrophic factor proteins in green-red-sensitive cone outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 4014-21.
- 15 - Domenici L, Gravina A, Berardi N, Maffei L. Different effects of intracranial and intraorbital section of the optic nerve on the functional responses of rat retinal ganglion cells. *Exp Brain Res.* 1991;86(3):579-84.
- Falsini B, Marangoni D, Salgarello T, Stifano G, Montrone L, Campagna F, Aliberti S, Balestrazzi E, Colotto A. Structure-function relationship in ocular hypertension and glaucoma: interindividual and interocular analysis by OCT and pattern ERG. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* Agosto de 2008;246(8): 1153-62.
- 20 - Garcia M, Forster V, Hicks D, Vecino E. (2003) In vivo expression of neurotrophins and neurotrophin receptors is conserved in adult porcine retina in vitro. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 44, 4532-454155.
- Ghelardi E, Tavanti A, Davini P, Celandroni F, Salvetti S, Parisio E, Boldrini E, Senesi S, Campa M. A mucoadhesive polymer extracted from tamarind seed improves the intraocular penetration and efficacy of rufloxacin in topical treatment of experimental bacterial keratitis. *Antimicrob Agents Chemother.* Septiembre de 25 2004;48(9):3396-401.
- Ghelardi E, Tavanti A, Celandroni F, Lupetti A, Blandizzi C, Boldrini E, Campa M, Senesi S. Effect of a novel mucoadhesive polysaccharide obtained from tamarind seeds on the intraocular penetration of gentamicin and ofloxacin in rabbits. *J Antimicrob Chemother.* Noviembre de 2000; 46(5):831-4.
- Hallbook F, Backstrom A, Kullander K, Ebendal T & Carri NG. (1996) Expression of neurotrophins and trk receptors in the avian retina. *J Comp Neurol* 364, 664-76.
- 30 - Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida k, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K (2002) Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J. Neurosci* 22, 9228-9236.
- Herzog KH, Bailey K & Barde YA. (1994) Expression of the BDNF gene in the developing visual system of the chick. *Development* 120, 1643-9.
- 35 - Herzog KH & von Bartheld CS (1998) Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain-derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo. *JNeurosci* 18, 2891-906.
- Jelsma TN, Friedman HH, Berkelaar M, Bray GM & Aguayo AJ. (1993) Different forms of the neurotrophin receptor trkB mRNA predominate in rat retina and optic nerve. *JNeurobiol* 24, 1207-14.
- 40 - John SW, Smith RS, Savinova OV, Hawes NL, Chang B, Turnbull D, Davisson M, Roderick TH, Heckenlively JR. Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Mayo de 1998; 39(6):951-62.
- Karlsson M & Hallbook F. (1998) Kainic acid, tetrodotoxin and light modulate expression of brain-derived neurotrophic factor in developing avian retinal ganglion cells and their tectal target. *Neuroscience* 83, 137-50.
- 45 - Lambiase A, Tirassa P, Micera A, Aloe L, Bonini S. (2005) Pharmacokinetics of conjunctivally applied nerve growth factor in the retina and optic nerve of adult rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 3800-6.
- LaVail, M. M., Gorrin, G. M., Repaci, M. A., Thomas, L. A., and Ginsberg, H. M. (1987) Genetic regulation of light damage to photoreceptors. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci* 28, 1043 - 1048.
- Levi-Montalcini R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237, 1154-1162.
- 50 - McGill TG, Prusky GT, Douglas RM, Yasumura D, Matthes MT, Nune G, Donohue-Rolfe K, Yang H, Niculescu D, Hauswirth WW, Girman SV, Lund RD, Duncan JL, LaVail MM (2007) Intraocular CNTF Reduces Vision in Normal Rats in a Dose-Dependent Manner. *IOVS* 48, 5756-5765.
- Perez MT & Caminos E (1995) Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci Lett* 183, 96-99.
- 55 - Pollock GS & Frost DO (2003) Complexity in the modulation of neurotrophic factor mRNA expression by early visual experience. *Brain Res Dev Brain Res* 143, 225-32.
- Pollock GS, Robichon R, Boyd KA, Kerkel KA, Kramer M, Lyles J, Ambalavanar R, Khan A, Kaplan DR, Williams RW & Frost DO. (2003) TrkB receptor signalling regulates developmental death dynamics, but not final number, of retinal ganglion cells. *JNeurosci* 23, 10137-45. 56.
- 60 - Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Phil Trans Royal Soc B* 361, 1471-1492.
- Rex T. S., Allocca M., Domenici L., Surace E. M., Maguire A. M., Lyubarsky A., Cellerino A., Auricchio A. (2004) Systemic but not intraocular Epo gene transfer protects the retina from light- and genetic-induced degeneration. *Mol Ther* 10, 855.
- 65 - Rohrer B, Korenbrot JI, LaVail MM, Reichardt LF & Xu B (1999) Role of neurotrophin receptor TrkB in the maturation of rod photoreceptors and establishment of synaptic transmission to the inner retina. *J Neurosci* 19, 8919-8930.

- Seki M, Nawa H, Fukuchi T, Abe H & Takei N (2003) BDNF is upregulated by postnatal development and visual experience: quantitative and immunohistochemical analyses of BDNF in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 3211-3218.
- 5 - Shi Z-H, Birman E, Saragovi HU (2007) Neurotrophic rationale in glaucoma: A TrkA agonist, but not NGF or a p75 antagonist, protects retinal ganglion cells in vivo. *Dev Neurobiol* 67, 884-94.
- Surace E. M., Domenici L., Cortese K., Cotugno G., Di Vicino U., Venturi C., Cellerino A., Marigo V., Tacchetti, C. Ballabio A., Auricchio A. (2005). Rescue of functional and morphological abnormalities in the retina of the type I ocular albinism mouse model following adeno-associated viral mediated gene transfer. *Mol Ther* 12, 652-658.
- 10 - Uccello-Barretta G, Nazzi S, Balzano F, Di Colo G, Zambito Y, Zaino C, Sansò M, Salvadori E, Benvenuti M. Enhanced affinity of ketotifen toward tamarind seed polysaccharide in comparison with hydroxyethylcellulose and hyaluronic acid: a nuclear magnetic resonance investigation. *Bioorg Med Chem*. Agosto de 2008 1;16(15):7371-6.
- Ventura LM, Porciatti V. Pattern electroretinogram in glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol*. Abril de 2006 17(2):196-202.
- 15 - Watanabe W, Tokita Y, Kato M, Fukuda Y (2003) Intravitreal injections of neurotrophic factors and forskolin enhance survival and axonal regeneration of axotomized ganglion cells in cat retina *Neuroscience* 116, 733-742.
- Yata T, Nakamura Ma Sagawa H, Tokita Y, H. Terasaki H, Watanabe M (2007) Survival and axonal regeneration of OFF-center retinal ganglion cells of adult cats are promoted with an anti-glaucoma drug, Nipradolol, but not BDNF and CNTF. *Neuroscience* 148, 53-64.

**REIVINDICACIONES**

1. Preparación oftálmica en forma de gotas oculares que comprende un Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) en una concentración de al menos 15 µg/µl.
- 5 2. Preparación oftálmica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el BDNF varía de 15 a 200 µg/µl.
3. Preparación oftálmica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que también comprende una solución salina como portador farmacéuticamente aceptable.
4. Preparación oftálmica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución salina contiene 0,9 % de cloruro sódico.
- 10 5. Preparación oftálmica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que como portador adicional farmacéuticamente aceptable también comprende una solución viscosificada
6. Preparación oftálmica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución viscosificada es una solución que comprende polisacárido extraído de semillas de tamarindo (TSP).
- 15 7. Preparación oftálmica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la concentración de TSP varía del 0,05 al 2 % p/v.
8. Preparación oftálmica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que adicionalmente comprende ácido hialurónico.
9. Preparación oftálmica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución viscosificada comprende TSP y ácido hialurónico.
- 20 10. Preparación oftálmica en forma de gotas oculares que comprende BDNF en una concentración de al menos 15 µg/µl para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la retina, del nervio óptico y del cuerpo geniculado lateral.
11. Preparación oftálmica de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la retinitis pigmentaria.
- 25 12. Preparación oftálmica de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en la prevención y/o tratamiento de glaucoma simple crónico.

Figura 1

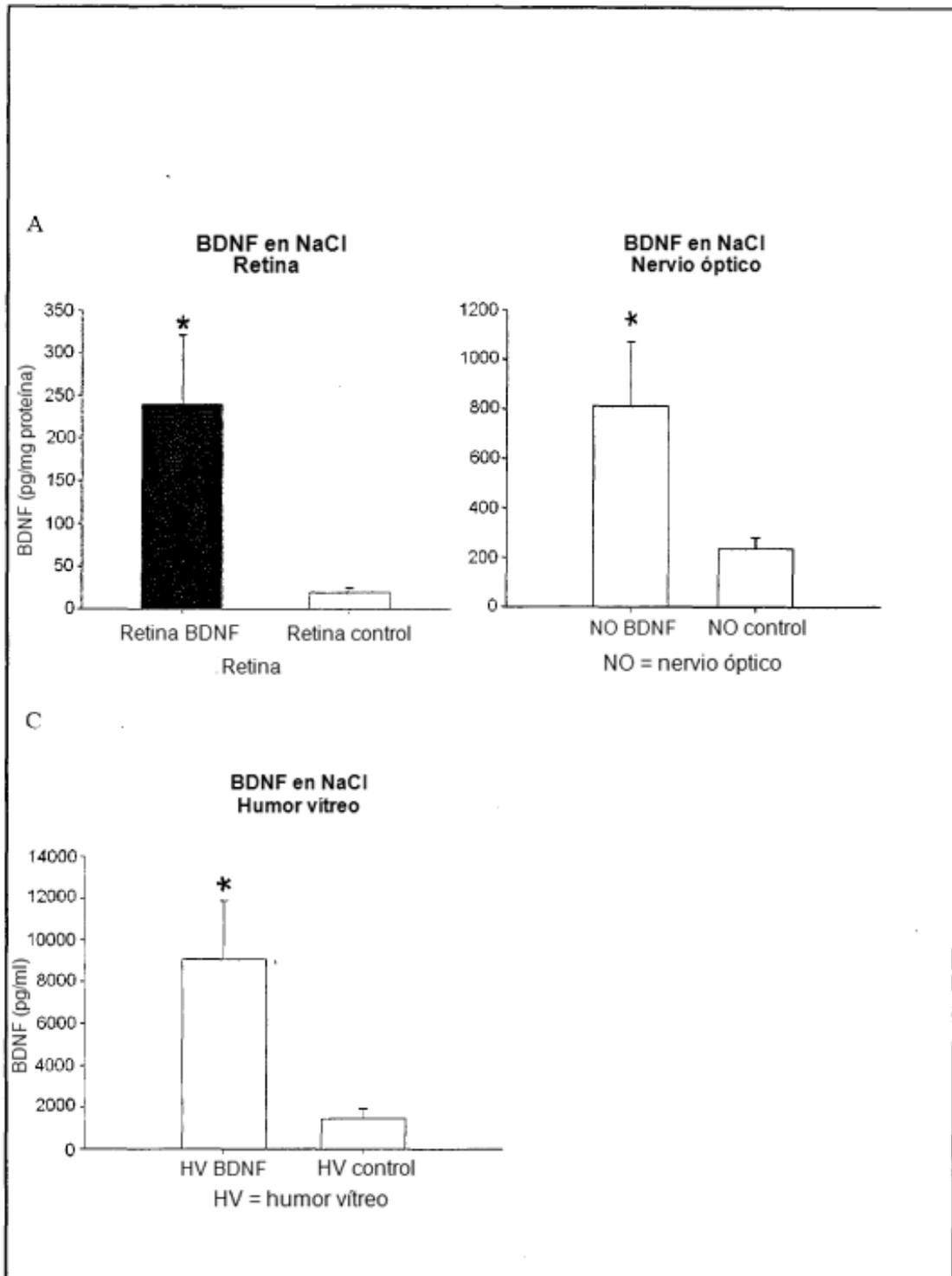


Figura 2

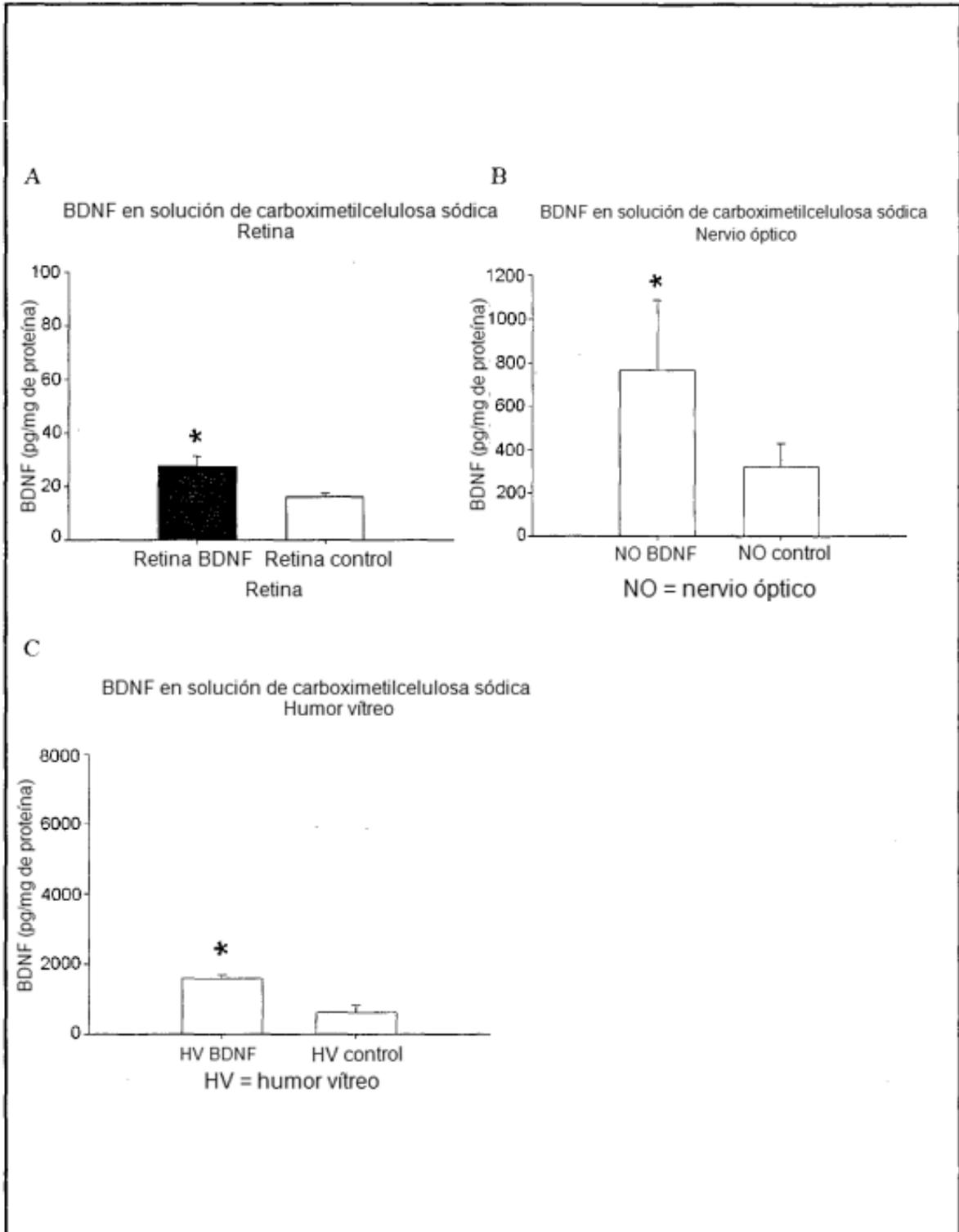


Figura 3

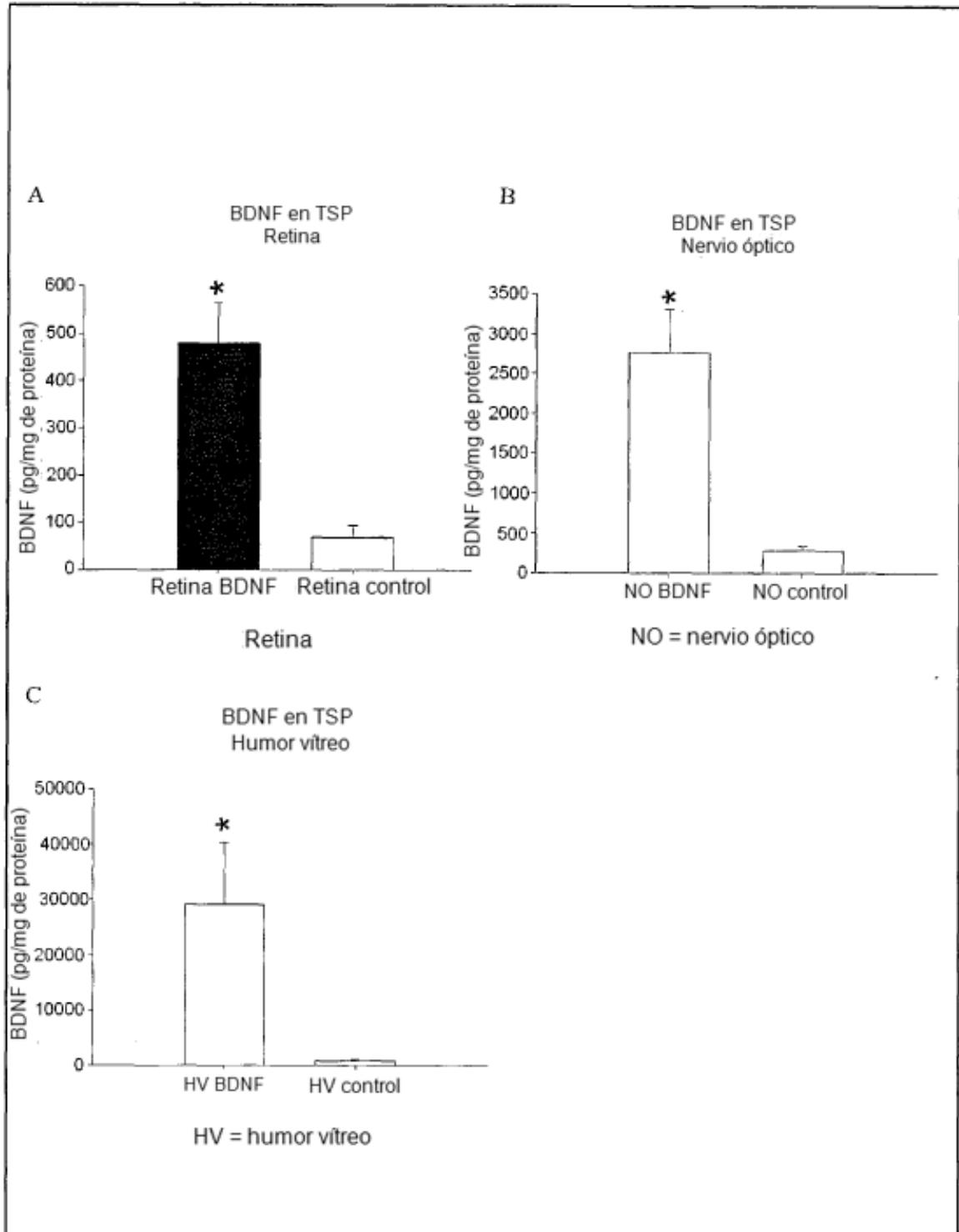


Figura 4

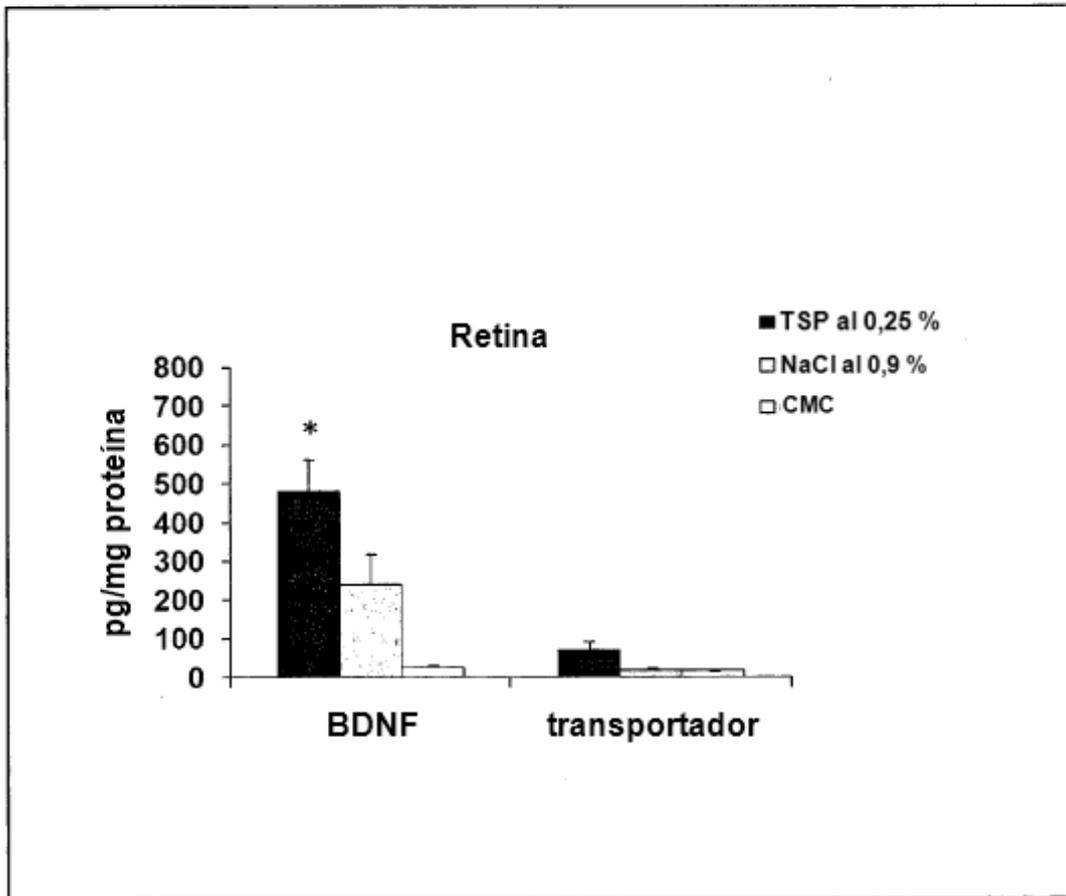


Figura 5

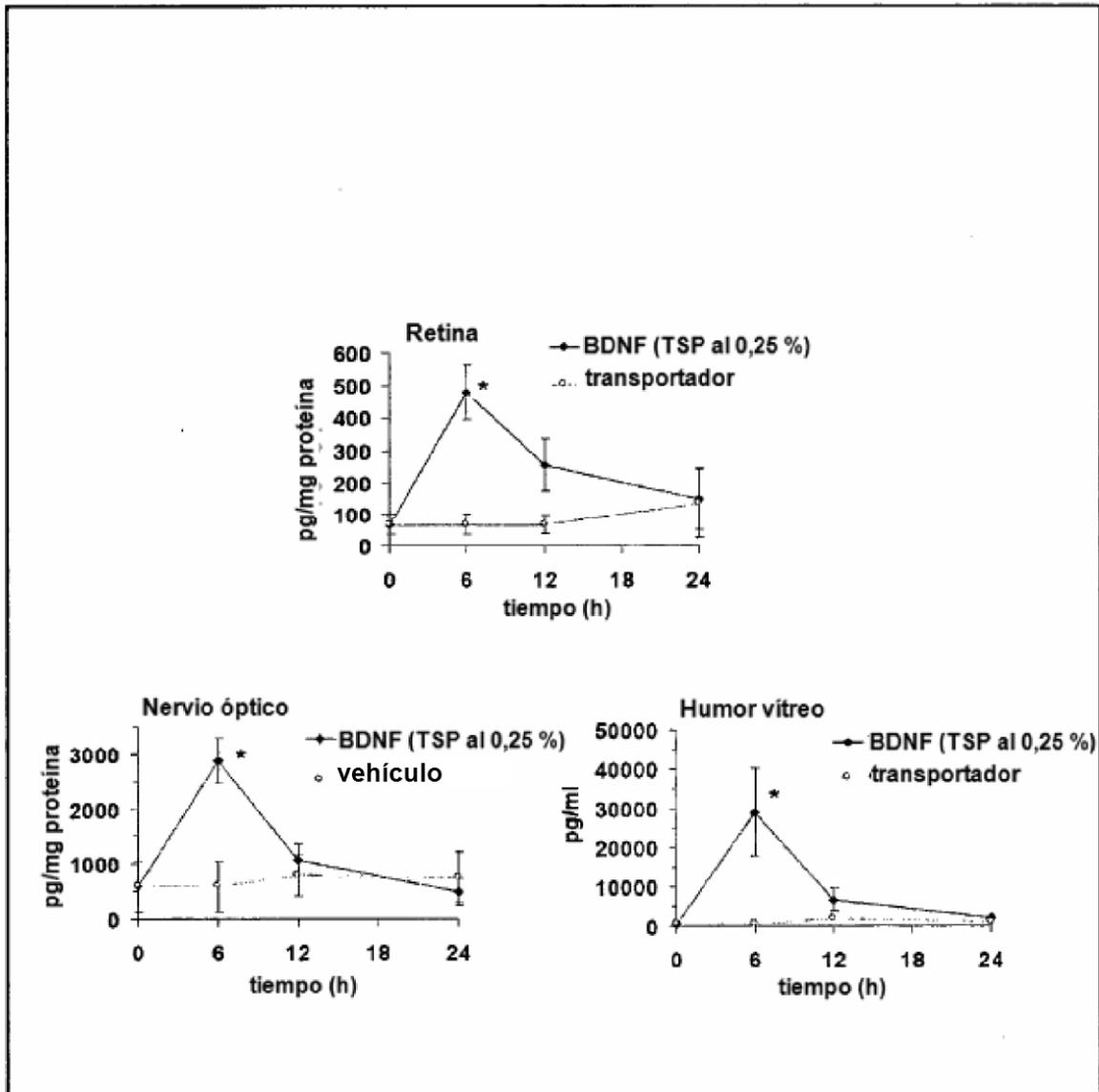


Figura 6

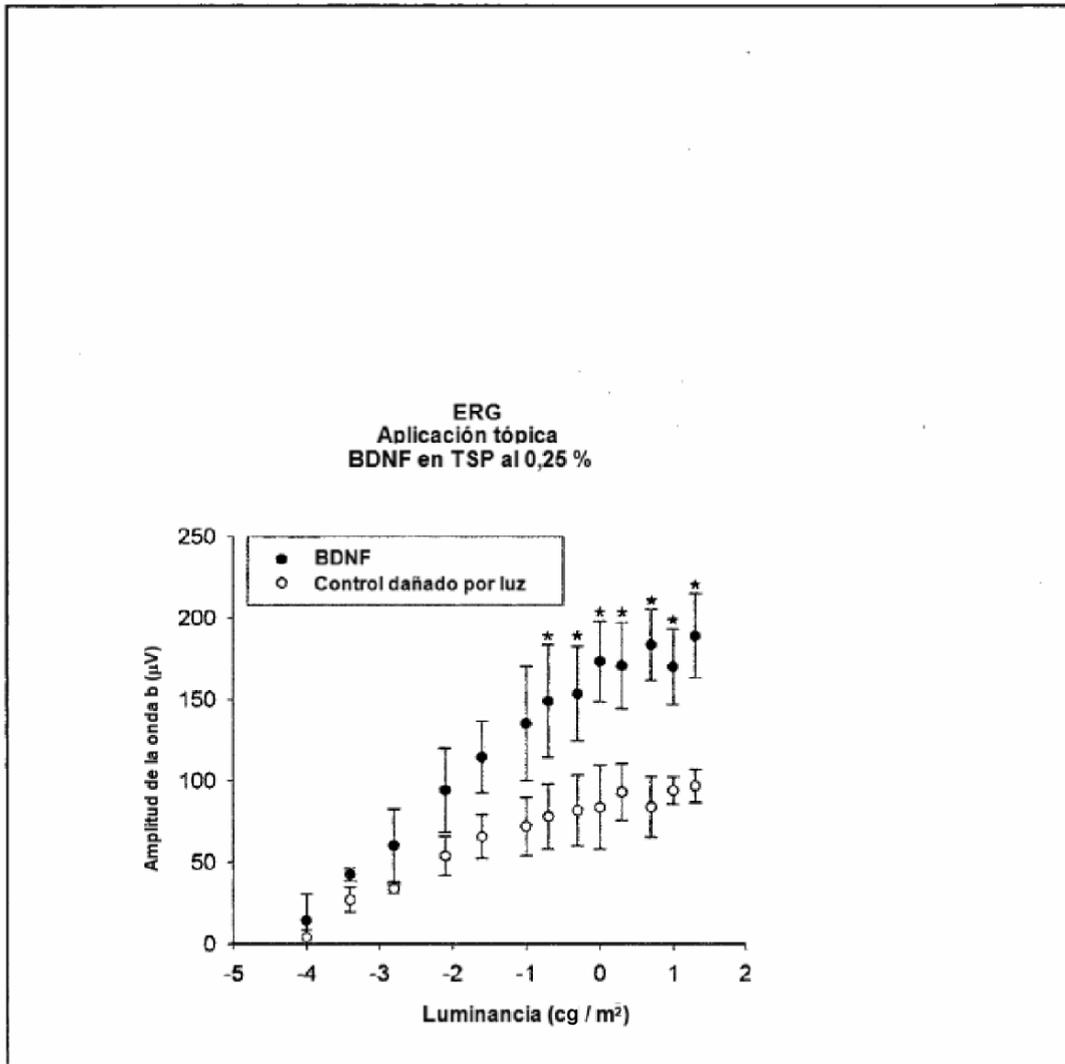


Figura 7

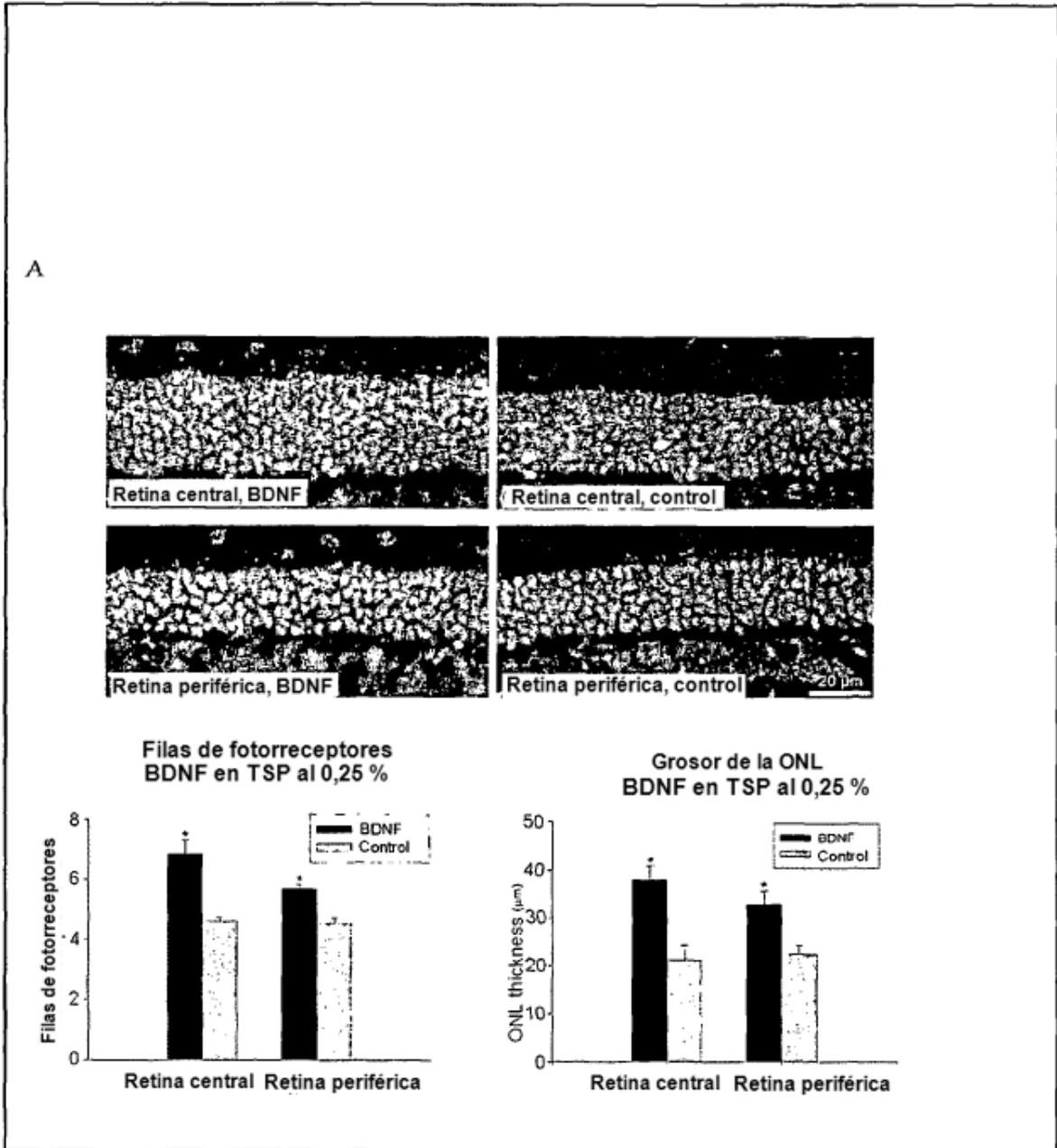


Figura 8

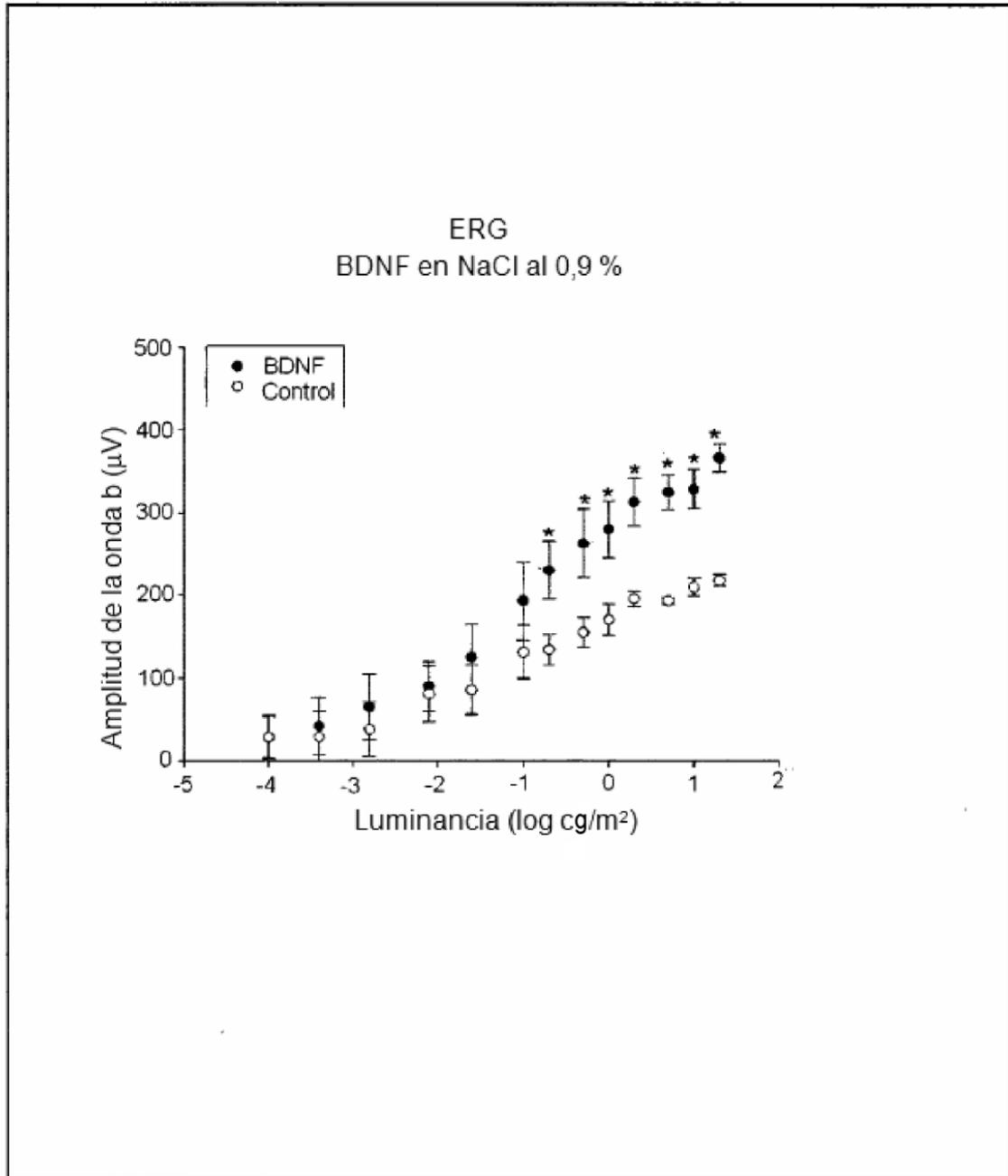


Figura 9

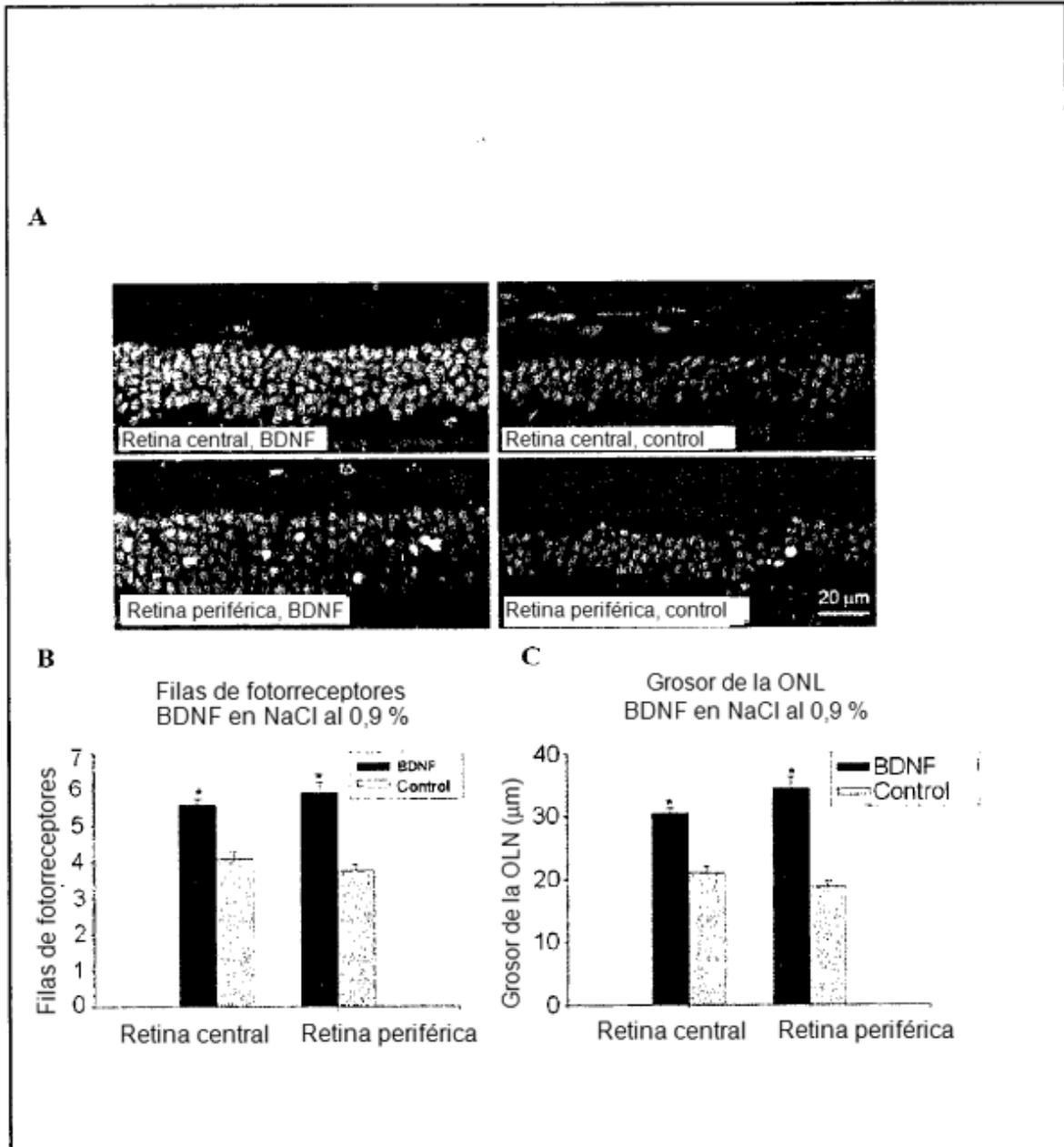


Figura 10

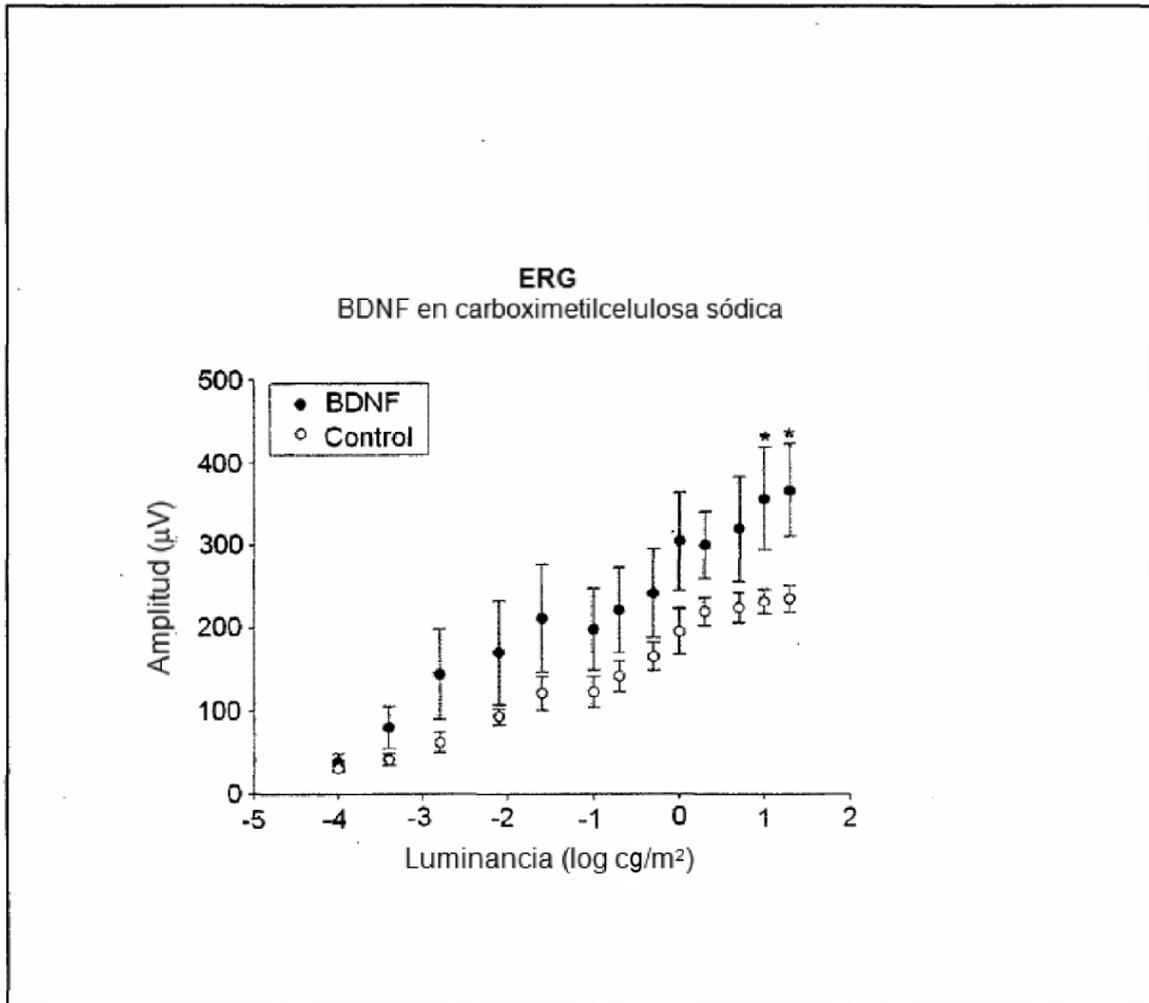


Figura 11

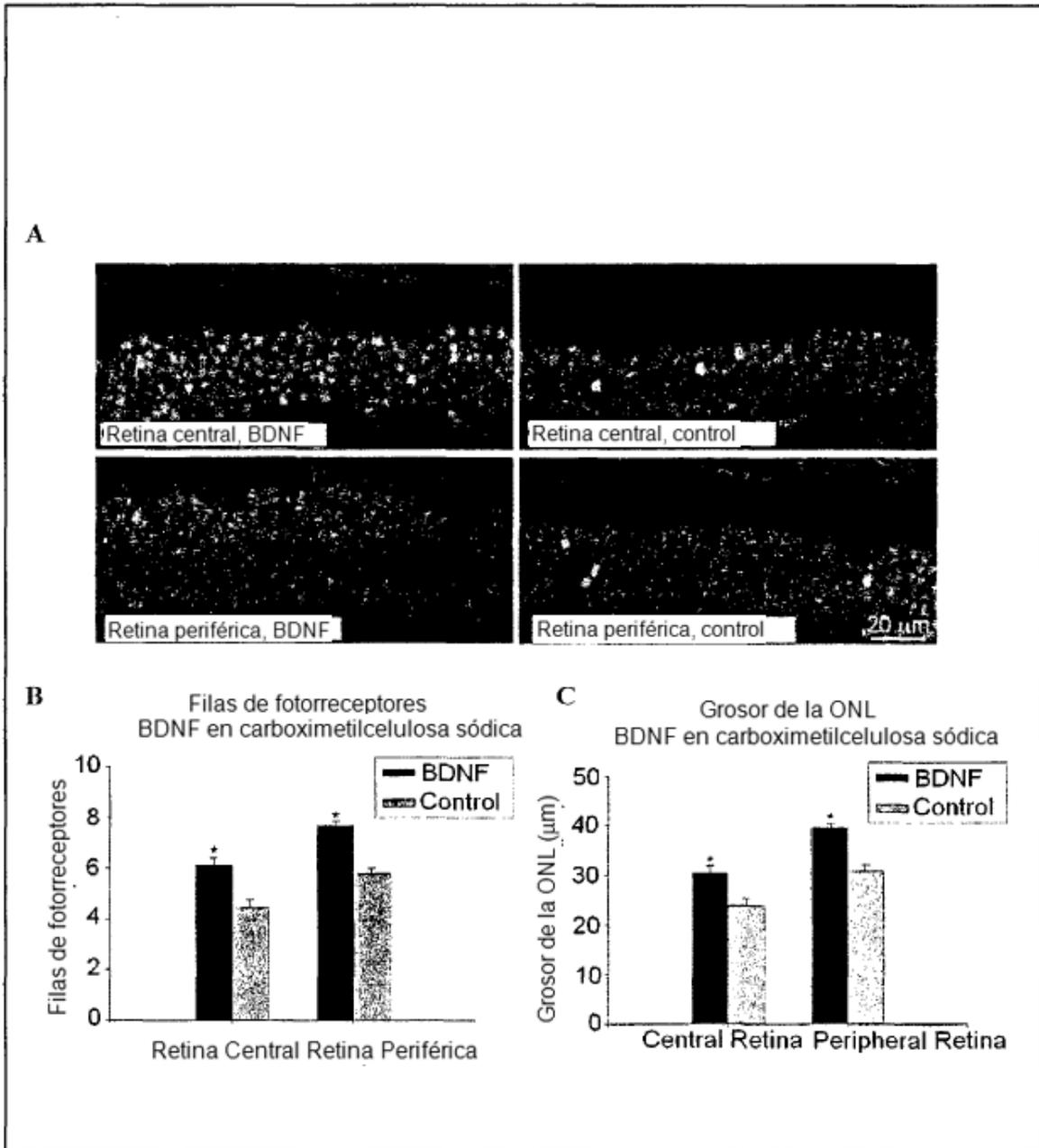


Figura 12

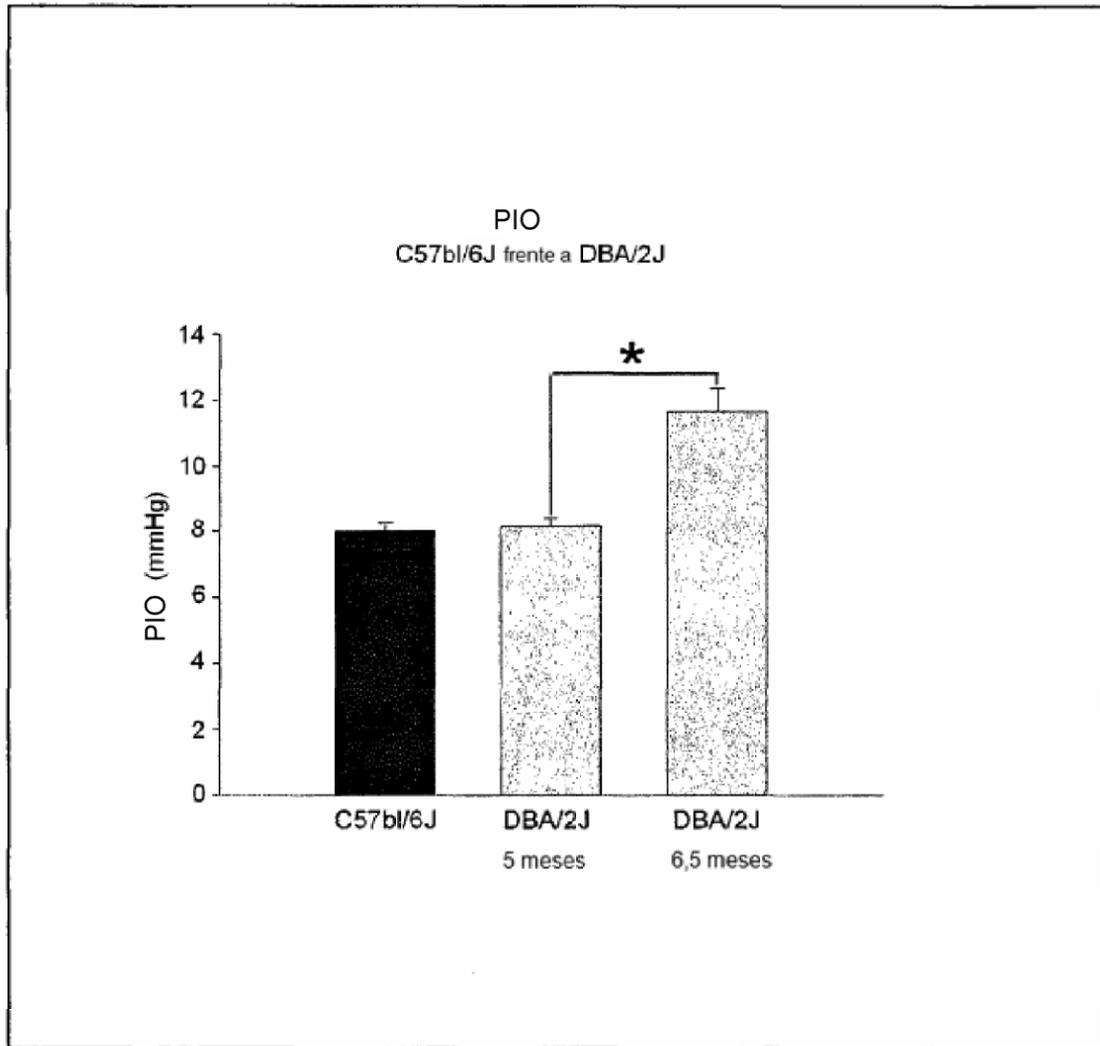


Figura 13

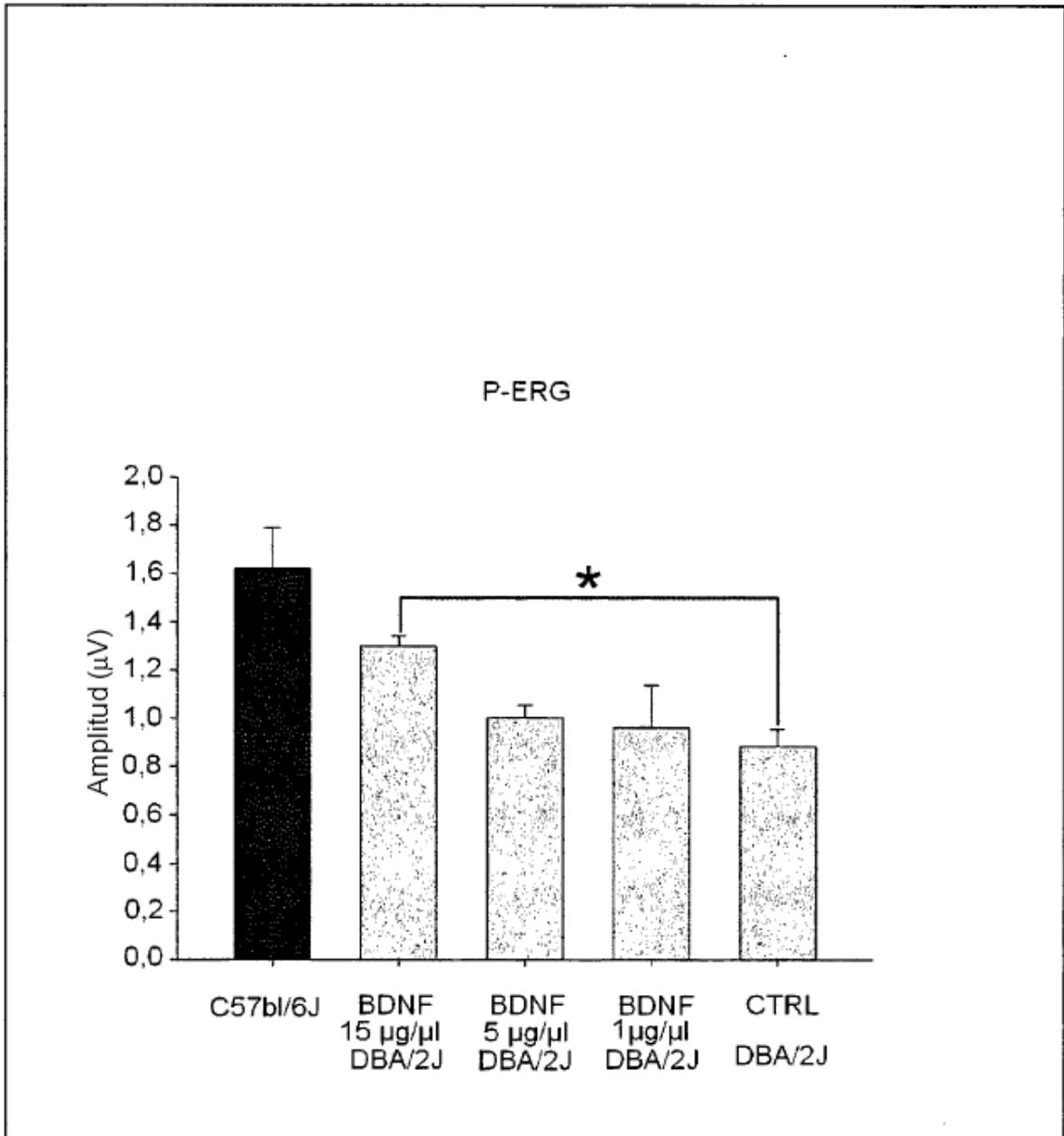


Figura 14

