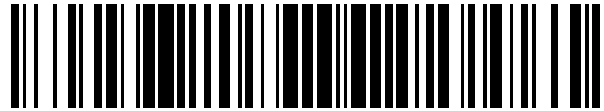


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 605**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2012 PCT/US2012/041701**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12170918**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12797309 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2717903**

54 Título: **Factores neurotróficos MANF y CDFN para uso en el tratamiento de trastornos de la retina**

30 Prioridad:

09.06.2011 US 201161495182 P

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

21.12.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
Dominion Tower, Room 1214, 1400 NW 10th
Avenue
Miami, Florida 33136, US**

72 Inventor/es:

WEN, RONG

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 594 605 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

Factores neurotróficos MANF y CDNF para uso en el tratamiento de trastornos de la retina

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 La presente divulgación se refiere en general al campo de los trastornos degenerativos de la retina. Más particularmente, atañe a procedimientos para tratar trastornos degenerativos de la retina utilizando factores neurotróficos y composiciones y kits que comprenden los factores neurotróficos.

Descripción de la técnica relacionada

- 10 El factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos (MANF) y el factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF) son dos conocidos miembros de una novedosa familia de proteínas conservadas evolutivamente con capacidades neurotróficas (Petrova et al., 2003; Lindholm et al., 2007). El primer miembro de la familia, MANF, se identificó a partir del medio acondicionado de una línea celular de astrocitos de rata de tipo 1, a saber, la línea celular mesencefálica ventral 1 (VMCL1), que es un factor que promueve la supervivencia de neuronas dopaminérgicas embrionarias cultivadas (Petrova et al., 2003). El MANF también reduce significativamente el infarto de miocardio en la corteza isquémica en un modelo de apoplejía en rata (Airavaara et al., 2009) y promueve la supervivencia de las células del músculo cardíaco cultivadas (Tadimalla et al., 2008). El CDNF, por otra parte, se identificó primero informáticamente y luego se caracterizó bioquímicamente (Lindholm et al., 2007). Se expresaba en tejidos murinos y humanos, incluyendo el cerebro. Una sola inyección de CDNF recupera la pérdida inducida por anfetamina de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (Lindholm et al., 2007). El análisis estructural
- 15
- 20
- 25
- mostró que tanto MANF como CDNF tienen un dominio de unión a lípidos similares a saposina N-terminal y un dominio C-terminal que puede ser responsable de la respuesta al estrés del retículo endoplásmico (RE), y ninguna proteína se asemeja a ningún factor de crecimiento conocido (Parkash et al., 2009). Los receptores y rutas de señalización de CDNF y MANF son desconocidos. Mientras que estas dos proteínas han sido consideradas como tratamientos potenciales para la enfermedad de Parkinson, el inventor en el presente documento los ha considerado como tratamientos potenciales para otros trastornos neurodegenerativos, incluyendo los trastornos degenerativos de la retina tales como trastornos hereditarios de la retina, degeneración macular relacionada con la edad, y glaucoma.

Sumario de la invención

- 30 A la vista de sus capacidades neurotróficas y el potencial de tratamiento en los trastornos neurodegenerativos, la presente memoria da a conocer el uso de los factores neurotróficos MANF y CDNF para recuperar los fotorreceptores y células ganglionares de la retina en trastornos degenerativos de la retina en pacientes, incluyendo trastornos de la retina hereditarios, degeneración macular relacionada con la edad y glaucoma.

- 35 Específicamente, la presente divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de un trastorno de la retina que comprende administrar una cantidad eficaz de un factor neurotrófico a un sujeto que tiene el trastorno de la retina. El sujeto con necesidad de tratamiento puede ser un animal, que puede incluir un mamífero (por ejemplo, un ser humano). Los trastornos de la retina susceptibles de tratamiento o supresión por los procedimientos de la invención comprenden trastornos neurodegenerativos tales como degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, trastornos de la retina hereditarios, trastornos de la retina esporádicos, otros trastornos degenerativos de la retina, o lesiones de la retina.

- 40 Los factores neurotróficos que pueden administrarse en las realizaciones de la presente divulgación incluyen MANF y CDNF, individualmente o en combinación. El factor neurotrófico puede ser un factor recombinante o aislado, y, en realizaciones particularmente útiles, el factor neurotrófico es un factor neurotrófico humano.

- En realizaciones particulares, el factor neurotrófico se administra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el factor neurotrófico se inyecta en un ojo de un sujeto con necesidad del mismo, que se puede administrar también mediante un vehículo de liberación prolongada.

- 45 La presente divulgación también proporciona un procedimiento para promover la neuroprotección en una célula neuronal que comprende poner en contacto la célula neuronal con un factor neurotrófico, que puede incluir los factores neurotróficos MANF y CDNF, ya sea individualmente o en combinación. La puesta en contacto de las células neuronales puede tener lugar *in vitro* o *in vivo*

- 50 Los tipos de células susceptibles de tratamiento por los procedimientos de la divulgación comprenden las células ganglionares o células fotorreceptoras.

La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende un factor neurotrófico, que puede incluir MANF y CDNF individualmente o en combinación. La presente divulgación también se dirige a kits de piezas que comprenden factores neurotróficos, reactivos y las instrucciones para el uso de los mismos. Además, la presente invención puede utilizar los factores neurotróficos que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.

Los procedimientos, composiciones y kits descritos en el presente documento se pueden utilizar en relación con aplicaciones farmacéuticas, médicas y veterinarias, así como la investigación científica fundamental y metodologías como serían identificables por un experto en la materia tras la lectura de la presente divulgación. Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente divulgación resultarán más claros cuando los dibujos así como la descripción detallada se tengan en consideración.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la naturaleza de la presente divulgación, debe hacerse referencia a la siguiente descripción detallada tomada en conexión con las figuras adjuntas en las que:

La Figura 1 muestra una fotografía de electroforesis en gel de proteína MANF humana recombinante purificada en cantidades de 1 g y 5 µg, en comparación con una escala patrón de peso molecular (MW) que muestra el tamaño de la proteína MANF purificada como de aproximadamente 20 kilodaltones (KD).

La Figura 2 muestra una fotografía de electroforesis en gel de proteína CDFN humana recombinante purificada en una cantidad de 5 µg, en comparación con una escala patrón de peso molecular (MW) que muestra el tamaño de la proteína CDFN purificada como de aproximadamente 18 kilodaltones (KD).

Las Figuras 3A-3C muestran fotografías de las secciones de las capas nucleares externas de la retina de ratas S334ter3 tratadas con control y con MANF con microscopía óptica, así como el análisis cuantitativo del espesor de la capa nuclear externa en cada una. La Figura 3A muestra la retina tratada con control PBS (solución salina tamponada con fosfato). La Figura 3B es representativa de una retina tratada con MANF. Barra de escala, 25 µm. La Figura 3C es una representación gráfica del análisis cuantitativo del espesor de la capa nuclear externa de la retina en retinas tratada con PBS y tratada con MANF.

Las Figuras 4A-4C muestran fotografías de microscopía óptica de las secciones de las capas nucleares externas de la retina en ratas S334ter3 tratadas con control y con CDFN, así como el análisis cuantitativo del espesor de la capa nuclear externa en cada una. La Figura 4A es representativa de retinas tratadas con control PBS (solución salina tamponada con fosfato). La Figura 4B es representativa de retinas tratadas con CDFN. Barra de escala, 25 µm. La Figura 4C es una representación gráfica del análisis cuantitativo del espesor de la capa nuclear externa de la retina en retinas tratadas con PBS y tratadas con CDFN.

Las Figuras 5A-5C muestran fotografías de microscopía fluorescente del segmento externo de cono (COS) de las retinas enteras montadas teñidas con PNA conjugado con Alexa Fluor 488 (aglutinina de cacahuete) en ratas S334ter3 tratadas con control y MANF (Figuras 5A y 5B), así como el análisis cuantitativo de cada una (Figura 5C). La Figura 5A es representativa de una retina tratada con control PBS. La Figura 5B es representativa de una retina tratada con MANF. Barra de escala, 50 µm. La Figura 5C es una representación gráfica del análisis cuantitativo del número de células marcadas de la retina en retinas tratadas con PBS y tratadas con MANF.

Las Figuras 6A-6C muestran fotografías de microscopía fluorescente de COS de retinas enteras montadas teñidas con PNA conjugado con Alexa Fluor 488 en ratas S334ter3 tratadas con control y con CDFN (Figuras 6A y 6B), así como el análisis cuantitativo de cada una (Figura 6C). La Figura 6A es representativa de una retina tratada con PBS de control. La Figura 6B es representativa de una retina tratada con CDFN. La Figura 6C es una representación gráfica del análisis cuantitativo del número de células marcadas de la retina en retinas tratadas con PBS y tratadas con CDFN.

Las Figuras 7A-7C muestran microfografías representativas de células ganglionares retromarcadas con Fluoro-Gold de retinas enteras montadas de ratas de control (Figura 7A), ratas después del aplastamiento del nervio óptico además de tratamiento con PBS como control (Figura 7B), y ratas después de aplastamiento del nervio óptico además de tratamiento con MANF (Figura 7C). La Figura 7A es representativa de células ganglionares de la retina de control que no experimentan aplastamiento del nervio óptico. La Figura 7B es representativa de células ganglionares de la retina dos semanas después del aplastamiento del nervio óptico y el tratamiento con PBS. La Figura 7C es representativa de células ganglionares de la retina dos semanas después del aplastamiento del nervio óptico y el tratamiento con MANF.

La Figura 8 muestra una fotografía de una transferencia Western sondeada para MANF y actina β (control de carga). Se muestran los niveles de expresión de MANF en extractos de retina de ratas Sprague Dawley de tipo silvestre a PD 1, PD 5, PD 8, PD 10, PD 12, PD 16, PD 25, PD 30, PD 40 y PD 60.

La Figura 9 muestra una fotografía de microscopía de fluorescencia de una sección criogénica de retina de rata sondeada con anticuerpos anti-MANF. Barra de escala, 50 µm. Las capas etiquetadas en la sección incluyen el epitelio pigmentario de la retina (RPE), el segmento fotorreceptor exterior (OS), el segmento fotorreceptor interior (IS), la capa nuclear externa (ONL), la capa nuclear interna (INL), la capa plexiforme interna (IPL) y la capa de células ganglionares (GCL). La actividad inmunológica de MANF se muestra en las células del RPE, fibras de células de Muller y cuerpos celulares, así como en la GCL.

La Figura 10 muestra la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO.: 1.

La Figura 11 muestra la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO.: 2.

La Figura 12 muestra la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 3.

La Figura 13 muestra la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 4.

Los números de referencia similares hacen referencia a partes similares en todas las diversas vistas de los dibujos.

5 **Descripción detallada de la realización preferente**

La presente divulgación se dirige a procedimientos de tratamiento, composiciones y kits para el tratamiento de trastornos de la retina.

10 Se describen diversos aspectos de la divulgación a continuación, con referencia a los ejemplos para propósitos ilustrativos solamente. Debe entenderse que se exponen numerosos detalles específicos, relaciones y procedimientos para proporcionar una comprensión completa de la divulgación. Un experto en la técnica relevante, sin embargo, reconocerá fácilmente que la divulgación se puede practicar sin uno o más de los detalles específicos o practicarse con otros procedimientos, protocolos, reactivos, líneas celulares y animales. La presente divulgación no está limitada por el orden ilustrado de actos o eventos, ya que algunos actos pueden ocurrir en diferentes órdenes y/o concurrentemente con otros actos o eventos. Muchas de las técnicas y procedimientos descritos o referidos en el
15 presente documento son bien conocidos y comúnmente empleados usando la metodología convencional por los expertos en la técnica.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos de la técnica, notaciones y otros términos o terminología científica utilizados en el presente documento se pretende que tengan los significados entendidos comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento para mayor claridad y o para una pronta referencia, y la inclusión de tales definiciones en el presente documento no necesariamente debe ser interpretado que representa una diferencia sustancial con respecto a lo que se entiende generalmente en la técnica. Se entenderá además que los términos, tales como los definidos en los diccionarios usados comúnmente, deben interpretarse como que tienen un significado que es consistente con su significado en el contexto de la técnica relevante y/o como se definen de
20 otra manera en el presente documento.

La terminología utilizada en el presente documento es para el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser. Como se utilizan en el presente documento, debe entenderse que los artículos indefinidos "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

30 La frase "y/o", como se utiliza en el presente documento, debe entenderse que significa "uno o ambos" de los elementos así unidos, es decir, elementos que están presentes conjuntamente en algunos casos y presentes disyuntivamente en otros casos.

Como se utiliza en el presente documento, "o" debe entenderse que tiene el mismo significado que "y/o" como se definió anteriormente. Por ejemplo, cuando se separan una lista de artículos, "y/o" u "o" deberán interpretarse como
35 inclusivos, es decir, la inclusión de al menos uno, pero incluyendo también más de uno, de una serie de artículos, y, opcionalmente, artículos no listados adicionales. Solamente los términos indicados claramente al contrario, como "sólo uno de" o "exactamente uno de", o cuando se utiliza en las reivindicaciones, "que consiste en," se refieren a la inclusión de exactamente un elemento de una serie o lista de elementos. En general, el término "o" como se utiliza en el presente documento sólo puede ser interpretado como una indicación de alternativas exclusivas (es decir, "uno o el otro, pero no ambos") cuando está precedido por los términos de exclusividad como "cualquiera", "uno de", "sólo uno de", o "exactamente uno de."

Como se utilizan en el presente documento, los términos "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con" o variantes de los mismos pretenden ser inclusivos de forma similar a la expresión "que comprende".

45 Todos los genes y productos génicos (incluyendo ARN y proteínas) y sus respectivos nombres dados a conocer en el presente documento pretenden corresponder a homólogos de cualquier especie para la cual las composiciones y procedimientos dados a conocer en el presente documento sean aplicables. Cuando se da a conocer un gen o producto génico de una especie particular, se entiende que esta divulgación pretende ser solamente ejemplar y no debe ser interpretada como una limitación, a menos que el contexto en el que aparece claramente indique lo contrario. Por ejemplo, los genes y productos génicos dados a conocer en la presente, que en algunas realizaciones se refieren a secuencias de ácidos nucleicos y/o aminoacídicas de mamífero (incluyendo ser humano), pretenden abarcar genes homólogos y/u ortólogos y/o parálogos y productos génicos de otros animales incluyendo, pero no limitado a, otros mamíferos, peces, reptiles, anfibios, aves y otros vertebrados.

55 En el contexto de la presente divulgación, los términos "polipéptido" y "proteína" son equivalentes y mutuamente intercambiables. Hacen referencia a cualquier cadena de aminoácidos, e incluyen todas las modificaciones postraduccionales en la misma (por ejemplo, fosforilación o glicosilación).

Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" hace referencia a cualquier animal (por ejemplo, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces), incluyendo, pero no limitado a, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares, que sea el receptor de un tratamiento particular. Típicamente, los términos "sujeto" y "paciente" se pueden utilizar indistintamente en el presente documento con referencia a un sujeto. Además, los animales transgénicos (por ejemplo, ratas y ratones transgénicos) son útiles en los procedimientos de la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, el término "compuesto" hace referencia a un factor neurotrófico, salvo que se indique claramente lo contrario. El factor neurotrófico puede ser representado, descrito y/o aplicado para los propósitos de la presente invención en forma de ADN recombinante, ARN o proteína. El factor neurotrófico también puede estar en una forma aislada, como aislado y purificado a partir de un animal, que también podría ser un sujeto. En algunas realizaciones, el factor neurotrófico puede ser un polipéptido, polinucleótido o fragmento del mismo. El término "producto biológico" también se puede utilizar de forma intercambiable con "compuesto" en el presente documento para hacer referencia a un factor neurotrófico de la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, el término "fragmento" hace referencia a una porción de un compuesto. Por ejemplo, cuando se hace referencia a una proteína, un fragmento es una pluralidad de aminoácidos consecutivos que comprenden menos de la longitud completa del polipéptido. Por ejemplo, un fragmento de un compuesto puede compartir hasta un 99 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 % o 60 % de su secuencia con el compuesto original.

Como se utiliza en el presente documento, el término "administrar" hace referencia a proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto químico o biológico o composición farmacéutica o a un sujeto, utilizando la administración intravítrea, intraocular, ocular, subretinal, intratecal, intravenosa, subcutánea, transcutánea, intracutánea, intracraneal, tópica y similares. El compuesto químico o biológico de la presente divulgación se puede administrar solo, pero se puede administrar con otros compuestos, excipientes, cargas, aglutinantes, portadores u otros vehículos seleccionados en base a la vía de administración elegida y la práctica farmacéutica estándar. La administración puede ser mediante portadores o vehículos tales como soluciones inyectables, incluyendo soluciones acuosas o no acuosas estériles o soluciones salinas; cremas; lociones; cápsulas; comprimidos; gránulos; pellas; polvos; suspensiones, emulsiones, o microemulsiones; parches; micelas; liposomas; vesículas; implantes incluidos los microimplantes; gotas oculares; otras proteínas y péptidos; polímeros sintéticos; microesferas; nanopartículas y similares.

El compuesto químico o biológico o composición farmacéutica de la presente divulgación también se puede incluir, o envasar, con otros compuestos no tóxicos tales como portadores, excipientes, aglutinantes y cargas farmacéuticamente aceptables incluyendo, pero no limitado a, glucosa, lactosa, goma arábiga, gelatina, manitol, goma de xantano, goma de algarroba, galactosa, oligosacáridos y/o polisacáridos, pasta de almidón, trisilicato de magnesio, talco, almidón de maíz, fragmentos de almidón, queratina, sílice coloidal, almidón de patata, urea, dextranos, dextrinas, y similares. Específicamente, los portadores, excipientes, aglutinantes y cargas farmacéuticamente aceptables contemplados para uso en la práctica de la presente invención son aquellos que vuelven los compuestos de la divulgación susceptibles de suministro intravítreo, suministro intraocular, suministro ocular, suministro subretinal, suministro intratecal, suministro intravenoso, suministro subcutáneo, suministro transcutáneo, suministro intradérmico, suministro intracraneal, suministro tópico y similares. Además, el material de envasado puede ser biológicamente inerte o carecer de bioactividad, tales como polímeros plásticos, silicona, etc. y puede ser procesado internamente por el sujeto sin afectar a la eficacia del factor neurotrófico envasado y/o suministrado con el mismo.

También se contempla que los compuestos de la presente divulgación se puedan administrar por medio de un vehículo de la implantación, como la tecnología de encapsulación celular (ECT) u otras tecnologías de microimplantación similares o futuras derivadas. La ECT se describe en el Tao, W. et al., 2006, Tao, W. y Wen, R., 2007 y Sieving et al., 2006. En algunas realizaciones, el vehículo de ECT puede liberar los compuestos de la presente invención a un ritmo de aproximadamente 250 ng a aproximadamente 800 ng por 1×10^6 células al día. El vehículo implantado también puede ser cualquier otro vehículo de liberación prolongada similar, o similar, que se desarrolle más adelante.

El término "cantidad eficaz", como se aplica al compuesto o compuestos, productos biológicos y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento, significa la cantidad necesaria para dar el resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz es un nivel eficaz para tratar, curar o aliviar los síntomas de un trastorno para el que se administra el compuesto terapéutico, biológico o composición. Las cantidades eficaces para el objetivo terapéutico particular buscado dependerán de una variedad de factores incluyendo el trastorno que se está tratando y su gravedad y/o etapa de desarrollo/progresión; la biodisponibilidad y la actividad del compuesto específico, producto biológico o composición farmacéutica utilizado; la vía o procedimiento de administración y el sitio de introducción en el sujeto; el índice de aclaramiento del compuesto o producto biológico específico y otras propiedades farmacocinéticas; la duración del tratamiento; el régimen de la inoculación; los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto, producto biológico o composición específico; la edad, peso corporal, sexo, dieta, fisiología y salud general del sujeto a tratar y factores similares bien conocidos para un experto en la técnica científica relevante. Ocurrirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo del estado del sujeto que se está tratando, y el médico u otro individuo que administre el tratamiento determinará, en cualquier

caso, la dosis apropiada para un paciente individual.

Como se usa en el presente documento, "trastorno" hace referencia a un trastorno, enfermedad o afección, o a otra desviación de la actividad biológica sana o normal, y los términos se pueden utilizar indistintamente. Los términos harían referencia a cualquier afección que altere la función normal. La afección puede estar causada por anomalías genéticas esporádicas o hereditarias. La afección también puede estar causada por anomalías no genéticas. La afección también puede estar causada por lesiones en un sujeto por factores ambientales tales como, pero sin limitarse a, corte, trituración, quemadura, perforación, estiramiento, cizalladura, inyección, o modificación de otro modo de la(s) célula(s), tejido(s), órgano(s), sistema(s) de un sujeto o similares.

Como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" hace referencia a detener o inhibir o intentar detener o inhibir el desarrollo o progresión de un trastorno y/o causar, o intentar causar, la reducción, supresión, regresión o remisión de un trastorno y/o un síntoma del mismo. Como se entenderá por los expertos en la técnica, se pueden utilizar diversas metodologías y ensayos clínicos y científicos para evaluar el desarrollo o progresión de un trastorno, y de manera similar, se pueden utilizar diversas metodologías y ensayos clínicos y científicos para evaluar la reducción, regresión o remisión de un trastorno o sus síntomas. Adicionalmente, el tratamiento se puede aplicar a un sujeto o a un cultivo celular.

De acuerdo con al menos una realización de la presente divulgación, un procedimiento para tratar un trastorno de la retina en un sujeto con necesidad del mismo comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto como se describe en el presente documento. En una realización, este compuesto es un factor neurotrófico.

El término "factor neurotrófico" hace referencia a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) y ácidos ribonucleicos (ARN) y proteínas derivadas de los mismos, además de a fragmentos de los mismos, que son responsables del crecimiento y la supervivencia de las células nerviosas durante el desarrollo y para el mantenimiento de células nerviosas de adulto. En algunas realizaciones de la presente divulgación, el factor neurotrófico es factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos (MANF). En realizaciones adicionales, el factor neurotrófico es factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF). Además, el factor neurotrófico administrado puede ser una combinación de MANF y CDFN. Como se entenderá por los expertos en la técnica, MANF y CDFN pueden tener homólogos, ortólogos y/o parálogos que adicionalmente se contemplarían para uso en la presente divulgación.

En una realización de la presente divulgación, el factor neurotrófico es un polipéptido recombinante. El polipéptido recombinante puede ser la proteína MANF o CDFN recombinante. También se contempla en la presente divulgación que los fragmentos polipeptídicos de MANF y/o CDFN recombinantes se pueden utilizar en los procedimientos y kits descritos en el presente documento. Se contempla además que pueden utilizarse ADN completo, ADNc o ARNm (o fragmentos de los mismos) de MANF y/o CDFN recombinante en los procedimientos y kits descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el ADN, ADNc o ARNm (o fragmentos de los mismos) puede estar comprendidos en un plásmido, vector o similares. Por ejemplo, se pueden utilizar polinucleótidos, y fragmentos de los mismos a modo de técnicas de terapia génica o tecnología de encapsulación celular (ECT). Adicionalmente, la presente divulgación puede utilizar factores neurotróficos que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 1, 2, 3, o 4 (o fragmentos, formas recombinantes, quiméricas, o sus combinaciones).

En el procedimiento de la presente divulgación, el factor neurotrófico se administra con un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el portador o vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser una solución salina o cualquier otro vehículo contemplado en el presente documento.

En particular, en una realización, el factor neurotrófico se administra por medio de inyección. En algunas realizaciones, el sitio de inyección es un ojo del sujeto y puede ser administración intraocular, intravítrea, subretinal y similares. En otras realizaciones, el factor neurotrófico se administra en una zona adyacente al ojo, y puede ser a través de inyección u otros procedimientos de suministro como se describen en el presente documento.

El factor neurotrófico se puede administrar también por medio de la implantación de un vehículo en un ojo del sujeto a tratar. El vehículo puede ser un dispositivo de microimplantación, como la tecnología de encapsulación celular (ECT) u otras tecnologías de microimplantación similares o futuros derivados.

El trastorno de la retina tratado por el procedimiento de la presente divulgación puede ser el resultado de una lesión en un tejido o una célula del sistema nervioso central. El trastorno de la retina tratado también puede ser un trastorno neurodegenerativo (por ejemplo, retinitis pigmentaria). El tejido o célula que está lesionado o afectado por un trastorno neurodegenerativo puede ser una célula ganglionar, tal como una célula ganglionar de la retina, o una célula fotorreceptora. En algunas realizaciones, el trastorno de la retina tratado implica la degeneración de células ganglionares. Tal degeneración de células ganglionares puede estar inducida por glaucoma.

Los trastornos neurodegenerativos contemplados para el tratamiento como se describe en el presente documento pueden ser genéticos o esporádicos (es decir, que suceden como un hecho aislado no heredable) en la naturaleza. Como se entenderá por los expertos en la técnica, los trastornos neurodegenerativos también abarcan afecciones distintas de la enfermedad neurodegenerativa de la retina, y se contempla que los procedimientos, composiciones y kits de la presente divulgación son aplicables a otros de dichos trastornos. Dichos trastornos incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, glaucoma, pérdida

de la audición relacionada con la edad, parálisis supranuclear progresiva, deterioro cognitivo leve, demencia, degeneración espinocerebelosa y similares.

5 En al menos una realización, el factor neurotrófico se administra en el sitio de la lesión o padecimiento del trastorno neurodegenerativo o en una zona adyacente al sitio de la lesión o padecimiento. El factor neurotrófico también se puede administrar por medio de un vehículo que libera el factor de forma controlada (es decir, dependiente del tiempo y/o la dosis), por ejemplo, como en ECT, discutido anteriormente en el presente documento.

10 De acuerdo con otra realización de la presente divulgación, un procedimiento para promover la neuroprotección en una célula neuronal comprende poner en contacto la célula neuronal con un factor neurotrófico, tal como MANF, CDNF o combinaciones de los mismos. Como se utiliza en el presente documento, el término "neuroprotección" hace referencia a la prevención, detención, inhibición o retardo del daño nervioso, deterioro neuronal y/o muerte neuronal. La neuroprotección puede desencadenarse después del daño o deterioro causado por el envejecimiento, factores genéticos, cambios ambientales, estrés físico o lesiones, factores biológicos o químicos endógenos o exógenos (por ejemplo, neurotrofinas, vitaminas, alcohol, agentes farmacéuticos, isquemia y similares), apoplejía o similares.

15 Como se utiliza en el presente documento, el término "poner en contacto" hace referencia a acciones dirigidas a la creación de una relación espacial entre la(s) célula(s) y el(los) factor(es) neurotrófico(s) (o el vehículo que contiene el(los) factor(es) neurotrófico(s)), proporcionado durante un tiempo predeterminado y especificado y en condiciones apropiadas para dar una respuesta biológica deseada en la(s) célula(s) en contacto, tal como neuroprotección. La relación espacial entre la(s) célula(s) y el(los) factor(es) neurotrófico(s) puede incluir el contacto directo, con lo que el factor desencadena una respuesta sobre la superficie de la célula puesta en contacto directamente o entra en la célula para la acción posterior, o contacto indirecto, con lo que el factor desencadena una respuesta en la célula a través de la señalización extracelular (por ejemplo, después de la activación o modificación de otra sustancia que interacciona con la célula puesta en contacto). Tal como se aplica en el presente documento, una respuesta biológica incluye una respuesta neuroprotectora o cualquier otra respuesta por la(s) célula(s) que cause una detención, inhibición, reducción o regresión de un trastorno de la(s) célula(s).

20 En realizaciones particulares, la puesta en contacto de células neuronales con un factor neurotrófico se lleva a cabo *in vitro* "*In vitro*" puede incluir en cultivos de células o de tejidos o cultivos en tubos de ensayo. En otras realizaciones, la puesta en contacto de las células neuronales tiene lugar *in vivo* "*In vivo*" puede incluir modelos animales (por ejemplo, animales transgénicos tales como ratones o ratas) o sujetos vivos tales como se definen en el presente documento, incluyendo seres humanos. En aún otras realizaciones, la puesta en contacto de las células neuronales se lleva a cabo *ex vivo* "*Ex vivo*" puede incluir tejidos, órganos o sistemas intactos, o porciones de los mismos, derivados de un sujeto que se han aislado o extraído de su fuente. Como se utiliza en el presente documento, el término "aislado" significa que el artículo descrito se segrega o separa (física o químicamente). Algo que se aísla aún puede estar dentro de un sujeto o de existir fuera de un sujeto. Como se utiliza en el presente documento, el término "extraído" significa que el artículo descrito se retira del sujeto y existe fuera del sujeto.

30 En algunas realizaciones, los tipos de células neuronales susceptibles de tratamiento por los procedimientos de la invención comprenden células ganglionares o células fotorreceptoras. En una realización particular, el tipo de célula neuronal susceptible de tratamiento por los procedimientos de la invención comprende células ganglionares de la retina.

40 Los factores neurotróficos pueden ser factores neurotróficos recombinantes o aislados y también pueden ser un factor neurotrófico humano recombinante o aislado. Como se utiliza en el presente documento con respecto a los genes o fragmentos de los mismos, o productos génicos o fragmentos de los mismos, el término "aislado" se define como ser retirado de células de un animal y/o purificado para su uso en los procedimientos descritos. Como se utiliza en el presente documento, el término "gen" hace referencia a un polinucleótido derivado de un cromosoma que codifica ARN y proteínas. Un gen, como se usa en el presente documento, puede o no incluir todos los intrones, exones, regiones promotoras, regiones no codificantes y similares que están asociados con el gen específico.

50 La presente divulgación también hace referencia a una composición farmacéutica o medicamento que comprende un factor neurotrófico, tal como MANF, CDNF o combinaciones de los mismos. La composición farmacéutica también puede incluir otros compuestos farmacéuticamente aceptables, excipientes, aditivos, cargas, aglutinantes, coadyuvantes o portadores o vehículos seleccionados en base a la vía de administración elegida y la práctica farmacéutica estándar. Como tal, el(los) factor(es) neurotrófico(s) puede(n) utilizarse en la fabricación o preparación de medicamentos y composiciones farmacéuticas. Además, los medicamentos y composiciones farmacéuticas que comprenden los factores neurotróficos descritos pueden ser utilizados para el tratamiento de trastornos como se describe en el presente documento.

55 La presente divulgación también hace referencia a un kit de piezas que comprende factor(es) neurotrófico (s) y otros reactivos necesarios para efectuar el(los) procedimiento(s) de la presente divulgación. El kit de piezas también puede incluir instrucciones de uso. El(los) factor(es) neurotrófico(s) y reactivos pueden ser incluidos en una o más composiciones, y cada factor neurotrófico y reactivo pueden estar en una composición en combinación con un vehículo adecuado, o pueden estar presentes de forma independiente. El kit de piezas puede incluir MANF, CDNF o

combinaciones de los mismos, en forma de proteínas purificadas (recombinantes o aisladas de un animal) o en forma de polinucleótidos purificados (recombinantes o aislados de un animal).

5 En otras realizaciones, el kit de piezas incluye biomarcadores marcados específicos de determinados tipos de células neuronales, tales como biomarcadores de fotorreceptores o biomarcadores de células ganglionares de la retina, patrones de referencia y componentes adicionales que serían identificables por los expertos en la técnica al leer la presente divulgación.

Ejemplos

Los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento y los kits relacionados se ilustran adicionalmente en los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes.

10 El siguiente material y procedimientos se utilizaron para todos los procedimientos y composiciones ejemplificados en el presente documento.

15 Clonación de proteínas MANF y CDFN humanas recombinantes: Los marcos de lectura abiertos (ORF) de MANF (SEQ ID NO: 1) y CDFN (SEQ ID NO: 2) se clonaron cada uno mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADNc de cerebro humano, y se confirmaron las secuencias clonadas resultantes. Se subclonó cada ORF en el vector de expresión pQE30 (Qiagen, Valencia, CA), que contiene una secuencia de codificación del marcaje 6xHis N-terminal en fase. A continuación, se expresaron los vectores de expresión que contienen cada una de las secuencias de MANF y CDFN se expresaron en *E. coli* (XL-Blue, Stratagene, La Jolla, CA), y se purificaron las correspondientes proteínas expresadas por cromatografía de afinidad de metal inmovilizado en columnas de Ni-NTA agarosa (Qiagen) en condiciones nativas. Se intercambió el tampón de la proteína eluida con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se almacenó a -80 °C en pequeñas alícuotas hasta su uso. La secuencia de la proteína humana MANF apropiada está representada por la SEQ ID NO: 3, y la secuencia de la proteína humana CDFN apropiada está representada por la SEQ ID NO: 4.

25 Visualización de las proteínas MANF y CDFN purificadas: Se sometieron a electroforesis 1 µg y/o 5 µg de proteína purificada en un gel de NuPAGE al 4-12 % y se visualizaron con azul de Coomassie para confirmar la purificación y los pesos moleculares apropiados. Se sometieron a electroforesis marcadores de peso molecular (PM) en un carril cercano a las muestras de 1 µg y/o 5 µg.

Animales transgénicos: Se generaron ratas transgénicas portadoras de la mutación S334ter de rodopsina de murino, conocidas como ratas S334ter-3 ratas, y se utilizaron como se describe anteriormente (Liu et al., (1999)).

30 Ensayo de protección de los fotorreceptores: Se aportaron inyecciones intravítreas individuales de MANF y PBS (control) a ratas S334ter3. Específicamente, se inyectaron 6 µg de MANF en un ojo de una rata en el día postnatal (PD) 9 y se inyectaron simultáneamente 3 µl de PBS en el ojo restante de la misma rata como control. Las inyecciones se efectuaron a través de una aguja de calibre 33 conectada a una microjeringa de 10 µl (Hamilton, Reno, NV). Los animales fueron sacrificados en PD21 y se recolectó cada ojo, se embebió en plástico y se seccionó como se describe previamente (Liu et al., (1999)). Las secciones de retina semifinas resultantes se tiñeron con azul de toluidina y se examinaron por microscopía óptica. Se efectuaron experimentos similares usando 6 µg de CDFN.

40 Ensayo de protección del segmento externo de fotorreceptores de cono (COS): Se aportaron inyecciones intravítreas individuales de MANF y PBS (control) a ratas S334ter3. Se inyectaron 6 µg de MANF en un ojo de una rata en el día postnatal (PD) 20, y se inyectaron simultáneamente 3 µl de PBS en el ojo restante de la misma rata como control. Las inyecciones se efectuaron a través de una aguja de calibre 33 conectada a una microjeringa de 10 µl (Hamilton, Reno, NV). Los animales fueron sacrificados 10 días después del tratamiento en PD30 y se recolectó cada ojo. Se tiñeron retinas montadas totales con PNA conjugado con Alexa Fluor 488 (aglutinina de cacahuete), que se une específicamente a los segmentos externos de los fotorreceptores de cono, y se examinaron por microscopía de fluorescencia. Se efectuaron experimentos similares usando 6 µg de CDFN.

45 Ensayo de aplastamiento del nervio óptico: Se marcaron células ganglionares de la retina de ratas Sprague Dawley de tipo silvestre por retromaraje con Fluoro-Gold. Una semana después del marcaje, se aplastaron los nervios ópticos seguido inmediatamente de la inyección intravítrea de 6 µg de MANF. Dos semanas después del aplastamiento del nervio y el tratamiento, las ratas se sacrificaron y se recolectaron las retinas. Se examinaron las retinas montadas enteras por microscopía de fluorescencia.

50 Análisis de expresión de la proteína MANF de retina: Se hicieron circular cantidades iguales de extractos de proteína de retinas de ratas Sprague Dawley de tipo silvestre en PD 1, PD 5, PD 8, PD 10, PD 12, PD 16, PD 25, PD 30, PD 40 y PD 60 en geles de poliacrilamida, se transfirieron a membranas y se sondearon con anticuerpos para MANF y β-actina. Se analizó la expresión de la proteína estructural, β-actina, para asegurar una carga consistente de extractos de proteína en cada punto temporal analizado.

Ejemplo 1: Purificación del factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos humano recombinante (MANF)

55 Para probar las propiedades neuroprotectoras de los factores neurotróficos candidatos, se generaron proteínas

MANF y CDFN humanas recombinantes y se purificaron para experimentación adicional. Se expresó MANF humana recombinante en *E. coli*, se purificó y se visualizó como se describe anteriormente en Materiales y Procedimientos. Los resultados ilustrados en la Figura 1 muestran que 1 µg y 5 µg de MANF purificada se visualizan como una única banda de 20 kDa. El carril 1 muestra los marcadores de peso molecular (PM); el carril 2 representa 1µg de MANF purificada y el carril 3 representa 5 µg de MANF purificada. “KD” hace referencia a “kilodaltones”.

Ejemplo 2: Purificación del factor neurotrófico de dopamina humana recombinante (CDFN)

También se utilizó CDFN como factor neurotrófico candidato con propiedades neuroprotectoras. Se expresó la CDFN humana recombinante en *E. coli*, se purificó y se visualizó como se describe anteriormente en Materiales y Procedimientos. Los resultados ilustrados en la Figura 2 muestran que 5 µg de CDFN purificada se visualiza como una única banda de 18 kDa. El carril 1 muestra los marcadores de peso molecular (PM); el carril 2 representa 5 µg de CDFN purificada. “KD” hace referencia a “kilodaltones”.

Ejemplo 3: Protección de los fotorreceptores por MANF en la retina de un modelo de degeneración de retina en roedor

En la búsqueda de factores neurotróficos que podrían recuperar los fotorreceptores en trastornos degenerativos de la retina, incluyendo trastornos hereditarios de la retina (por ejemplo, retinitis pigmentaria), degeneración macular relacionada con la edad y glaucoma, se ensayó la proteína MANF humana recombinante para determinar las propiedades protectoras de los fotorreceptores en un modelo de degeneración de la retina en roedor. Con este fin, se utilizaron ratas transgénicas S334ter3 debido a su caracterizada degeneración progresiva de los fotorreceptores de la retina (Liu et al., (1999)).

Los resultados ilustrados en la Figura 3A muestran que, en ratas S334ter3 tratadas con PBS (control), la capa nuclear externa de la retina tenía sólo una fila de núcleos (véase la punta de flecha en la Figura 3A) en PD 21. Los resultados ilustrados en la Figura 3B muestran que una única inyección intravítrea de MANF en PD 9 en el ojo restante del mismo animal protegía los fotorreceptores de la degeneración en el punto temporal PD 21, ya que la capa nuclear externa contenía de tres a cuatro filas de núcleos (véase entre las dos puntas de flecha en la Figura 3B).

El análisis cuantitativo del espesor de la capa nuclear externa de la retina superior, como se muestra en la Figura 3C, indica que la capa nuclear externa de retinas tratadas con MANF ($17,47 \pm 3,96 \mu\text{M}$, $n = 5$) era significativamente más gruesa que la capa nuclear externa de las retinas tratadas con PBS de control ($7,07 \pm 1,12 \mu\text{M}$, $n = 5$) (media \pm DE). $P < 0,001$ (prueba t de Student).

Ejemplo 4: Protección de los fotorreceptores por CDFN en la retina de un modelo de degeneración de la retina en roedor

En busca de otros factores neurotróficos que podrían recuperar los fotorreceptores de la retina en trastornos degenerativos, se ensayaron en la proteína CDFN humana recombinante las propiedades protectoras de los fotorreceptores en el mismo modelo de degeneración de la retina en roedor utilizado para los estudios de MANF previamente descritos en el presente documento.

Los resultados ilustrados en la Figura 4A muestran que, en ratas S334ter3 tratadas con PBS (control), la capa nuclear externa de la retina tenía sólo una fila de núcleos (véase la punta de flecha en la Figura 4A) en PD 21. Los resultados ilustrados en la Figura 4B muestran que una única inyección intravítrea de CDFN en PD 9 en el ojo restante del mismo animal protegía los fotorreceptores de la degeneración en el punto temporal PD 21, ya que la capa nuclear externa contenía de tres a cuatro filas de núcleos (véase entre las dos puntas de flecha en la Figura 4B).

El análisis cuantitativo del espesor de la capa nuclear externa de la retina superior, como se muestra en la Figura 4C, indica que la capa nuclear externa de retinas tratadas con CDFN ($16,61 \pm 2,87 \mu\text{M}$, $n = 6$) era significativamente más gruesa que la capa nuclear externa en retinas tratadas con PBS de control ($7,4 \pm 3,43 \mu\text{M}$, $n = 6$) (media \pm DE). $P < 0,001$ (prueba t de Student).

Ejemplo 5: Protección del segmento externo de fotorreceptores de cono por MANF en la retina de un modelo de degeneración de la retina en roedor

Como otra prueba de la capacidad protectora de los fotorreceptores por los factores neurotróficos, el segmento externo del cono se analizó en el mismo modelo de degeneración de la retina en roedor descrito anteriormente en el presente documento después de la exposición a proteína MANF humana recombinante.

Los resultados ilustrados en la Figura 5B muestran que una única inyección intravítrea de MANF en PD 20 en el ojo del modelo de degeneración de retina en roedor protegía el segmento exterior de cono de la degeneración, como se mide en el punto temporal PD 30, frente al ojo restante del mismo animal al que se inyecta PBS (control) (Figura 5A).

Los resultados mostrados en la Figura 5C son un análisis cuantitativo del número de células teñidas positivamente

con PNA conjugado con Alexa Fluor 488, indicativo de la presencia de fotorreceptores de cono. El gráfico indica que las retinas tratadas con MANF contenían un número significativamente mayor de fotorreceptores de cono ($569,5 \pm 46,5 \mu\text{M}$) frente a las retinas tratadas con PBS de control ($398,7 \pm 25,4 \mu\text{M}$) (C, media \pm DE). $P < 0,001$ (prueba t de Student).

5 **Ejemplo 6:** Protección del segmento externo de fotorreceptores de cono por CDNF en la retina de un modelo de degeneración de la retina en roedor

Se utilizó el mismo procedimiento experimental que en el Ejemplo 5 para poner a prueba aún más la capacidad protectora de los fotorreceptores de la proteína CDNF humana recombinante.

10 Los resultados ilustrados en la Figura 6B muestran que una única inyección intravítrea de CDNF en PD 20 en el ojo del modelo de degeneración de la retina en roedor protegía el segmento exterior del cono de la degeneración, como se mide en el punto temporal PD 30, frente al ojo restante del mismo animal en el que se inyecta PBS (control) (Figura 6A).

15 Los resultados mostrados en la Figura 6C son un análisis cuantitativo de la cantidad de células teñidas positivamente con PNA conjugado con Alexa Fluor 488, indicativa de la presencia de fotorreceptores de cono. El gráfico indica que las retinas tratadas con CDNF contenían un número significativamente mayor de fotorreceptores de cono ($561,5 \pm 81,3 \mu\text{M}$) frente a las retinas tratadas con PBS de control ($412,75 \pm 40,9 \mu\text{M}$) (C, media \pm DE). $P = 0,012$ (prueba t de Student).

20 **Ejemplo 7:** Protección de las células ganglionares de la retina por CDNF después del aplastamiento del nervio óptico en ratas

20 Como una prueba adicional para las capacidades neuroprotectoras del factor neurotrófico MANF, se analizaron las células ganglionares de la retina después del aplastamiento del nervio óptico y la exposición a MANF en ratas.

25 Los resultados ilustrados en la Figura 7A-C muestran la capacidad de MANF de proteger a células ganglionares de la retina después del aplastamiento del nervio óptico. Como se muestra en la Figura 7A, las células ganglionares retromarcadas se distribuyen a lo largo de la micrografía representativa en ratones de control. Como se muestra en la Figura 7B, las células ganglionares retromarcadas degeneran en su mayoría dos semanas después del aplastamiento del nervio óptico en retinas tratadas con PBS (control). Por el contrario, el tratamiento con MANF, como se muestra en la figura 7C, es capaz de recuperar muchas de las células ganglionares de la retina dos semanas después del aplastamiento del nervio óptico y el tratamiento.

30 **Ejemplo 8:** La expresión de la proteína MANF en la retina es más alta durante el desarrollo de los fotorreceptores en ratas

35 Se analizaron en extractos de proteínas de retinas de ratas Sprague Dawley de tipo silvestre, en el PD 1, PD 5, PD 8, PD 10, PD 12, PD 16, PD 25, PD 30, PD 40 y PD 60, por transferencia Western los niveles de expresión de MANF. Como se muestra en la Figura 8, se detectaron altos niveles de expresión de MANF durante el desarrollo postnatal (de PD 1 a PD 16). A medida que maduran las retinas pasado PD 16, disminuye la expresión (véase la disminución continuada del nivel de expresión de PD 25 a PD 60 en la Figura 8).

40 **Ejemplo 9:** Inmunoactividad de MANF en la retina

Como se muestra en la Figura 9, las secciones criogénicas sondeadas con anticuerpos anti-MANF demostraron que la inmunoactividad de MANF localiza en las células del epitelio pigmentario de la retina (RPE), fibras de las células de Muller y cuerpos celulares, así como en la capa de células ganglionares de la retina.

40 En conjunto, los resultados presentados en los ejemplos revelan que MANF y CDNF tienen propiedades neuroprotectoras de los fotorreceptores, y al menos MANF tiene adicionalmente propiedades neuroprotectoras en las células ganglionares de la retina. Adicionalmente, al menos MANF tiene un alto nivel de expresión durante el desarrollo de los fotorreceptores, y su nivel disminuye a medida que maduran los fotorreceptores. Estos resultados sugieren que MANF y CDNF son agentes terapéuticos para trastornos degenerativos de la retina.

45 **REFERENCIAS**

Airavaara, M., Shen, H., Kuo, C., Peranen, J., Saarma, M., Hoffer, B. y Wang, Y. (2009). "Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor reduces ischemic brain injury and promotes behavioral recovery in rats". *Journal of Comparative Biology* 515: 116-124.

50 Lindholm, P., Voutilainen, MH, Lauren, J., Peranen, J., Leppanen, V., Andressoo, J., Lindahl, M., Janhunen, S., Kalkkinen, N., Timmusk, T., Tuominen, RK y Saarma, M. (2007). "Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo". *Nature* 448:73-78.

Liu, C., Li, Y., Peng, M., Laties, AM y Wen, R. (1999). "Activation of caspase-3 in the retina of transgenic rats with the rhodopsin mutation S334ter during photoreceptor degeneration". *Journal of Neuroscience* 19: 4778-4785. Parkash,

- V., Lindholm, P., Peranen, J., Kalkkinen, N., Oksanen, E., Saarma, M., Leppanen, V. y Goldman, A. (2009). "The structure of the conserved neurotrophic factors MANF and CDFN explains why they are bifunctional". *Protein Engineering, Design & Selection* 22: 233-241.
- 5 Parkash, V. (2009). "Los factores neurotróficos y sus receptores". Tesis. Universidad de Helsinki. Helsinki University Press.
- Petrova, PS, Raibekas, A., Pevsner, J., Vigo, N., Anafi, M., Moore, MK, Peaire, AE, Shridhar, V., Smith, DI, Kelly, J., Durocher, Y. y Commissiong, JW (2003). "A new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons". *Journal of Molecular Neuroscience* 20: 173-187.
- 10 Sieving, PA, Caruso, RC, Tao, W. Coleman, H.R., Thompson, D.J.S., Fullmer, K.R. y Bush, R.A. (2006). "Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: Phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants". *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 103: 3896-3901.
- Tadimalla, A., Belmont, PJ, Thuerauf, DJ, Glassy, MS, Martindale, JJ, Gude, N., Sussman, MA y Glembotski, CC (2008). "Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is an ischemia-inducible secreted endoplasmic reticulum stress response protein in the heart". *Circulation Research* 103: 1249-1258.
- 15 Tao, W., Wen, R., Aguirre, GD, Laties, AM (2006). "Cell-Based delivery systems: development of encapsulated cell technology for ophthalmic applications". en GJ Jaffe, P. Ashton (Eds.), "Intraocular drug delivery: principles and clinical applications" (Cap. 8). Taylor & Francis.
- 20 Tao, W. y Wen, R. (2007). "Application of Encapsulated Cell Technology for Retinal Degenerative Diseases". En J. Tombran-Tink & C. J. Barnstable (Eds.), "Ophthalmology Research: Retinal Degenerations: Biology, Diagnostics, and Therapeutics (401-413). Nueva Jersey: Humana Press, Inc.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Universidad de Miami Wen, Rong
- <120> Procedimientos de tratamiento para enfermedades de la retina
- <130> 4681-12
- 25 <150> US 61/495.182
- <151> 09/06/2011
- <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 30 <211> 549
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 594 605 T3

atgaggagga tgtgggccac gcaggggctg gcggtggcgc tggctctgag cgtgctgccg 60
 ggcagccggg cgctgcggcc gggcgactgc gaagtttgta tttcttatct gggaagattt 120
 taccaggacc tcaaagacag agatgtcaca ttctcaccag ccactattga aaacgaactt 180
 ataaagttct gccgggaagc aagaggcaaa gagaatcggg tgtgctacta tatcggggcc 240
 acagatgatg cagccaccaa aatcatcaat gaggtatcaa agcctctggc ccaccacatc 300
 cctgtggaga agatctgtga gaagcttaag aagaaggaca gccagatatg tgagcttaag 360
 tatgacaagc agatcgacct gagcacagtg gacctgaaga agctccgagt taaagagctg 420
 aagaagattc tggatgactg gggggagaca tgcaaaggct gtgcagaaaa gtctgactac 480
 atccggaaga taaatgaact gatgcctaaa tatgccccca aggcagccag tgcacggacc 540
 gattttagtag 549

<210> 2

<211> 564

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

atgtggtgcg cgagcccagt tgctgtggtg gccttttgcg ccgggctttt ggtctctcac 60
 ccggtgctga cgcagggcca ggaggccggg gggcggccag gggccgactg tgaagtatgt 120
 aaagaattct tgaaccgatt ctacaagtca ctgatagaca gaggagttaa cttttcgctg 180
 gacactatag agaaagaatt gatcagtttt tgcttggaaca ccaaaggaaa agaaaaccgc 240
 ctgtgctatt atctaggagc cacaaaagac gcagccacaa agatcctaag tgaagtcact 300
 cgcccaatga gtgtgcatat gcctgcaatg aagatttgtg agaagctgaa gaagttggat 360
 agccagatct gtgagctgaa atatgaaaaa aactggact tggcatcagt tgacctgcgg 420
 aagatgagag tggcagagct gaagcagatc ctgcatagct ggggggagga gtgcagggcc 480
 tgtgcagaaa aaactgacta tgtgaatctc attcaagagc tggcccccaa gtatgcagcg 540
 acacacccca aaacagagct ctga 564

<210> 3

<211> 182

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 594 605 T3

Met Arg Arg Met Trp Ala Thr Gln Gly Leu Ala Val Ala Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Ser Val Leu Pro Gly Ser Arg Ala Leu Arg Pro Gly Asp Cys Glu Val
 20 25 30

Cys Ile Ser Tyr Leu Gly Arg Phe Tyr Gln Asp Leu Lys Asp Arg Asp
 35 40 45

Val Thr Phe Ser Pro Ala Thr Ile Glu Asn Glu Leu Ile Lys Phe Cys
 50 55 60

Arg Glu Ala Arg Gly Lys Glu Asn Arg Leu Cys Tyr Tyr Ile Gly Ala
 65 70 75 80

Thr Asp Asp Ala Ala Thr Lys Ile Ile Asn Glu Val Ser Lys Pro Leu
 85 90 95

Ala His His Ile Pro Val Glu Lys Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Lys
 100 105 110

Asp Ser Gln Ile Cys Glu Leu Lys Tyr Asp Lys Gln Ile Asp Leu Ser
 115 120 125

Thr Val Asp Leu Lys Lys Leu Arg Val Lys Glu Leu Lys Lys Ile Leu
 130 135 140

Asp Asp Trp Gly Glu Thr Cys Lys Gly Cys Ala Glu Lys Ser Asp Tyr
 145 150 155 160

Ile Arg Lys Ile Asn Glu Leu Met Pro Lys Tyr Ala Pro Lys Ala Ala
 165 170 175

Ser Ala Arg Thr Asp Leu
 180

<210> 4

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 594 605 T3

Met Trp Cys Ala Ser Pro Val Ala Val Val Ala Phe Cys Ala Gly Leu
1 5 10 15

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

Pro Gly Ala Asp Cys Glu Val Cys Lys Glu Phe Leu Asn Arg Phe Tyr
35 40 45

Lys Ser Leu Ile Asp Arg Gly Val Asn Phe Ser Leu Asp Thr Ile Glu
50 55 60

Lys Glu Leu Ile Ser Phe Cys Leu Asp Thr Lys Gly Lys Glu Asn Arg
65 70 75 80

Leu Cys Tyr Tyr Leu Gly Ala Thr Lys Asp Ala Ala Thr Lys Ile Leu
85 90 95

Ser Glu Val Thr Arg Pro Met Ser Val His Met Pro Ala Met Lys Ile
100 105 110

Cys Glu Lys Leu Lys Lys Leu Asp Ser Gln Ile Cys Glu Leu Lys Tyr
115 120 125

Glu Lys Thr Leu Asp Leu Ala Ser Val Asp Leu Arg Lys Met Arg Val
130 135 140

Ala Glu Leu Lys Gln Ile Leu His Ser Trp Gly Glu Glu Cys Arg Ala
145 150 155 160

Cys Ala Glu Lys Thr Asp Tyr Val Asn Leu Ile Gln Glu Leu Ala Pro
165 170 175

Lys Tyr Ala Ala Thr His Pro Lys Thr Glu Leu
180 185

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una cantidad eficaz de factor neurotrófico derivados de astrocitos mesencefálicos (MANF), o un fragmento del mismo, para su uso en el tratamiento de un trastorno de la retina seleccionado del grupo que consiste en retinitis pigmentaria, degeneración macular relacionada con la edad y glaucoma, en la que dicho MANF consiste en la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma.
2. Una composición que comprende una cantidad eficaz de factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF), o un fragmento del mismo, para su uso en el tratamiento de un trastorno de la retina seleccionado del grupo que consiste en retinitis pigmentaria, degeneración macular relacionada con la edad, y glaucoma, en la que dicho CDFN consiste en la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma.
- 10 3. La composición para uso de la reivindicación 1, que comprende además una cantidad eficaz de CDFN o un fragmento del mismo.
4. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el trastorno de la retina es retinitis pigmentaria.
- 15 5. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el trastorno de la retina es degeneración macular relacionada con la edad.
6. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el trastorno del a retina es glaucoma.
7. La composición para uso de una cualquiera de reivindicaciones 1-6, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 8. La composición para uso de la reivindicación 7, en la que el portador farmacéuticamente aceptable es una solución salina.
9. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la composición está en una solución acuosa que comprende uno o más excipientes, aditivos, portadores o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables.
- 25 10. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la composición se administra a un ojo de un sujeto con necesidad de la misma.
11. La composición para uso de la reivindicación 10, en la que la composición se administra por inyección intravítrea, inyección intraocular o inyección subretinal.
- 30 12. La composición para uso de la reivindicación 10, en la que la composición se administra a una zona adyacente al ojo.
13. La composición para uso de la reivindicación 10, en la que la composición se administra por administración tópica.
14. La composición para uso de la reivindicación 13, en la que la administración tópica es con una gota ocular, liposomas, o una emulsión.

35

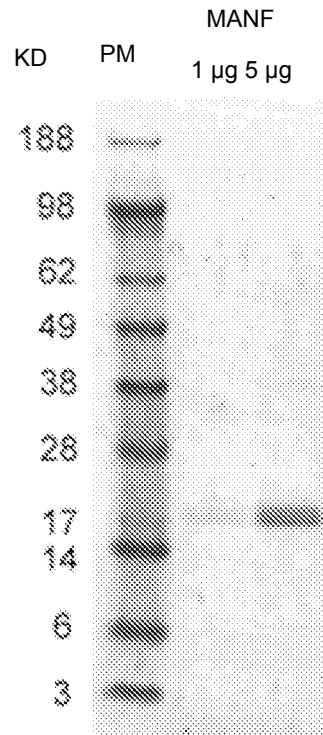


FIGURA 1

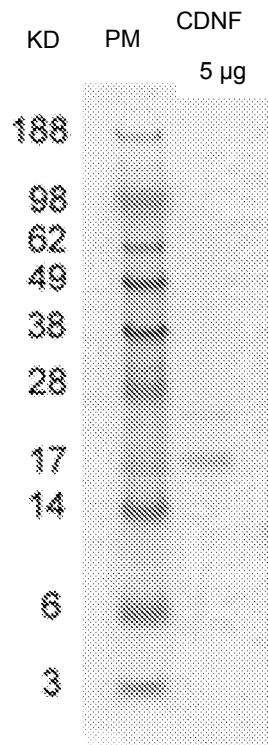


FIGURA 2

FIGURA 3A

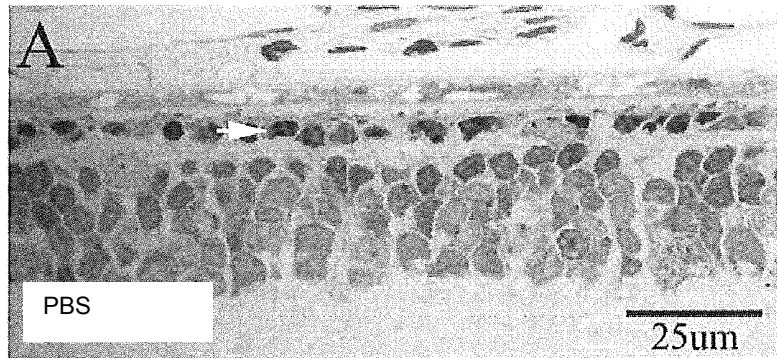


FIGURA 3B

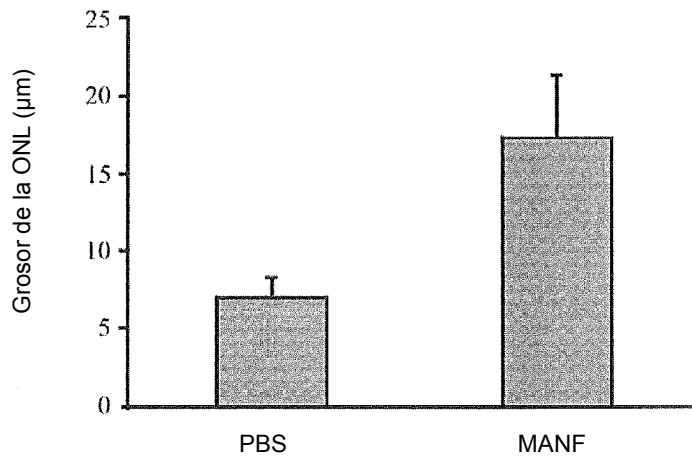
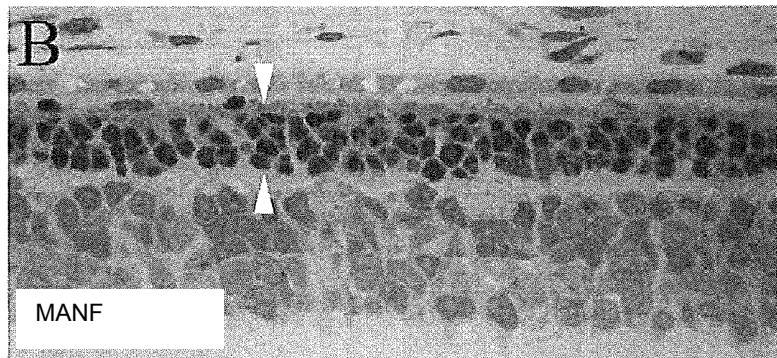


FIGURA 3C

FIGURA 4A

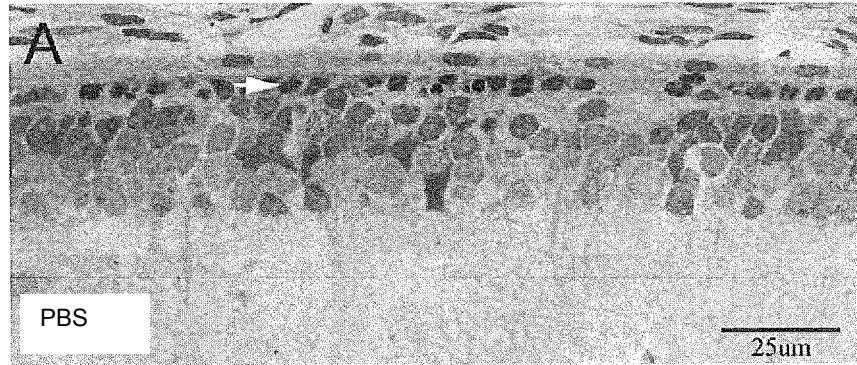


FIGURA 4B

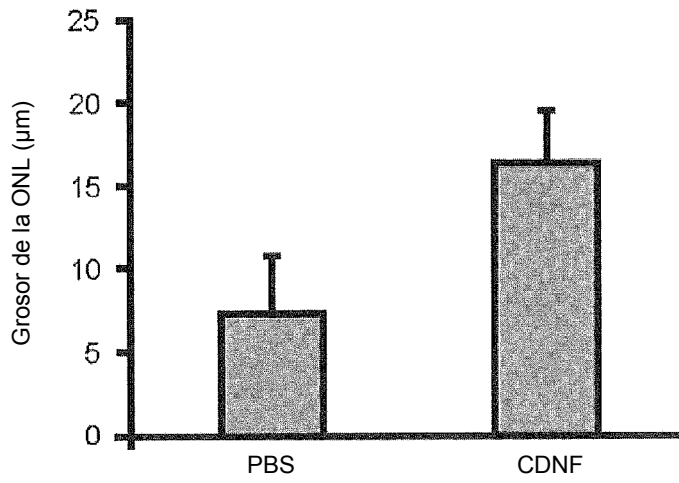
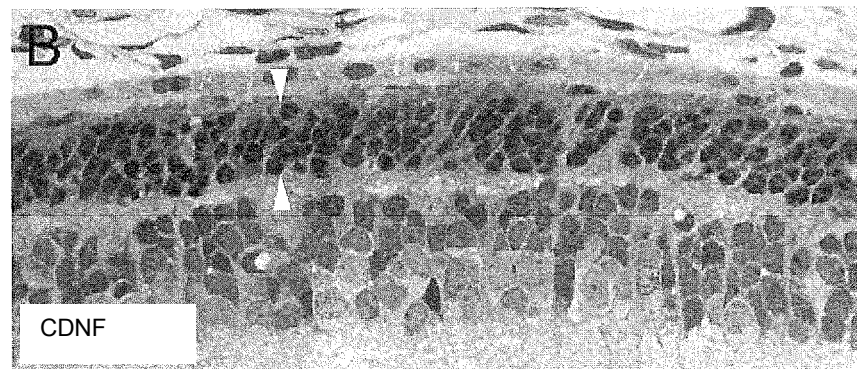


FIGURA 4C

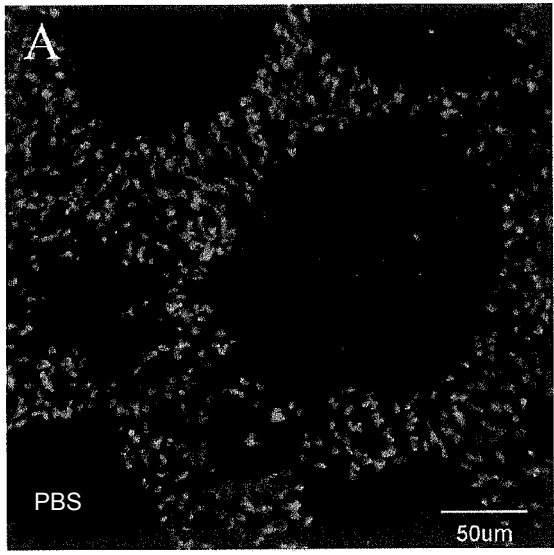


FIGURA 5A

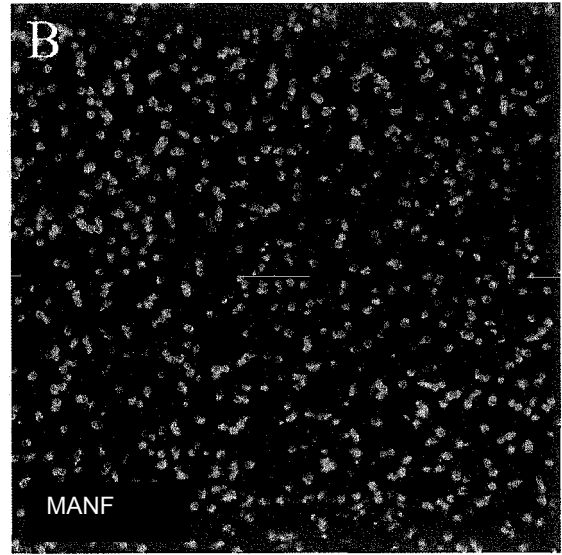


FIGURA 5B

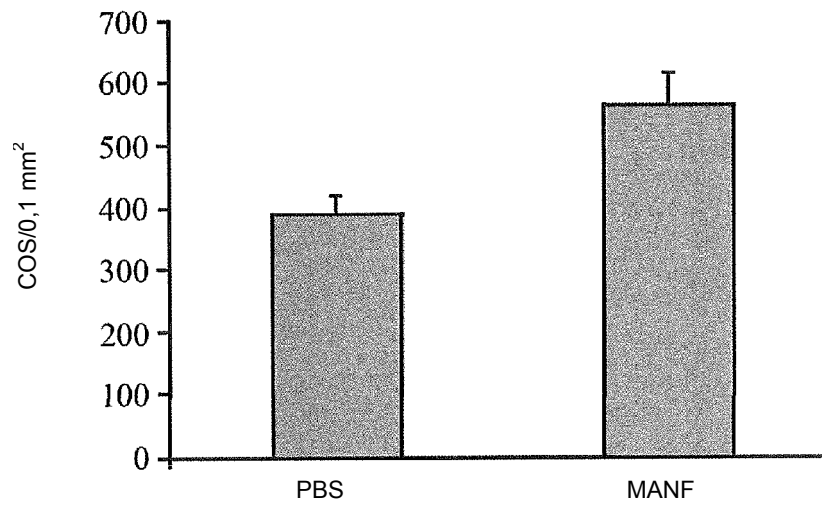


FIGURA 5C

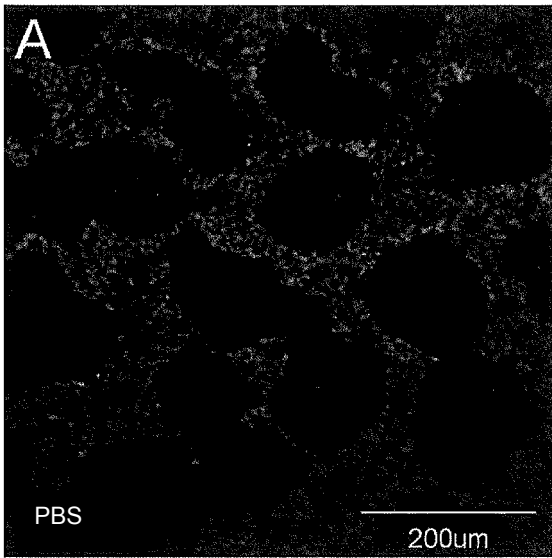


FIGURA 6A

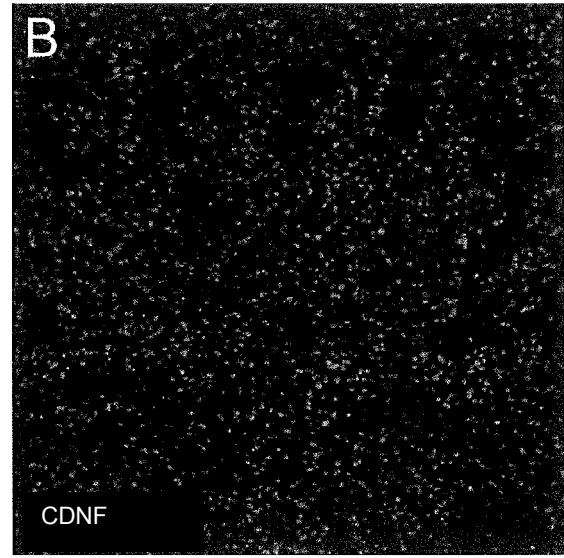


FIGURA 6B

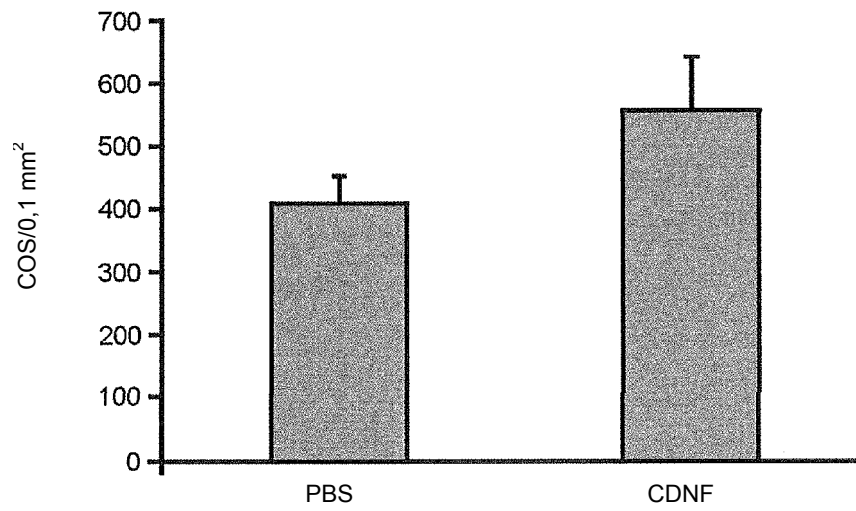


FIGURA 6C

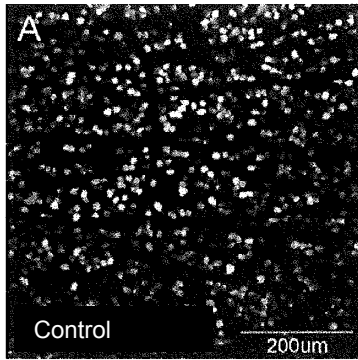


FIGURA 7A

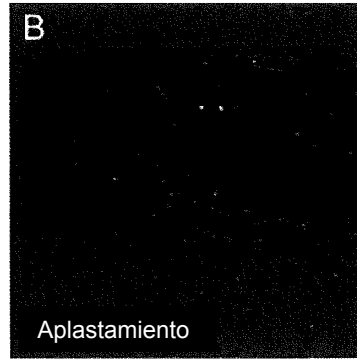


FIGURA 7B

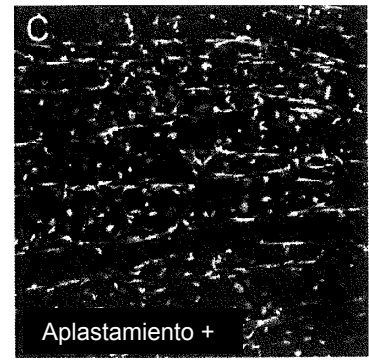


FIGURA 7C

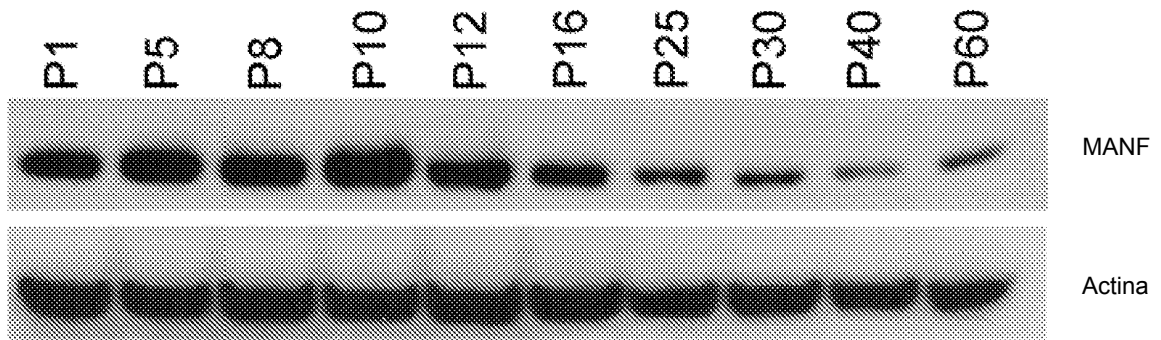


FIGURA 8

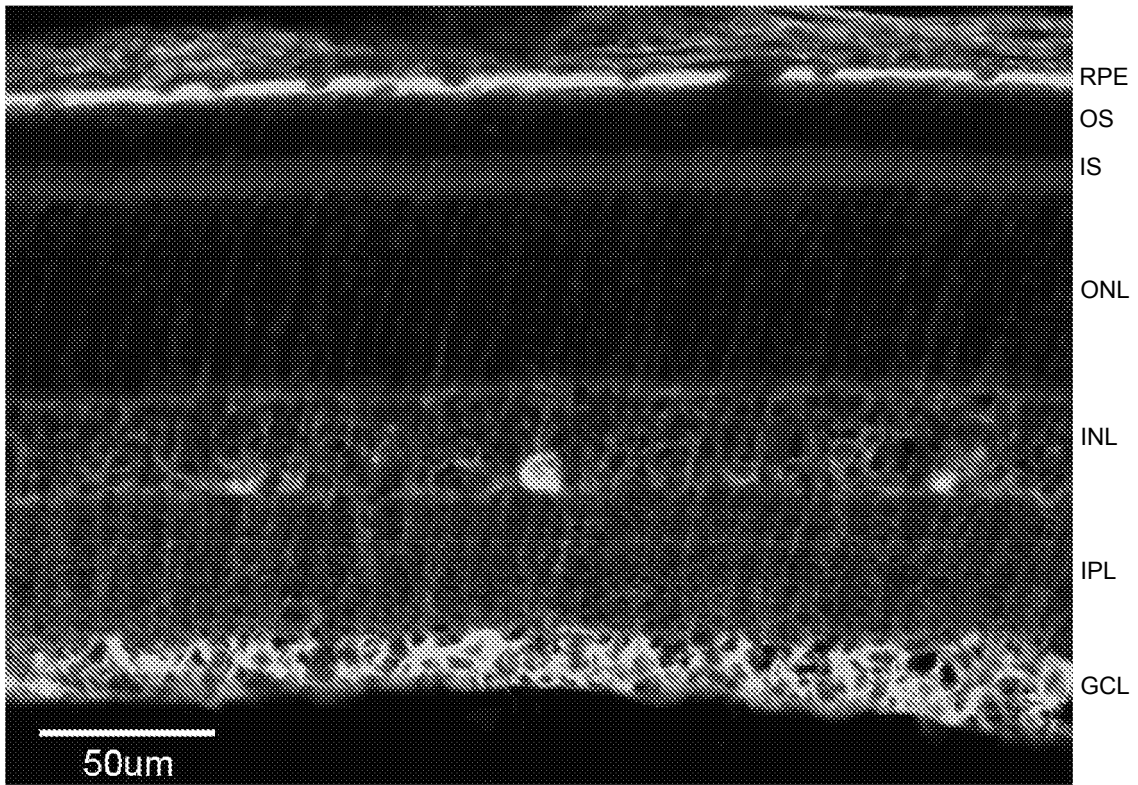


FIGURA 9

ES 2 594 605 T3

SEQ ID NO: 1

```
atgaggagga tgtgggccac gcaggggctg gcggtggcgc tggctctgag cgtgctgccg      60
ggcagccggg cgctgcggcc gggcgactgc gaagtttgta tttcttatct gggaagattt      120
taccaggacc tcaaagacag agatgtcaca ttctcaccag ccactattga aaacgaactt      180
ataaagttct gccggaagc aagaggcaaa gagaatcggg tgtgctacta tatcggggcc      240
acagatgatg cagccaccaa aatcatcaat gaggtatcaa agcctctggc ccaccacatc      300
cctgtggaga agatctgtga gaagcttaag aagaaggaca gccagatatg tgagcttaag      360
tatgacaagc agatcgacct gagcacagtg gacctgaaga agctccgagt taaagagctg      420
aagaagattc tggatgactg gggggagaca tgcaaaggct gtgcagaaaa gtctgactac      480
atccggaaga taaatgaact gatgcctaaa tatgccccca aggcagccag tgcacggacc      540
gatttgtag                                     549
```

FIGURA 10

ES 2 594 605 T3

SEQ ID NO: 2

```
atgtggtgcg cgagcccagt tgctgtggtg gccttttgcg ccgggctttt ggtctctcac      60
ccggtgctga cgcagggcca ggaggccggg gggcgccag gggccgactg tgaagtatgt      120
aaagaattct tgaaccgatt ctacaagtca ctgatagaca gaggagtaa cttttcgctg      180
gacactatag agaaagaatt gatcagtttt tgcttggaca ccaaaggaaa agaaaaccgc      240
ctgtgctatt atctaggagc cacaaaagac gcagccacaa agatcctaag tgaagtcact      300
cgccaatga gtgtgcatat gcctgcaatg aagatttggtg agaagctgaa gaagttggat      360
agccagatct gtgagctgaa atatgaaaaa aactggact tggcatcagt tgacctgcgg      420
aagatgagag tggcagagct gaagcagatc ctgcatagct ggggggagga gtgcagggcc      480
tgtgcagaaa aaactgacta tgtgaatctc attcaagagc tggcccccac gtatgcagcg      540
acacacccca aaacagagct ctga                                             564
```

FIGURA 11

ES 2 594 605 T3

SEQ ID NO: 3

```

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

```

FIGURA 12

ES 2 594 605 T3

SEQ ID NO: 4

```

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

```

FIGURA 13