

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102009901783788A1

Publication Date

20110516

Applicant

HMFRA HUNGARY LIMITED LIABILITY COMPANY

Title

PREPARAZIONI OFTALMICHE A BASE DI BDNF
(NEUROTROPHIC FACTOR) E LORO USO.

8967 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

SB/mc **“PREPARAZIONI OFTALMICHE A BASE DI BDNF (BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR) E LORO USO”**

a nome : **HMFRA HUNGARY LIMITED LIABILITY COMPANY**

con sede in: Budapest (Ungheria)

* * *

Campo tecnico dell'invenzione

La presente invenzione riguarda preparazioni oftalmiche in forma di collirio comprendenti un fattore neurotrofico derivato dal cervello, ovvero BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor).

Tali preparazioni sono utili nella prevenzione e nel trattamento di malattie neurodegenerative della retina, in particolare della degenerazione pigmentosa retinica.

Stato della tecnica

Le neurotrofine sono proteine sintetizzate dalle cellule nervose che controllano la sopravvivenza ed il normale trofismo di differenti cellule presenti nel sistema nervoso.

La più nota è senz'altro il NGF (Nerve Growth Factor) scoperto da R. Levi-Montalcini e S. Cohen intorno alla metà del secolo scorso.

Successivamente sono stati scoperti altri fattori la cui struttura proteica presenta un'omologia strutturale con quella del NGF per cui oggi si parla di famiglia di fattori del NGF (neurotrofine) a cui appartengono oltre al NGF, il BDNF, NT-3, NT4/5, NT-6 (nel sistema nervoso di mammifero sono espressi prevalentemente i primi tre ed è completamente assente il NT-6).

I fattori neurotrofici, comprese le neurotrofine, sono liberati da cellule

nervose che li sintetizzano e si legano a recettori specifici presenti sulla membrana cellulare.

Nonostante l'omologia strutturale le differenti neurotrofine agiscono attraverso recettori differenti e quindi attraverso meccanismi d'azione differenti.

Il legame del fattore neurotrofico al suo recettore specifico (TrkA per NGF; TrkB per BDNF ed in parte per NT-4; TrkC per NT-3) ingenera una cascata di eventi, che determina una risposta specifica della cellula nervosa.

Differenti recettori per le neurotrofine sono espressi in differenti aree e, all'interno della medesima area, in cellule differenti attivando vie intracellulari specifiche di trasduzione del segnale. È quindi logico desumere che non tutte le aree o le cellule nervose sono in grado di rispondere ad ognuna delle quattro neurotrofine; il fattore limitante è rappresentato dalla distribuzione cellulare del recettore specifico per una determinata neurotrofina.

La distribuzione delle cellule retiniche in grado di sintetizzare e liberare il NGF, il capostipite delle neurotrofine, e delle cellule che esprimono il recettore per il NGF (TrkA) appare molto ristretta ed è praticamente limitata ad un sottogruppo di cellule gangliari e di cellule della glia astrocitaria (Garcia et al., 2003).

EP 1 161 256 B1 descrive preparazioni oftalmiche contenenti da 200 a 500 µg/ml di NGF, da somministrare sulla superficie intatta oculare per il trattamento e/o la profilassi di patologie che interessano la sclera, i corpi ciliari, la lente cristallina, la retina, il nervo ottico, il corpo vitreo e/o la coroidea.

In accordo con quanto dimostrato da Lambiase et al., tali preparazioni sono in grado di elevare i livelli retinici di NGF, ma, nonostante ciò, è possibile dimostrare che il NGF non è però in grado di espletare un effetto neuroprotettivo sulla retina.

Come prospettato recentemente da Shi e Collaboratori (2007), bisogna considerare che il NGF è in grado di legarsi a due tipi di recettori presenti a livello della retina, il TrkA ed il P75 che esercitano effetti opposti sul trofismo e sulla sopravvivenza delle cellule nervose. È possibile quindi che il NGF esogeno una volta arrivato alla retina induca due effetti opposti sulle cellule retiniche che tendono ad annullarsi.

Diversamente, il BDNF insieme al suo recettore TrkB è largamente espresso nella retina di mammifero. La retina è composta da numerosi tipi di cellule disposte in differenti strati. In particolare, il BDNF è sintetizzato da alcune cellule gangliari e da cellule amacrine, quali quelle dopaminergiche, presenti nello strato interno della retina (Herzog et al., 1994; Perez e Caminos, 1995; Hallbook et al., 1996; Herzog e von Bartheld, 1998; Karlsson e Hallbook, 1998; Bennett et al., 1999; Pollock e Frost, 2003; Seki et al., 2003; Chytrova e Johnson, 2004).

Il recettore del BDNF, chiamato TrkB, è espresso in numerosi tipi di cellule retiniche incluse le cellule gangliari, le cellule amacrine e le cellule gliali di Muller (Jelsma et al., 1993; Cellerino e Kohler, 1997; Di Polo et al., 2000).

WO 97/45135 si riferisce a composizioni farmaceutiche stabili di BDNF in forma di soluzione acquosa o liofilizzato. Nel documento, in particolare nella sezione dedicata allo stato della tecnica, il BDNF è

menzionato come utile nel trattamento di svariate patologie, tra le quali è citata la retinite pigmentosa. L'unica forma di somministrazione esplicitamente menzionata è quella delle preparazioni iniettabili.

Mentre, WO 2006/046584 è relativo a composizioni a rilascio modificato "sustained-release" contenenti HGF, BDNF o PEDF impregnato con un idrogel gelatina reticolato, utili nel trattare patologie che implicano lesione delle cellule visive, tra le quali ad esempio la degenerazione retinica pigmentosa. Negli esempi specifici le composizioni sono realizzate sotto forma di microsfele contenenti dosi di BDNF comprese tra 0,001-1000 µg e possono essere somministrate per iniezione intraoculare o per impianto subretinico.

EP 0 958 831 descrive composizioni oftalmiche comprendenti un fattore neutrofico, scelto da un gruppo di fattori tra i quali è presente anche il BDNF. Tali composizioni possono essere applicate esternamente, ad esempio sotto forma di soluzioni o unguenti oftalmici, oppure possono anche essere formulate in lenti a contatto.

La concentrazione di fattore neutrofico prevista in EP0958831 varia da 0,0001 a 0,5% (peso/volume) o da 10^{-3} a 2×10^5 µg/l. Gli intervalli di concentrazione riportati risultano pertanto estremamente ampi. Gli unici esempi presenti nel documento sono di composizioni oftalmiche caratterizzate da una concentrazione di BDNF pari a 0,02, 0,04 e 10 µg/l.

Alcuni test sperimentali condotti *in vivo* dimostrerebbero come il BDNF, somministrato attraverso tali composizioni oftalmiche nelle concentrazioni sopra-riportate e per via esterna, non sarebbe in grado di passare dalla superficie oculare ai tessuti interni in quantità apprezzabili e

quindi tali da poter esplicare un effetto terapeutico.

NT-4, l'altra neurotrofina che si lega al TrkB, è espressa ad un basso livello nella retina ed agisce solo su di un sottogruppo di cellule amacrine, quelle che sintetizzano la dopamina (Calamusa et al., 2007).

La mancanza del BDNF o del suo recettore determina gravi alterazioni della funzione retinica; infatti, topi mancanti del recettore TrkB (topi knock out), sono caratterizzati dalla perdita completa della risposta retinica alla luce (assenza totale dell'onda b- dell'elettroretinogramma da flash; Rohrer et al., 1999).

Il gruppo di LaVail e collaboratori ha dimostrato che iniezioni intraoculari di BDNF, ma non di NGF, sono efficaci nel prevenire la degenerazione morfologica dei fotorecettori indotta dalla fotolesione.

Recentemente, è stato messo in discussione che il BDNF sia il responsabile della prevenzione dei danni indotti dalla fotolesione (Harada et al., 2002).

Trattamenti mediante iniezioni intraoculari con BDNF insieme ad altri fattori neurotrofici hanno ridotto il danno delle cellule gangliari della retina che segue a lesione del nervo ottico, sebbene non risulti ancora chiaro se il BDNF sia in grado di esplicare effetti neuroprotettivi da solo, ovvero in maniera indipendente rispetto ad altri fattori neurotrofici (Watanabe et al., 2003; Yata et al., 2007).

Altri fattori neurotrofici quali il FGF2 si sono mostrati parimenti efficaci nel prevenire le alterazioni morfologiche indotte dalla fotolesione, ma a differenza del BDNF la loro somministrazione determina l'attivazione indesiderata di fattori implicati nella risposta infiammatoria (LaVail et al., 1987).

Anche il CNTF, un altro fattore neurotrofico, è capace di prevenire la degenerazione morfologica a seguito di una fotolesione (Lavail et al., 1978); sfortunatamente, esperimenti recenti dimostrano che un trattamento a base di CNTF altera la risposta retinica alla luce determinando quindi una serie di limitazioni al suo potenziale utilizzo terapeutico (McGill et al., 2007).

Questi risultati indicano che ai fini neuroprotettivi nei modelli di patologia retinica non è sufficiente valutare i soli effetti morfologici di molecole neuroattive, ma anche e soprattutto che le stesse molecole esercitino degli effetti protettivi sulla funzione retinica e non risultino dannose per la risposta delle cellule retiniche agli stimoli visivi.

Nonostante la letteratura scientifica riportata suggerisca alcuni effetti del BDNF nella riduzione e/o prevenzione di alcune patologie retiniche, il BDNF non è mai stato proposto come molecola dotata di azione farmacologia neuroprotettiva in vista di un potenziale uso terapeutico. Questo è imputabile principalmente ad una difficoltà d'impiego dovuta all'uso di tecniche invasive per la somministrazione di BDNF in modelli animali di patologie retiniche.

Ad oggi sussiste la necessità di individuare nuove preparazioni di BDNF somministrabili con tecniche non-invasive per veicolare il BDNF alla retina, in modo tale da evitare tecniche di somministrazione come ad esempio mediante iniezioni intraoculari, subretiniche o retrobulbari, ovvero metodi altamente invasivi, che non risultano adatti ad un trattamento cronico prolungato a causa del rischio associato di provocare, ad esempio, la perforazione del bulbo oculare, infezioni o emorragie.

Sommario dell'invenzione

La presente invenzione è relativa a una preparazione oftalmica in

forma di collirio comprendente un fattore neutrofico derivato dal cervello BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor).

Inoltre l'invenzione riguarda l'uso di BDNF per la preparazione di un medicamento in forma di collirio per la prevenzione e/o il trattamento di malattie neurodegenerative della retina, del nervo ottico e del corpo genicolato laterale.

La presente invenzione è relativa anche a una preparazione oftalmica in forma di collirio comprendente BDNF per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento di malattie neurodegenerative della retina, del nervo ottico e del corpo genicolato laterale.

Elenco delle figure

Figura 1. Determinazione dei livelli di BDNF nella retina, nel nervo ottico ed nell'umor vitreo in seguito ad applicazione topica di BDNF in soluzione fisiologica.

Figura 2. Determinazione dei livelli di BDNF nella retina, nel nervo ottico e nell'umor vitreo in seguito ad applicazione topica di BDNF in soluzione con Carbossi-metilcellulosa sodica.

Figura 3. Determinazione dei livelli di BDNF nella retina, nel nervo ottico e nell'umor vitreo in seguito ad applicazione topica di BDNF in soluzione con TSP.

Figura 4. Variazioni relative di BDNF dopo trattamento topico con BDNF in soluzione fisiologica, in soluzione con Carbossi-metilcellulosa sodica, in soluzione con TSP.

Figura 5. Cinetica dei livelli di BDNF nella retina, nel nervo ottico e nell'umor vitreo in seguito ad un'applicazione topica di BDNF in soluzione

con TSP.

Figura 6. Applicazione topica di BDNF in soluzione fisiologica e riduzione significativa dell'alterazione della risposta retinica alla luce indotta da fotolesione.

Figura 7. Effetti del trattamento topico con BDNF in soluzione fisiologica sulla sopravvivenza dei fotorecettori dopo fotolesione.

Figura 8. Applicazione topica di BDNF in soluzione con Carbossi-metilcellulosa sodica e riduzione significativa dell'alterazione della risposta retinica alla luce indotta da fotolesione.

Figura 9. Effetti del trattamento topico con BDNF in soluzione con Carbossi-metilcellulosa sodica sulla sopravvivenza dei fotorecettori dopo fotolesione.

Figura 10. Applicazione topica di BDNF in soluzione con TSP e riduzione significativa dell'alterazione della risposta retinica alla luce indotta da fotolesione.

Figura 11. Effetti del trattamento topico con BDNF in soluzione con TSP sulla sopravvivenza dei fotorecettori dopo fotolesione.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Si è sorprendentemente trovato che attraverso somministrazioni del fattore neurotrofico derivato dal cervello BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) esogeno, applicate topicamente sulla superficie oculare intatta, in particolare a livello del fornice congiuntivale, il BDNF esplica un effetto neuroprotettivo, sia a livello funzionale che morfologico, nei confronti delle cellule della retina permettendo la prevenzione e/o il trattamento delle patologie neurodegenerative retiniche.

Oltre che nei confronti dei fotorecettori, il BDNF ha mostrato un'efficacia neuroprotettiva anche nei confronti delle cellule gangliari, ovvero le cellule dello strato più interno della retina che inviano le loro fibre ai centri visivi, delle fibre del nervo ottico nonché dei centri visivi extra-retinici, quale il corpo genicolato laterale.

La presente invenzione è relativa a una preparazione oftalmica comprendente BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor).

Tale preparazione oftalmica comprende BDNF in una concentrazione che può variare da 1 a 50 µg/µl, preferibilmente da 5 a 30 µg/µl e ancor più preferibilmente da 10 a 15 µg/µl. La dose totale biodisponibile può essere compresa tra 10 e 500 µg.

Il BDNF può essere somministrato da solo o in combinazione con altri principi attivi, quali ad esempio β-bloccanti, prostaglandine e inibitori dell'anidasi carbonica.

La preparazione è realizzata sotto forma di collirio e può essere una soluzione, una sospensione, un gel o un unguento oftalmologico del principio attivo BDNF, o dei principi attivi, in un veicolo farmaceuticamente accettabile compatibile con il principio attivo stesso e tollerato a livello oculare.

Il veicolo farmaceuticamente accettabile può essere una soluzione fisiologica, preferibilmente contenente 0,9% di cloruro di sodio.

Inoltre, si è trovato che la biodisponibilità di BDNF può essere migliorata grazie all'impiego nella preparazione di almeno un ulteriore veicolo farmaceuticamente accettabile che per il suo grado di viscosità consente un passaggio più lento e graduale di BDNF rispetto alla

somministrazione in soluzione fisiologica che viene più rapidamente lavata via dalla congiuntiva.

Tale ulteriore veicolo può essere una soluzione viscosizzata.

Tale soluzione viscosizzata può essere un sostituto lacrimale; una soluzione a base di almeno uno dei seguenti composti: Carbossi-metilcellulosa, Carbopol, Idrossipropilcellulosa, polisaccaridi, e loro derivati; e loro miscele.

Secondo un aspetto preferito, il sostituto lacrimale è a base di TSP, un polisaccaride estratto dai semi della pianta di tamarindo (*Tamarindus Indica*).

Il TSP può variare preferibilmente da 0,05 a 2% (peso/volume - w/v) e ancor più preferibilmente da 0,25 a 0,5% (w/v).

Il TPS è trasparente, viscoelastico, sterile e viene utilizzato per la protezione corneale. Inoltre, il TSP forma sulla superficie oculare un film che persiste a lungo, in grado di lubrificare ed umidificare la cornea e la congiuntiva.

Secondo un altro aspetto preferito, la soluzione viscosizzata comprende Carbossi-metilcellulosa sodica.

La Carbossi-metilcellulosa sodica può variare da 0,01 a 2% (w/v), preferibilmente da 0,2 a 0,4% (w/v). La Carbossi-metilcellulosa sodica è atossica, inerte e caratterizzata da un pH stabile in soluzione. Inoltre, a una concentrazione pari circa all'1% ha un indice di rifrazione simile a quello del liquido lacrimale.

Secondo un ulteriore aspetto preferito, la soluzione viscosizzata può comprendere acido Ialuronico e ancor più preferibilmente acido Ialuronico in combinazione con TSP.

L'acido ialuronico può variare preferibilmente da 0,05 a 0,8% (w/v) e ancor più preferibilmente da 0,2 a 0,4% (w/v).

Secondo una realizzazione preferita, la preparazione può comprendere BDNF in concentrazione pari a 10 µg/µl in una soluzione fisiologica contenente NaCl 0,9%.

Secondo un'altra realizzazione preferita, la preparazione può comprendere BDNF in concentrazione pari a 10 µg/µl in soluzione fisiologica con Carbossi-metilcellulosa sodica allo 0,2%.

Secondo un'ulteriore realizzazione preferita, la preparazione può comprendere BDNF in concentrazione pari a 10 µg/µl in soluzione fisiologica con TSP preferibilmente allo 0,25%.

La preparazione in collirio può essere somministrata topicamente direttamente sulla superficie oculare intatta, ovvero in modo non invasivo tale da evitare l'utilizzo di metodiche invasive, quali ad esempio le iniezioni intraoculari, subretiniche e retrobulbari. In particolare, la somministrazione può essere effettuata a livello del fornice congiuntivale. Inoltre la preparazione può essere formulata come patch oculare o in lenti a contatto.

La retina rappresenta una parte del sistema nervoso centrale parzialmente separata; infatti esistono vari tipi di barriere tra cui quella emato-retinica, che impedisce la diffusione aspecifica di composti, ad esempio molecole di grandi dimensioni, alla retina. La penetrazione intraoculare di composti farmacologicamente attivi applicati per via topica è, infatti, regolata da barriere localizzate nella cornea e nella congiuntiva, dall'assorbimento sistemico e dalla degradazione metabolica ad opera di enzimi presenti in questi tessuti. Una volta instillati, i composti

farmacologicamente attivi devono attraversare un complesso sistema di barriere ematiche, tra cui la barriera emato-retinica, per penetrare nei tessuti sottostanti fino alla retina.

Inoltre, la retina, tramite le cellule gangliari, dalle quali si originano le fibre del nervo ottico, è collegata mediante il nervo ottico stesso ai centri visivi come il Corpo Genicolato Laterale parte dorsale (dLGN).

Come dimostrato nella parte sperimentale, il BDNF somministrato topicamente, secondo l'invenzione, è in grado di essere veicolato fino a raggiungere la retina inducendo un aumento della sua concentrazione retinica fino a raggiungere livelli tali da esplicare effetti neuroprotettivi sia da un punto di vista funzionale che morfologico.

Inoltre, è stato sorprendentemente trovato, come dimostrato mediante evidenza sperimentale, che le cellule gangliari permettono il trasporto anterogrado del BDNF, consentendo al BDNF di prevenire e trattare non solo la degenerazione delle cellule gangliari ma anche delle fibre del nervo ottico nonché l'estensione della patologia ai centri visivi extra-retinici, quali il corpo genicolato laterale.

La presente invenzione riguarda inoltre l'uso di BDNF per la preparazione di un medicamento oftalmico in forma di collirio da somministrare topicamente sulla superficie oculare intatta per la prevenzione e/o il trattamento di malattie neurodegenerative della retina, del nervo ottico e del corpo genicolato laterale, in particolare le retinopatie degenerative (quali ad esempio la Retinite Pigmentosa, il Glaucoma Cronico Semplice), le retinopatie senili (come ad esempio la degenerazione maculare senile), le patologie vascolari e proliferative della retina, il distacco di retina e la

retinopatia del prematuro (ROP) che comportano l'instaurarsi di una cecità. Le preparazioni secondo l'invenzione sono utili per la prevenzione e/o il trattamento di malattie neurodegenerative della retina, del nervo ottico e del corpo genicolato laterale, in particolare ad esempio della Retinite Pigmentosa, del Glaucoma Cronico Semplice (oppure anche Glaucoma Congenito, Glaucoma infantile, Glaucoma giovanile, Glaucoma Cronico Primario ad angolo aperto, Glaucoma Cronico Primario ad angolo chiuso, Glaucoma Acuto, Glaucoma Iatrogeno, Glaucoma Secondario).

Il glaucoma rientra in una serie di patologie progressive che interessano l'occhio e che portano, se non adeguatamente curate, alla cecità a causa della perdita delle cellule gangliari e dell'atrofia progressiva delle fibre del nervo ottico.

Il glaucoma è caratterizzato da un aumento della pressione intraoculare (IOP) che può danneggiare le cellule gangliari e le fibre del nervo ottico sia direttamente (meccanicamente) che in via indiretta inducendo un'ischemia dei vasi retinici che irrorano la retina interna. È inoltre da sottolineare che il glaucoma in una fase progressiva può arrivare ad interessare, oltre alla retina, anche i centri visivi, quali il corpo genicolato laterale, fino a coinvolgere la stessa corteccia visiva.

Quindi, è stato trovato che il trattamento con BDNF in concentrazioni efficaci è in grado non solo di prevenire e ridurre la degenerazione dei fotorecettori indotta da un'esposizione prolungata alla luce (fotolesione) e di preservare la risposta della retina alla luce, ma anche di non alterare le risposte retiniche a stimoli visivi.

Gli esempi di seguito riportati illustrano ulteriormente l'invenzione.

Esempi

1. Esempi di preparazioni

- Preparazione 1 - BDNF in soluzione fisiologica

100 µg di BDNF vengono disciolti in 10 µl di soluzione fisiologica contenente NaCl 0,9%;

- Preparazione 2 - BDNF in soluzione fisiologica con Carbossi-metilcellulosa sodica

100 µg di BDNF vengono disciolti in una soluzione costituita da 5 µl di soluzione fisiologica contenente NaCl 0,9% e 5 µl di Carbossi-metilcellulosa sodica allo 0,4%;

- Preparazione 3 - BDNF in soluzione fisiologica con TSP

100 µg di BDNF sono portati in soluzione in 5 µl di soluzione fisiologica contenente NaCl 0,9% e 5 µl di TSP allo 0,5%.

- Preparazione 4 - BDNF in soluzione fisiologica con acido Ialuronico (0,2%)

100 µg di BDNF sono portati in soluzione in 5 µl di soluzione fisiologica contenente NaCl 0,9% e 5 µl di ac. Ialuronico allo 0,4%.

- Preparazione 5 - BDNF in soluzione fisiologica con acido Ialuronico (0,4%)

100 µg di BDNF sono portati in soluzione in 5 µl di soluzione fisiologica contenente NaCl 0,9% e 5 µl di ac. Ialuronico allo 0,8%.

- Preparazione 6 - BDNF in soluzione fisiologica con acido Ialuronico e con TSP

100 µg di BDNF sono portati in soluzione in 5 µl di soluzione fisiologica contenente NaCl 0,9% e 5 µl di ac. Ialuronico allo 0,4% e TSP allo 0,4%.

- Preparazione 7 - BDNF in soluzione fisiologica con acido Ialuronico e con TSP

100 µg di BDNF sono portati in soluzione in 5 µl di soluzione fisiologica contenente NaCl 0,9% e 5 µl di ac. Ialuronico allo 0,8% e TSP allo 0,4%.

- Preparazione 8 - BDNF in soluzione fisiologica con acido Ialuronico e con TSP

100 µg di BDNF sono portati in soluzione in 5 µl di soluzione fisiologica contenente NaCl 0,9% e 5 µl di ac. Ialuronico allo 0,4% e TSP allo 0,6%.

Saggi biologici

2.1 Esempi

o - Determinazione dei livelli di BDNF nel corpo vitreo, nella retina e nel nervo ottico dopo 6 ore dal trattamento topico dell'occhio con preparazioni a base di BDNF

- Sono state utilizzate le sopra-descritte preparazioni 1, 2 e 3 contenenti BDNF

Il test è stato condotto su ratti albini (ratti Wistar, Harlan, Italia) e il BDNF in soluzione fisiologica, in soluzione fisiologica con Carbossimetilcellulosa sodica o in soluzione fisiologica con TSP è stato applicato topicamente instillato nel fornice congiuntivale di un occhio, mentre l'altro occhio utilizzato come controllo è stato trattato con la soluzione ("placebo") usata per includere e veicolare il BDNF.

- Determinazione dei livelli di BDNF nella retina, nel corpo vitreo e nel nervo ottico

Gli animali sono stati sacrificati a 6 ore dall'applicazione dopo

induzione di un'anestesia profonda mediante iniezione intraperitoneale con uretano (20%). Successivamente, l'occhio è stato estratto ed il BDNF misurato nel corpo vitreo, nell'omogenato di retina e nell'omogenato di nervo ottico sia dell'occhio trattato con BDNF che dell'altro occhio trattato con la sola soluzione usata per veicolare il BDNF (occhio di controllo). Le misurazioni sono state fatte mediante dosaggio immunologico (ELISA; BDNF Emax immunoassay system, Promega, Madison, WI, USA). È stata eseguita la determinazione delle quantità di BDNF anche a livello del nervo ottico per determinare se il BDNF introdotto dall'esterno mediante applicazione topica fosse captato e trasportato dalle cellule retiniche, in particolare dalle cellule gangliari della retina che con le loro fibre formano il nervo ottico.

I risultati riportati nel grafico in Fig. 1 sono stati ottenuti con una applicazione topica di BDNF in soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) e sono espressi in valori medi di concentrazione di BDNF nella retina (A), nel nervo ottico (B) e nell'umor vitreo (C) espressi in pg/mg di proteina.

La statistica è stata effettuata mediante t-test di *Student* confrontando l'occhio tratto con BDNF con quello di controllo: in tutti casi le differenze tra occhio trattato e quello di controllo sono risultate significative (*, $p < 0,05$).

Nei grafici in Fig. 2, i risultati si riferiscono ad una applicazione topica di BDNF in soluzione con Carbossi-metilcellulosa sodica (0,2%), mentre i risultati nei grafici in Fig. 3 sono stati ottenuti con una applicazione topica di BDNF in soluzione con TSP (0,25%); in entrambi i casi la statistica è stata effettuata mediante t-test di *Student* confrontando l'occhio tratto con BDNF con quello di controllo: in tutti casi le differenze tra occhio trattato e occhio di controllo sono risultate significative (*, $p < 0,05$).

Confrontando le figure 1, 2, 3 emerge che tutte e tre le soluzioni usate sono risultate efficaci nel facilitare il passaggio trans-sclerale del BDNF alla retina.

Nella Fig. 4 i risultati sono espressi in valori relativi (rapporto tra il livello di BDNF nell'occhio trattato topicamente ed il livello di BDNF misurato nell'occhio di controllo) per ogni tipo di trattamento; questa analisi rende più agevole paragonare l'efficacia delle differenti soluzioni (10 µl di soluzione contenente 100 µg di BDNF) usate per veicolare il BDNF. Il passaggio trans-sclerale del BDNF nella retina, nel nervo ottico e nell'umor vitreo è risultato differente, risultando più elevato per il BDNF in soluzione con TSP (Fig. 4C). La Carbossi-metilcellulosa sodica (Fig. 4B) è risultata meno efficace. Anche la soluzione fisiologica (Fig. 4A) si è dimostrata efficace nel veicolare il BDNF alla retina. Il BDNF in soluzione fisiologica applicato topicamente nel fornice congiuntivale induce un aumento del BDNF nella retina di sei volte superiore rispetto al livello dell'occhio di controllo, dimostrando che il BDNF è capace di passare le barriere anatomo-funzionali e di raggiungere la retina. Le differenze tra occhi trattati e occhi di controllo nella retina, nel nervo ottico e nell'umor vitreo sono risultate significative (*, $p < 0,05$).

2.2 Esempio - Determinazione dei livelli di BDNF nella retina, nell'umor vitreo e nel nervo ottico a differenti tempi dal trattamento topico dell'occhio con BDNF

È stato studiato quanto il BDNF rimanesse elevato nella retina, nell'umor vitreo e nel nervo ottico in seguito ad un'unica applicazione topica a livello del fornice congiuntivale. Per condurre questo studio è stato

utilizzato il veicolo contenente TSP, che si è dimostrato un ottimo veicolo capace di permettere il passaggio trans-sclerale del BDNF alla retina, al nervo ottico ed all'umor vitreo. Utilizzando il TSP è stata quindi studiata la cinetica dei livelli di BDNF nella retina, nel nervo ottico e nell'umor vitreo dopo trattamento topico dell'occhio. Per ogni gruppo sperimentale sono stati trattati N=5 occhi. È stata misurata la concentrazione di BDNF nella retina, nel nervo ottico e nell'umor vitreo a differenti intervalli di tempo dopo l'applicazione di una soluzione allo 0,25% di TSP contenente BDNF (10 µl di una soluzione contenente 100 µg di BDNF). L'occhio di controllo è stato trattato con la sola soluzione veicolo contenente TSP allo 0,25%. Questo esperimento è stato eseguito per determinare l'andamento temporale dei livelli di BDNF in seguito ad una singola applicazione topica. Nei grafici sono stati riportati i valori medi di BDNF (asse delle ordinate; pg/ml) a livello della retina, del nervo ottico e dell'umor vitreo a distanza di 6, 12 e 24 ore dall'applicazione. Nella Fig. 5 si può notare che i livelli di BDNF nella retina, nel nervo ottico e nell'umor vitreo ritornano a livello basale nel giro di 12 ore dall'applicazione topica a livello congiuntivale. La statistica è stata effettuata con t-test: in A *, $p < 0,01$ rispetto all'occhio di controllo. I risultati di questo esperimento suggeriscono che in trattamenti prolungati con BDNF, veicolato con un sostituto lacrimale, in particolare a base di TSP, è sufficiente un'applicazione topica ogni 12 ore per mantenere elevati i livelli di BDNF nella retina.

2.3 Esempio - Effetti neuroprotettivi dell'applicazione topica di preparazioni a base di BDNF

Per verificare gli effetti neuroprotettivi del BDNF, dopo trattamento per applicazione topica a livello del fornice congiuntivale, in modelli animali

è stato utilizzato un modello sperimentale in cui la degenerazione retinica è indotta da un danno da luce (fotolesione); tale modello è particolarmente utilizzato per studiare la degenerazione dei fotorecettori retinici indotta da un'esposizione prolungata ad una sorgente luminosa di forte intensità (Lavail et al., 1987; Rex et al., 2003). La morte dei fotorecettori avviene per apoptosi ed è causata da un eccessivo assorbimento di fotoni da parte del pigmento visivo rodopsina con conseguente alterazione del ciclo di rigenerazione del pigmento che arriva a coinvolgere anche le cellule dell'epitelio pigmentato. Il modello sperimentale animale sottoposto ad indagine sperimentale è il ratto albino (Surace et al., 2005), vista la spiccata sensibilità dei suoi fotorecettori alla luce. È stato utilizzato un protocollo sperimentale modificato (Rex et al., 2003) ed ampliato rispetto a quello originariamente proposto dal gruppo di LaVail e collaboratori (LaVail et al., 1987).

Sono state utilizzate le seguenti preparazioni a base di BDNF:

- a) BDNF in soluzione fisiologica (NaCl 0,9% - 10 µl di una soluzione contenente 100 µg di BDNF),
- b) BDNF in soluzione di Carbossi-metilcellulosa sodica allo 0,2% (10 µl di una soluzione contenente 100 µg di BDNF),
- c) BDNF in soluzione di TSP allo 0,25% (10 µl di una soluzione contenente 100 µg di BDNF).

Sono stati trattati gli occhi di ratti con le preparazioni sopra-elencate e i ratti sono stati sottoposti a fotolesione. Gli occhi di controllo sono stati trattati con la sola soluzione veicolo. Per ogni gruppo sperimentale sono stati trattati N=4 occhi. In particolare, questi ratti dopo 6 ore dal trattamento (occhio trattato con BDNF ed occhio di controllo trattato con la sola soluzione

veicolo) sono stati sottoposti ad esposizione prolungata alla luce per 48 ore (modello animale della fotolesione, sorgente di intensità luminosa pari a 1000 lux), questa foto-esposizione prolungata induce la degenerazione della gran parte dei fotorecettori nella retina di ratti albi. La neuroprotezione esercitata dal BDNF è stata verificata mediante metodi morfologici, atti a valutare la sopravvivenza dei fotorecettori, e funzionali, registrando la risposta retinica alla luce (elettroretinogramma, ERG, da flash abitualmente utilizzato per valutare lo stato funzionale della retina esterna in pazienti affetti da patologie retiniche). Considerata la ridotta presenza di coni nel ratto, alla base della risposta ERG in condizioni fotopiche, e la ridotta ampiezza dell'ERG in condizioni fotopiche nel ratto albino, si è registrato solo l'ERG da flash in condizioni di adattamento scotopico, espressione della risposta dei bastoncelli di cui è in gran parte composta la retina di ratto. L'ERG da flash (scotopico) è stato registrato 7 giorni dopo la fine del periodo di fotolesione.

- Preparazione a)

Nella Fig. 6 è riportata l'ampiezza dell'onda b- dell'ERG da flash in funzione della luminanza. Come risulta evidente nel grafico riportato nella Fig. 6, il BDNF in soluzione fisiologica applicato topicamente è in grado di ridurre significativamente gli effetti della fotolesione sulla risposta retinica alla luce. Infatti, le ampiezze (valori medi di ampiezza espressi in μV) dell'occhio trattato con BDNF sono significativamente maggiori di quelle dell'occhio di controllo, *, $p < 0,05$ (ANOVA ad una via).

- Preparazione b)

A distanza di 7 giorni dalla fotolesione i ratti sono stati anestetizzati e sottoposti alla registrazione dell'ERG da flash. Nella Fig. 8 sono riportate le

ampiezze dell'onda b- in funzione della luminanza in condizioni di adattamento scotopico. I risultati indicano che anche il BDNF in presenza di Carbossi-metilcellulosa sodica è in grado di esercitare una riduzione delle alterazioni indotte dalla fotolesione sulla risposta della retina alla luce (ERG da flash); le ampiezze dell'onda b- negli occhi di ratti fotolesi trattati con BDNF sono risultate aumentate rispetto a quelle registrate dall'occhio di controllo, sebbene tale differenza sia risultata significativa solo alle luminanze più alte. Infatti, le ampiezze (valori medi di ampiezza espressi in μV) dell'occhio trattato con BDNF sono significativamente maggiori di quelle dell'occhio di controllo, *, $p < 0,05$ (ANOVA ad una via) solo ai valori più alti di luminanza.

- Preparazione c)

Dopo essere stati sottoposti a fotolesione, a distanza di 7 giorni, i ratti sono stati anestetizzati e sottoposti alla registrazione dell'ERG da flash. Nella Fig. 10 è riportata l'ampiezza dell'onda b- in funzione della luminanza in condizioni di adattamento al buio. Dalla figura risulta evidente il miglioramento della risposta alla luce degli occhi fotolesi e trattati mediante applicazione topica di BDNF in presenza di TSP.

Infatti, le ampiezze (valori medi di ampiezza espressi in μV) dell'occhio trattato con BDNF sono significativamente maggiori di quelle dell'occhio di controllo, *, $p < 0,05$ (ANOVA ad una via).

Successivamente, nelle retine degli occhi da cui si è registrato l'ERG da flash sono stati valutati gli effetti del trattamento topico con le preparazioni a base di BDNF sopra-elencate sulla degenerazione dei fotorecettori retinici.

Sono stati quantificati gli effetti del trattamento topico con BDNF sulla degenerazione dei fotorecettori contando sia le file dei fotorecettori sopravvissuti alla fotolesione che lo spessore della retina esterna (ONL) che contiene i corpi cellulari dei fotorecettori. Tali misure sono state effettuate con marcatura dei nuclei dei fotorecettori mediante Propidium Iodide.

- Preparazione a)

I risultati ottenuti sono riportati nella Fig. 7. La Figura 7A riporta le sezioni di retina di occhio trattato con BDNF (in soluzione fisiologica) e di occhio di controllo. Indipendentemente dal metodo usato (conta delle file dei corpi cellulari dei fotorecettori (Fig. 7B) o dello spessore dello strato esterno ONL (Fig. 7C)) risulta evidente che i fotorecettori presenti nella retina centrale e periferica sono mantenuti significativamente (*, $p < 0,001$) più numerosi nell'occhio trattato con BDNF rispetto all'occhio trattato con veicolo.

È stato quindi dimostrato che il BDNF in soluzione fisiologica applicato topicamente a livello del fornice congiuntivale è in grado di essere non solo internalizzato e di raggiungere la retina, ma anche di proteggere la retina dalla fotolesione e di ripristinare la risposta dell'ERG da flash.

- Preparazione b)

Nella Fig. 9A sono riportate le sezioni di retina di occhio destro trattato con BDNF (in soluzione di Carbossi-metilcellulosa sodica) e di occhio sinistro di controllo. Sono stati quantificati gli effetti del trattamento topico con BDNF sulla degenerazione dei fotorecettori contando le file dei corpi cellulari dei fotorecettori sopravvissuti alla fotolesione (Fig. 9B) o misurando

lo spessore della retina esterna (ONL) che contiene i corpi cellulari dei fotorecettori (Fig. 9C). Le differenze tra le retine dell'occhio trattato e quelle dell'occhio di controllo (conta delle file di fotorecettori o dello spessore del ONL) sono risultate significative sia a livello della retina centrale che periferica (*, $p < 0,001$).

Il trattamento topico con BDNF in Carbossi-metilcellulosa sodica è in grado di incrementare il numero di fotorecettori che sopravvivono alla fotolesione nell'occhio trattato rispetto all'occhio di controllo.

- Preparazione c)

Sono stati infine quantificati gli effetti del trattamento topico con BDNF (in TSP 0,25%) sulla degenerazione dei fotorecettori misurando sia le file dei corpi cellulari dei fotorecettori sopravvissuti alla fotolesione (Fig. 11B) che lo spessore della retina esterna (ONL) che contiene i corpi cellulari dei fotorecettori (Fig. 11C).

Tali misure sono state effettuate con marcatura dei nuclei dei fotorecettori mediante Propidium Iodide. La Fig. 11A riporta le sezioni di retina di occhio trattato con BDNF e di occhio di controllo.

Indipendentemente dal metodo usato (conta delle file di fotorecettori o dello spessore del ONL) i risultati sono stati concordi nell'indicare che fotorecettori presenti nella retina centrale e periferica erano significativamente (*, $p < 0,001$) più numerosi nell'occhio fotoleso e trattato con BDNF in TSP rispetto all'occhio trattato con il solo veicolo.

Si è, quindi, verificato che il trattamento con BDNF non inducesse alterazioni funzionali della retina compromettendo la sua risposta agli stimoli visivi.

RIVENDICAZIONI

1. Preparazione oftalmica in forma di collirio comprendente un fattore neutrofico derivato dal cervello BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor).
2. Preparazione oftalmica secondo la rivendicazione 1, in cui BDNF varia da 1 a 50 µg/µl.
3. Preparazione oftalmica secondo la rivendicazione 1 o 2, comprendente inoltre una soluzione fisiologica come veicolo farmaceuticamente accettabile.
4. Preparazione oftalmica secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la soluzione fisiologica contiene 0,9% di cloruro di sodio.
5. Preparazione oftalmica secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, comprendente inoltre una soluzione viscosizzata come ulteriore veicolo farmaceuticamente accettabile.
6. Preparazione oftalmica secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la soluzione viscosizzata è scelta dal gruppo consistente in un sostituto lacrimale; una soluzione comprendente almeno un composto scelto tra Carbossi-metilcellulosa, Carbopol, Idrossipropilcellulosa, polisaccaridi, e loro derivati; e loro miscele.
7. Preparazione oftalmica secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui il sostituto lacrimale è a base di un polisaccaride estratto da semi della pianta di tamarindo (TSP).
8. Preparazione oftalmica secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui TSP varia da 0,05 a 2%w/v.
9. Preparazione oftalmica secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la soluzione viscosizzata comprende Carbossi-

metilcellulosa sodica.

10. Preparazione oftalmica secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la Carbossi-metilcellulosa sodica varia da 0,01 a 2%w/v.

11. Preparazione oftalmica secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui il polisaccaride è acido Ialuronico.

12. Preparazione oftalmica secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui l'acido Ialuronico varia da 0,05 a 0,8%w/v.

13. Preparazione oftalmica secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui la soluzione viscosizzata comprende TSP e acido Ialuronico.

14. Preparazione oftalmica in forma di collirio comprendente BDNF per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento di malattie neurodegenerative della retina, del nervo ottico e del corpo genicolato laterale.

15. Uso di BDNF per la preparazione di un medicamento in forma di collirio per la prevenzione e/o il trattamento di malattie neurodegenerative della retina, del nervo ottico e del corpo genicolato laterale.

16. Uso secondo la rivendicazione 15, per la prevenzione e/o il trattamento della retinite pigmentosa.

17. Uso secondo la rivendicazione 15, per la prevenzione e/o il trattamento del glaucoma cronico semplice.

Milano, 16 novembre 2009

CLAIMS

1. Ophthalmic preparation in the form of eyedrops comprising a Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF).
2. Ophthalmic preparation according to claim 1, wherein BDNF ranges from 1 to 50 µg/µl.
3. Ophthalmic preparation according to claim 1 or 2, further comprising a physiological solution as pharmaceutically acceptable carrier.
4. Ophthalmic preparation according to any one of the previous claims, wherein the physiological solution contains 0.9% of sodium chloride.
5. Ophthalmic preparation according to any one of the previous claims, further comprising a viscosized solution as further pharmaceutically acceptable carrier.
6. Ophthalmic preparation according to any one of the previous claims, wherein the viscosized solution is selected from the group consisting of a tear substitute; a solution comprising at least one compound selected from Carboxy-methylcellulose, Carbopol, Hydroxypropylcellulose, polysaccharides, and their derivatives; and mixtures thereof.
7. Ophthalmic preparation according to any one of the previous claims, wherein the tear substitute is based on a polysaccharide extracted from seeds of Tamarind (TSP).
8. Ophthalmic preparation according to any one of the previous claims, wherein TSP ranges from 0.05 to 2%w/v.
9. Ophthalmic preparation according to any one of the previous claims, wherein the viscosized solution comprises sodium Carboxy-methylcellulose.
10. Ophthalmic preparation according to any one of the previous claims,

wherein the sodium Carboxy-methylcellulose ranges from 0.01 to 2%w/v.

11. Ophthalmic preparation according to any one of the previous claims, wherein the polysaccharide is hyaluronic acid.

12. Ophthalmic preparation according to any one of the previous claims, wherein the hyaluronic acid ranges from 0.05 to 0.8%w/v.

13. Ophthalmic preparation according to any one of the previous claims, wherein the viscosized solution comprises TSP e hyaluronic acid.

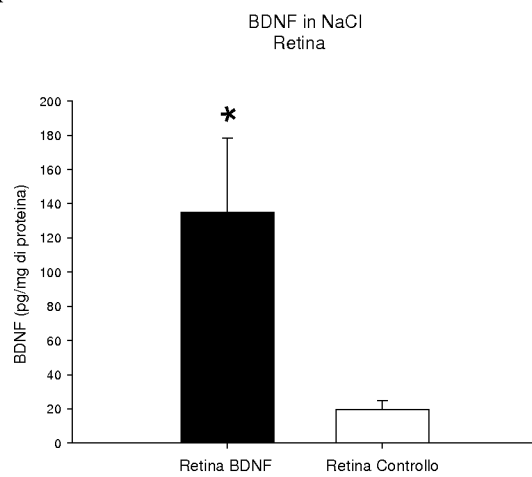
14. Ophthalmic preparation in the form of eyedrops comprising BDNF for use in prevention and/or treatment of neurodegenerative diseases of retina, optic nerve and lateral geniculate body.

15. Use of BDNF for the manufacture of a medicament in the form of eyedrops for prevention and/or treatment of neurodegenerative diseases of retina, optic nerve and lateral geniculate body.

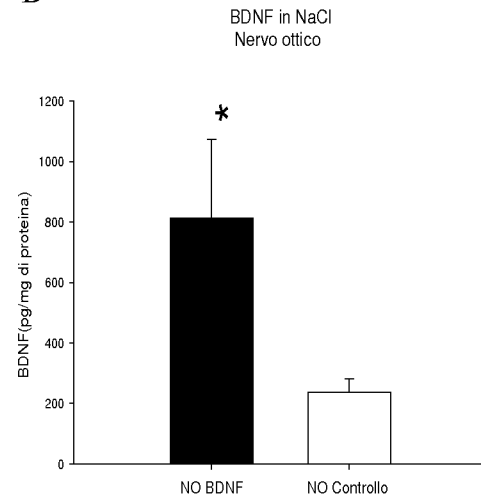
16. Use according to claim 15, for prevention and/or treatment of retinitis pigmentosa.

17. Use according to claim 15, for prevention and/or treatment of chronic simple glaucoma.

A

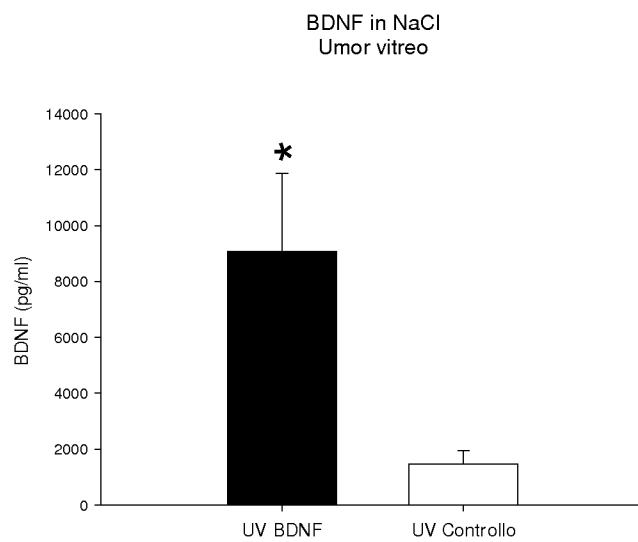


B



NO = Nervo Ottico

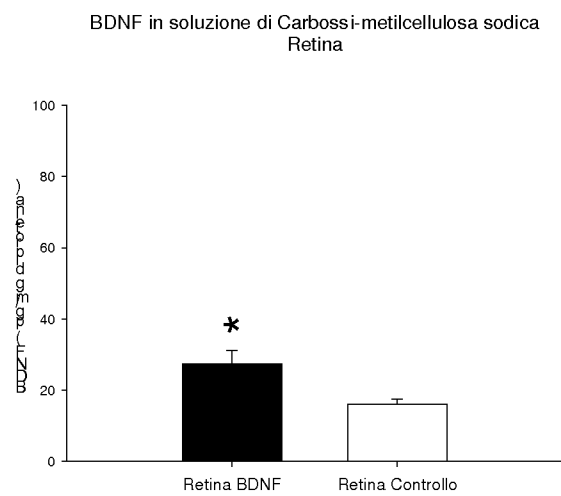
C



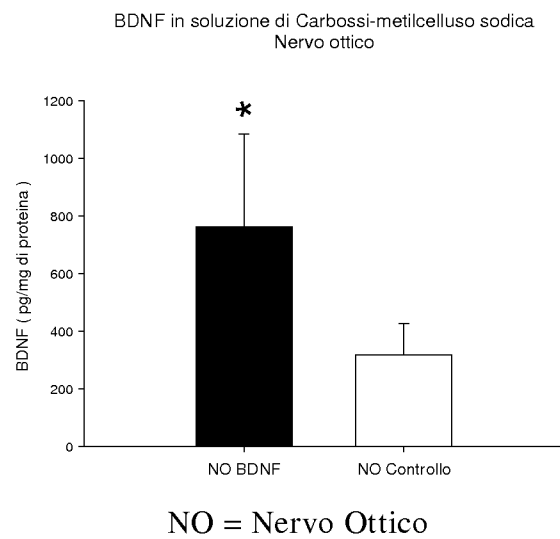
UV = Umore Vitreo

Figura 1

A



B



C

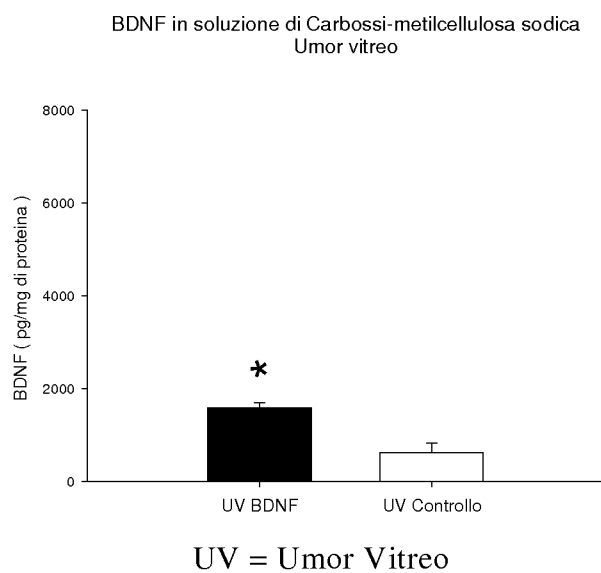
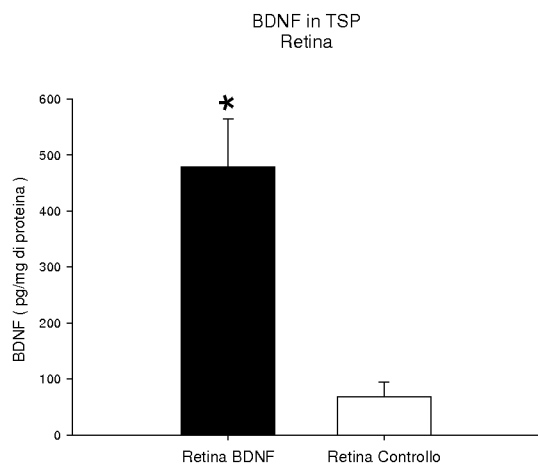
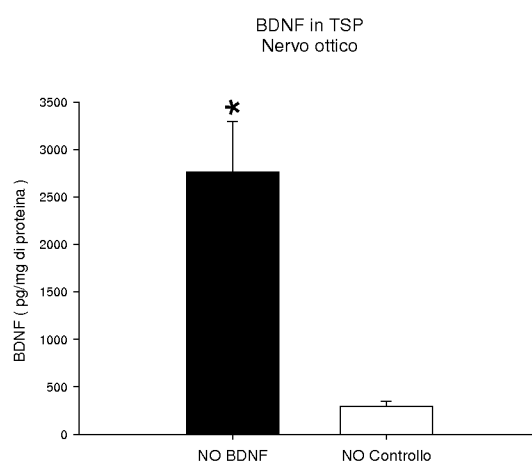


Figura 2

A

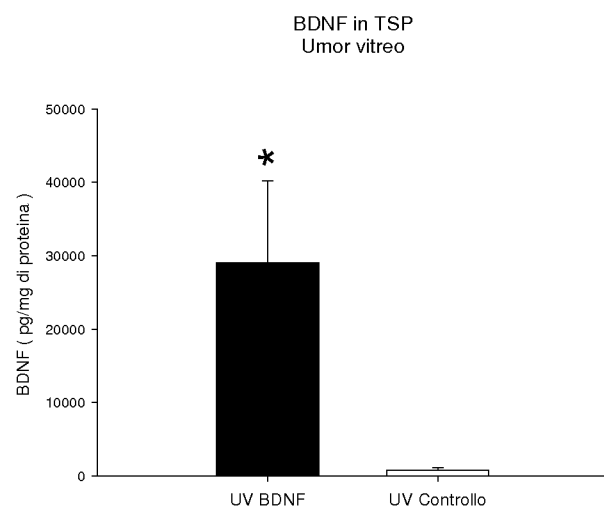


B



NO = Nervo Ottico

C

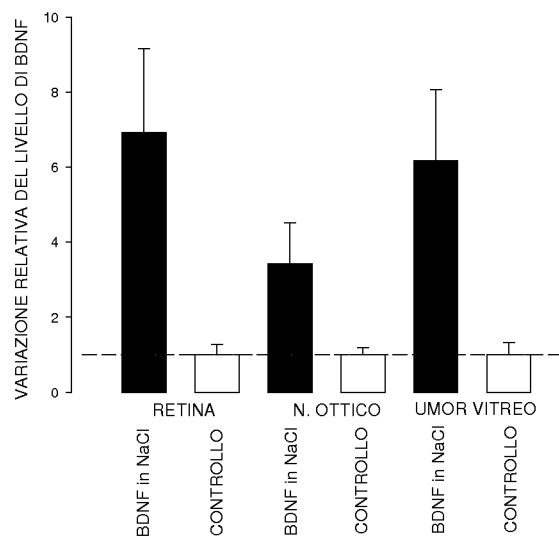


UV = Umor Vitreo

Figura 3

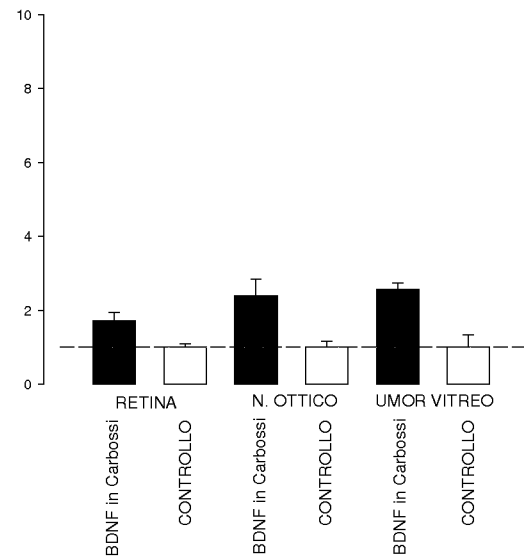
A

BDNF in soluzione fisiologica



B

BDNF in soluzione di Carbossi-metilcellulosa sodica



C

BDNF in TSP

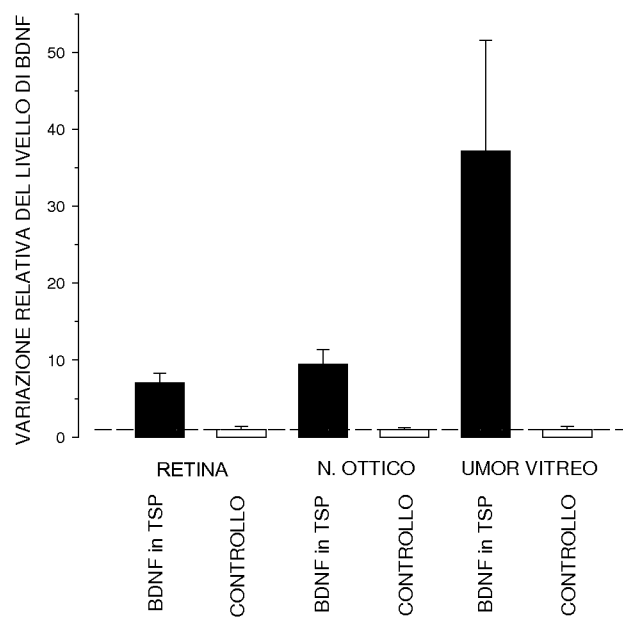


Figura 4

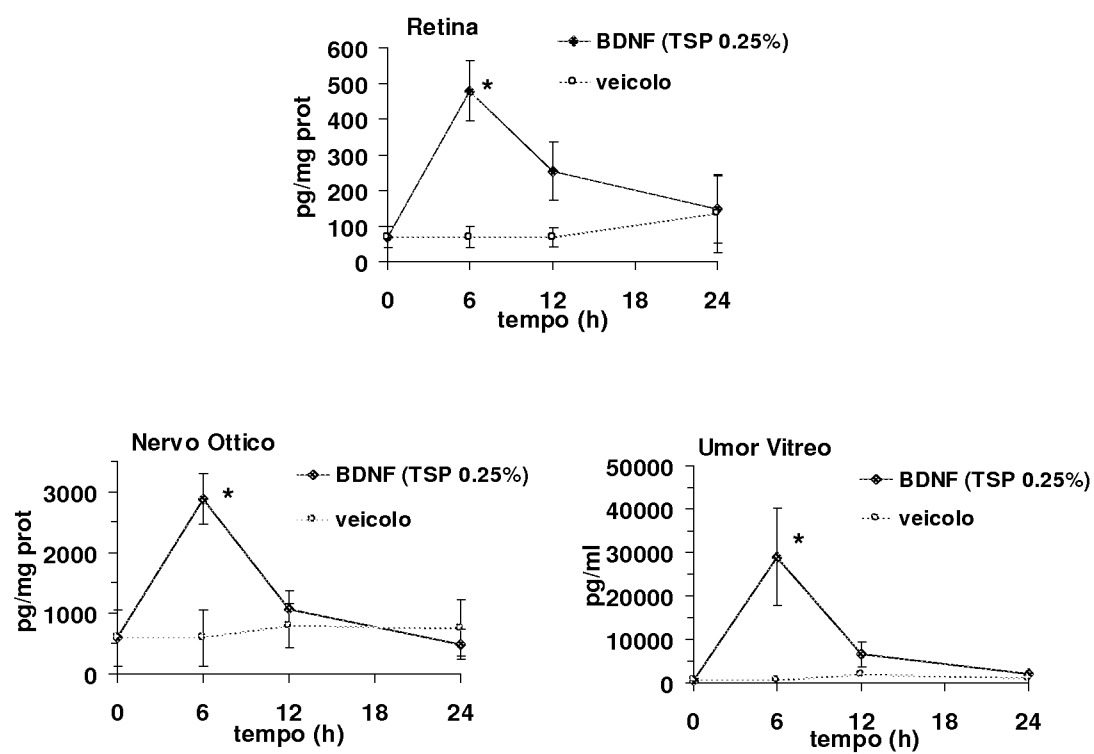


Figura 5

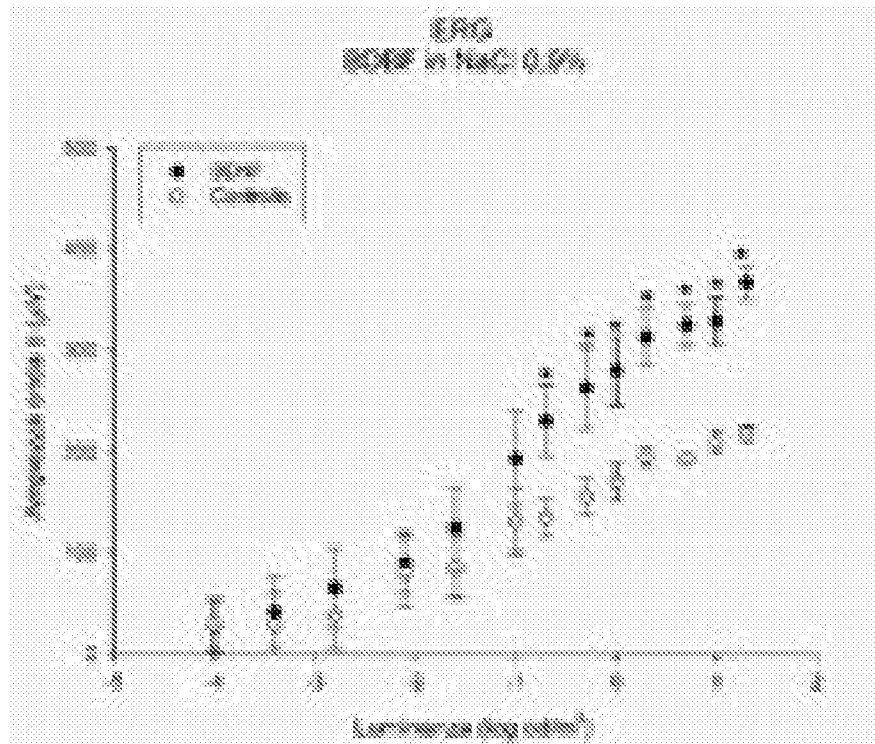
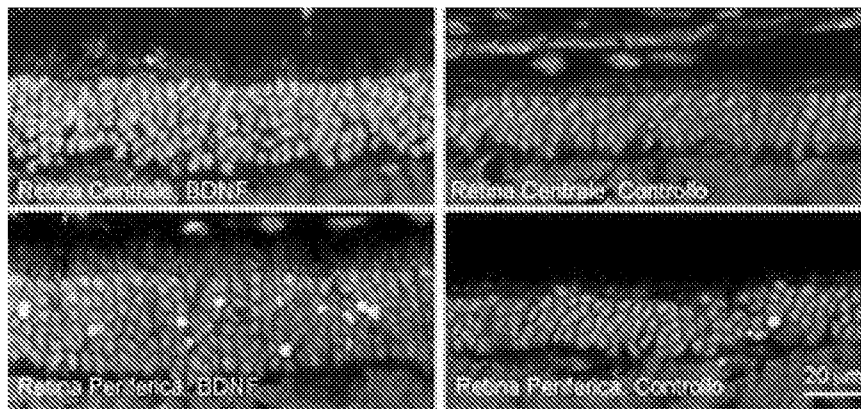
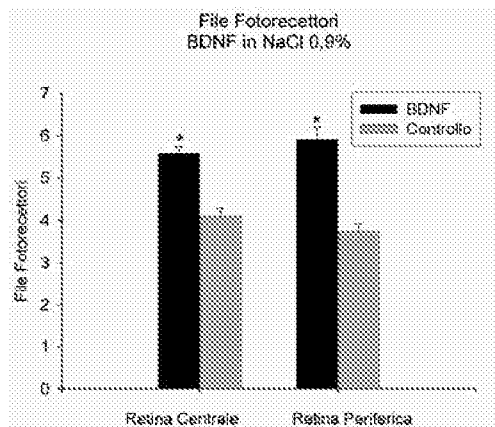


Figura 6

A



B



C

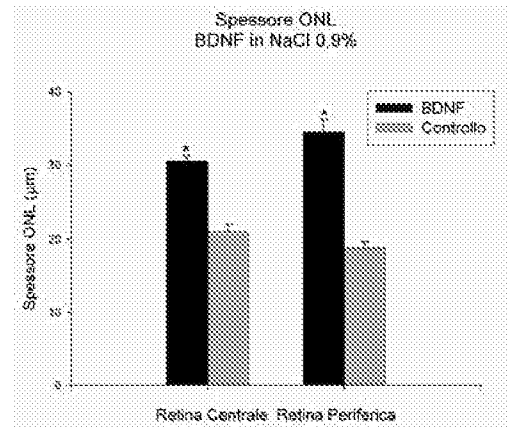


Figura 7

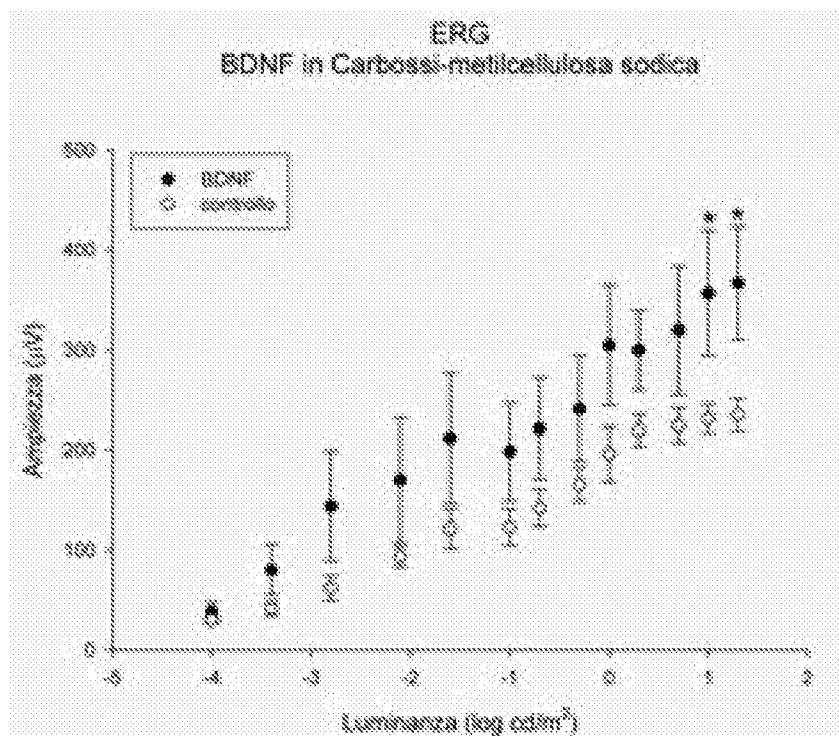
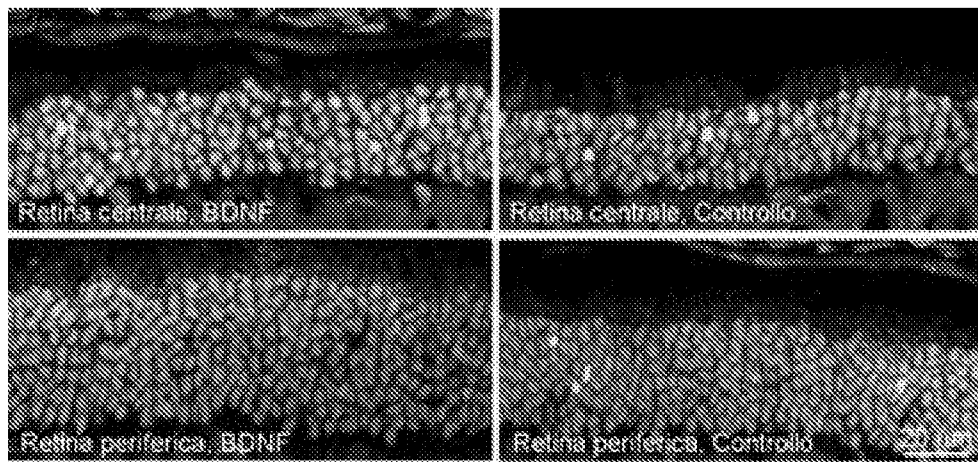
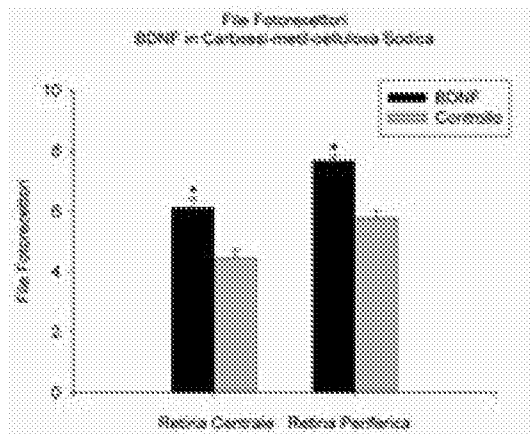


Figura 8

A



B



C

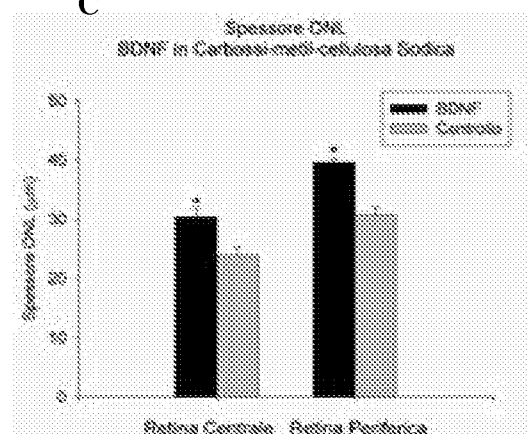


Figura 9

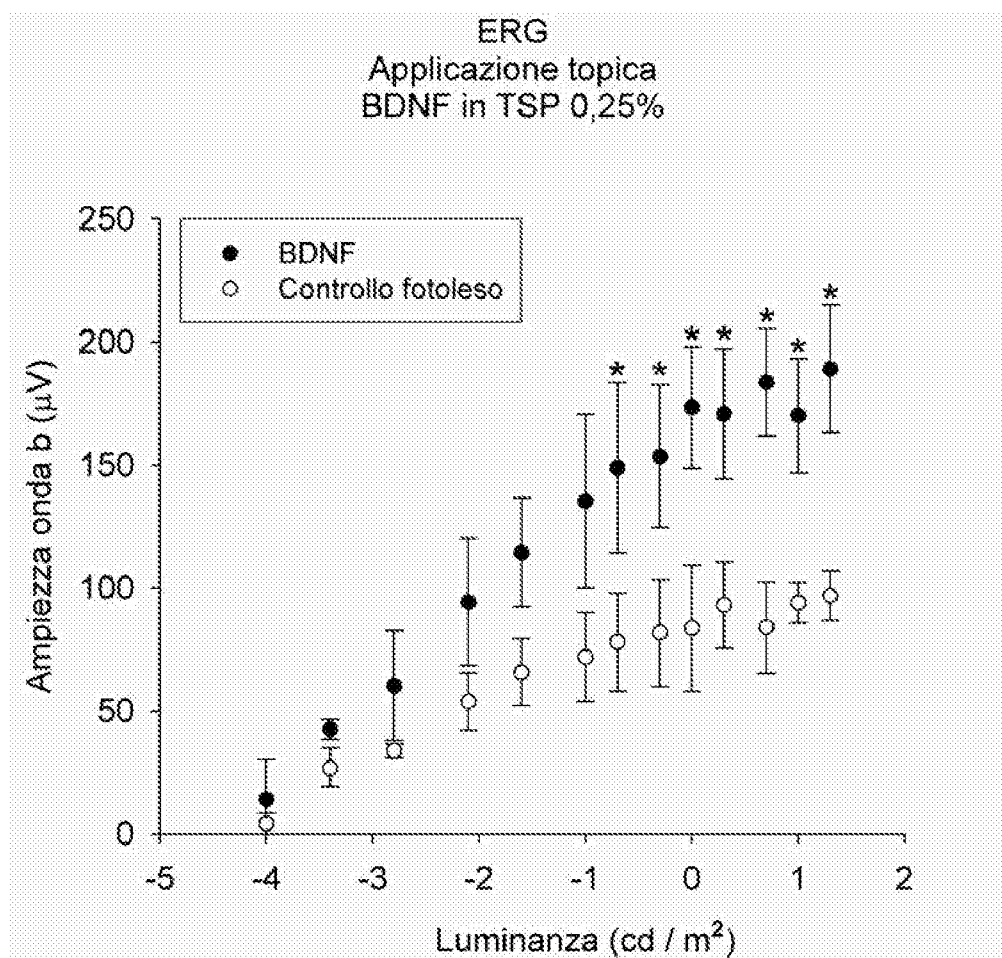
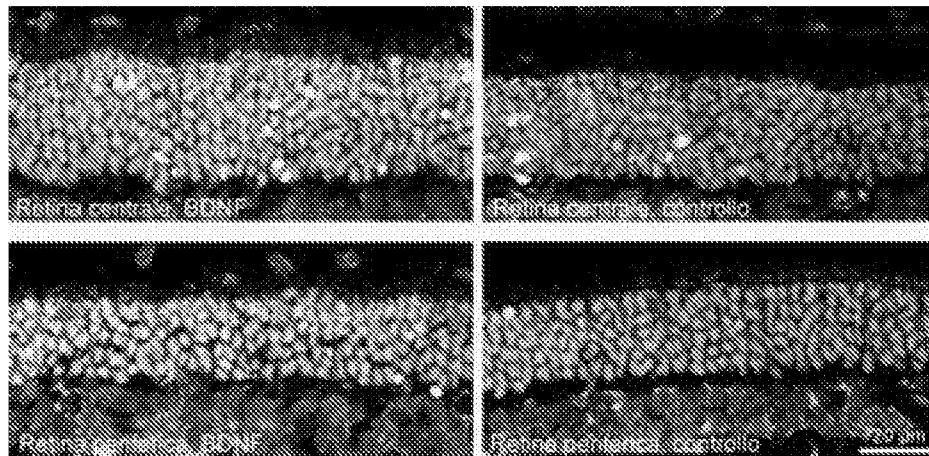
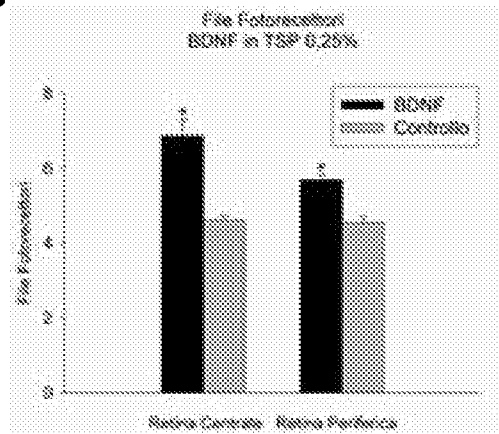


Figura 10

A



B



C

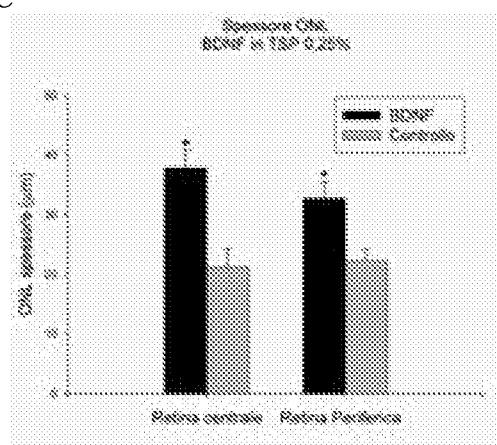


Figura 11