

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 992 180**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)**A61K 38/18** (2006.01)**C07K 14/00** (2006.01)**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2020** **PCT/EP2020/075697**87 Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2021** **WO21052926**96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2020** **E 20775227 (0)**97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024** **EP 4031117**54 Título: **Mutante de NGF para su uso en el tratamiento o prevención de trastornos oftálmicos**

30 Prioridad:

17.09.2019 EP 1919768745 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
10.12.2024

73 Titular/es:

CHIESI FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Palermo, 26/A
43122 Parma, IT

72 Inventor/es:

IMBIMBO, BRUNO, PIETRO y
VILLETTI, GINO

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 992 180 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

Mutante de NGF para su uso en el tratamiento o prevención de trastornos oftálmicos

Introducción

Campo de la invención

- 5 La presente invención proporciona un agente adecuado para el uso en el tratamiento y prevención de trastornos oftálmicos, incluyendo pero no limitado a trastornos que implican un daño y/o trastorno del nervio óptico y la retina. La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes de la invención

- 10 El nervio óptico está formado por un haz mayor que un millón de fibras nerviosas que transportan mensajes visuales. El nervio óptico conecta la retina con el cerebro. Esta conexión comprende, a nivel celular, las células ganglionares de la retina (RCG). Una célula ganglionar de la retina (RGC) es un tipo de neurona situada cerca de la superficie interna (la capa de células ganglionares) de la retina del ojo. Las RGC varían en cuanto a su tamaño, conexiones y respuestas a la estimulación visual, pero todas comparten un largo axón que se extiende hasta el cerebro. Estos axones forman el nervio óptico.

- 15 Los daños en el nervio óptico pueden causar pérdida de visión. El tipo de pérdida de visión y su gravedad dependen de dónde se produzca el daño. Puede afectar a uno o a ambos ojos.

Existen muchos tipos diferentes de trastornos del nervio óptico, entre ellos:

- 20 - El glaucoma es un grupo de enfermedades que constituyen las principales causas de ceguera, entre otras, en los Estados Unidos. El glaucoma suele producirse cuando la presión del líquido en el interior de los ojos aumenta lentamente y daña el nervio óptico.
- La neuritis óptica es una inflamación del nervio óptico. Las causas incluyen infecciones y enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, tal como la esclerosis múltiple. A veces se desconoce la causa.
- 25 - La atrofia del nervio óptico es una lesión del nervio óptico. Las causas pueden ser un flujo sanguíneo deficiente al ojo, una enfermedad, un traumatismo o la exposición a sustancias tóxicas o inducida por fármacos [etambutol, isoniazida, digitálicos, antibióticos (cloranfenicol, sulfonamidas) y amiodarona].
- Las drusas de la cabeza del nervio óptico son bolsas de proteínas y sales de calcio que se acumulan en el nervio óptico con el paso del tiempo.

- 30 Todos los trastornos descritos anteriormente pueden provocar lesiones en el axón de las RGC del nervio óptico que, en última instancia, pueden conducir a la muerte de estas células. Para la mayoría de los trastornos del nervio óptico no existe tratamiento, o el tratamiento sólo puede prevenir una mayor pérdida de visión. Por lo tanto, potenciar la viabilidad o la función de las RGC sigue siendo uno de los principales objetivos de la investigación básica y traslacional.

- 35 Hasta ahora, no se ha comercializado ningún tratamiento que sea realmente eficaz para contrarrestar la pérdida de RCG en los trastornos oftálmicos. Por lo tanto, los trastornos oftálmicos, y en particular los que implican pérdida o daño de los RCG, han sido hasta ahora difíciles de tratar. Por lo tanto, todavía hoy existe una necesidad médica muy elevada.

Algunos efectos de la administración ocular en un modelo experimental de lesión del nervio óptico han sido descritos, por ejemplo, por Mesentier-Louro et al., 2019, Mol. Neurobiol., vol. 56, p. 1056-1069).

- 40 En modelos de lesión del nervio óptico en ratas, la degeneración masiva de las RGC se produce generalmente en las 2 semanas siguientes al aplastamiento del nervio óptico como consecuencia de la reducción del retrotransporte de factores de crecimiento, incluido el factor de crecimiento nervioso (NGF). Según el estado de la técnica, la administración intravítrea y en gotas oftálmicas de NGF humano recombinante (rhNGF) podría contrarrestar el aplastamiento del nervio óptico en ratas adultas solo cuando se administra inmediatamente después del daño del nervio óptico según un paradigma experimental preventivo (Mesentier-Louro et al., 2019, Mol. Neurobiol., 56, p. 1056-1069). Sin embargo, esto no se parece a la situación clínica de los trastornos oftálmicos humanos. Para la terapia prevista de los trastornos oftálmicos humanos, una intervención terapéutica sólo puede producirse tras cierto tiempo de retraso después de inducir el primer daño en el nervio óptico, estos hallazgos experimentales en el modelo de aplastamiento del nervio óptico en la rata no pueden trasladarse al uso clínico en humanos. En particular, como resultado de la ONC podrían desencadenarse otros procedimientos posteriores en el nervio óptico, incluido un posible daño adicional de los RGC. Aún se desconoce si el rhNGF u otras moléculas serían terapéuticamente eficaces cuando se administran en una fase de daño post ONC de las RGC. De este modo, también sigue siendo difícil saber si una terapia sería eficaz o
- 50

no cuando se administra un agente en una situación que incluye o se asemeja a trastornos oftálmicos en seres humanos.

De este modo, sigue existiendo la necesidad de un tratamiento eficaz de las afecciones oculares, en particular las que afectan al nervio óptico, que no esté sujeto a efectos adversos, tales como efectos secundarios intolerables o indeseables de otro modo, y de un agente terapéutico adecuado para tales fines y disponible para los profesionales a una pureza fiable y aceptable para su administración a sujetos mamíferos, incluidos los seres humanos.

El documento WO 2008/006893 se refiere a las mutéfnas de hNGF, sus usos terapéuticos y composiciones farmacéuticas. En particular, el documento evalúa los efectos del NGF 61 Arg100Glu en un modelo de ratón para la enfermedad de Alzheimer (Ejemplo 18) y mide el grado de hiperalgesia inducida por el NGF 61 Arg100Glu en ratones CD1 (Ejemplo 19).

Malebra et Al. ("Functional Characterization of Human ProNGF and NGF Mutants: Identification of NGF P61SR100E as a "Painless" Lead Investigational Candidate for Therapeutic Applications", PLOS ONE, vol. 10, no. 9, 15 September 2015, page e0136425, DOI: 10.1371/journal.pone.0136425) caracterizan el mutante hNGF P61SR100E como candidato terapéutico, mediante la evaluación de la estabilidad *in vitro* por ensayo de proliferación TF1; el impacto estructural de las mutaciones por dicroísmo circular far-UV; la capacidad de respuesta a los receptores TrkA y p75 en modelos celulares; las propiedades algésicas tras la inyección *in vivo* (páginas 27-28). El documento divulga en la p. 9, segundo párrafo, una composición de NGF en la que el NGF P61SR100E se diluye en solución salina isotónica (NaCl 0,9 %).

Bai et Al. ("Chronic and Acute Models of Retinal Neurodegeneration TrkA Activity Are Neuroprotective whereas p75NTR Activity is Neurotoxic through a Paracrine Mechanism", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 50, 13 October 2020, pages 39392-39400, DOI: 10.1074/jbc.M110.147801) estudia la función de los receptores TrkA y p75^{NTR} y el NGF endógeno y los mutantes NGF (NGF-KKE y NGF-Delta 9/13).

Problema que se va a resolver

Es un objetivo primario de la invención proporcionar un tratamiento o prevención para trastornos oftálmicos, que no esté asociado con efectos secundarios indeseados o dolorosos, tales como la algesia. Además, se desea proporcionar un agente terapéutico que pueda ser utilizado y administrado fácilmente por los profesionales. También se desea proporcionar un agente terapéuticamente activo con un rendimiento y pureza suficientes para permitir tal tratamiento. De este modo, otros objetivos de la presente invención incluyen la eliminación de las desventajas asociadas con el estado de la técnica. Estos y otros objetivos adicionales subyacentes a la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada, a la luz de las ventajas logradas sobre la técnica anterior. Los objetivos particulares comprenden la provisión de un procedimiento fiable para tratar a un sujeto con un trastorno oftálmico sin efectos secundarios no deseados.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un polipéptido para su uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno oftálmico en un sujeto mamífero, en el que el trastorno oftálmico implica un daño y/o trastorno del nervio óptico o un daño y/o trastorno de las células ganglionares de la retina, y en el que el polipéptido es el polipéptido de SEQ ID NO: 4. Otro polipéptido adecuado para su uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno oftálmico en un sujeto mamífero es el polipéptido de SEQ ID NO: 3, que no forma parte de la presente invención. Estos polipéptidos se caracterizan por una mutación de la secuencia de aminoácidos del NGF humano (SEQ ID NO: 2), en la que dicha mutación está asociada a una actividad nociceptiva reducida. En particular, la arginina en la posición 100 del hNGF está sustituida por ácido glutámico.

El polipéptido de SEQ ID NO: 4 se caracteriza por al menos la ausencia de prolina en la posición 61, más preferentemente por la sustitución de la prolina en la posición 61 por otro aminoácido. En SEQ ID NO: 4, prolina en la posición 61 de SEQ ID NO: 3 se sustituye por serina.

Preferentemente, el sujeto mamífero es un ser humano.

Preferentemente, la administración del polipéptido de la invención no es causante de ningún efecto indeseado en el sujeto mamífero. Se prefiere específicamente que el tratamiento y/o prevención según la presente invención no cause hiperalgesia en el sujeto mamífero.

Preferentemente, el polipéptido se administra tras un daño del nervio óptico.

Preferentemente, el trastorno oftálmico comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en glaucoma, queratitis neurotrófica, neuritis óptica, atrofia del nervio óptico, drusas de la cabeza del nervio óptico y glioma de la vía óptica.

Preferentemente, el polipéptido se administra en el ojo. Más preferentemente, la administración se selecciona del grupo que consiste en la administración tópica al ojo y la administración intravítrea, siendo la administración tópica al ojo la más preferida.

5 Preferentemente, el polipéptido se administra al menos cuatro días después de la inducción de un daño del nervio óptico.

En una realización, el polipéptido se administra repetidamente. En una realización particularmente preferida, el polipéptido se administra repetidamente al menos tres veces al día.

10 En una realización, el polipéptido se administra repetidamente, por ejemplo, hasta la curación completa del trastorno oftálmico, o al menos hasta que se observe una mejoría de los síntomas del trastorno. Alternativamente, el polipéptido se administra repetidamente durante un periodo de tres a 30 días, preferentemente de siete a 14 días. Opcionalmente, la administración se interrumpe tras la finalización de dicho intervalo.

15 Preferentemente, la dosis/cada dosis tiene una cantidad de 0,3 a 30 μg del polipéptido por ojo, más preferentemente de 1 a 10 μg del polipéptido por ojo, y más preferentemente 5 μg del polipéptido por ojo. Más preferentemente, estas dosificaciones son específicas para la administración tópica en el ojo.

En una realización, el polipéptido está comprendido en un medio acuoso, y el medio acuoso se administra al sujeto mamífero. Más preferentemente, el polipéptido está comprendido en una composición que comprende lo siguiente:

- a) de 0,2 a 20 mg/ml de dicho polipéptido,
- 20 b) tampón de acetato de sodio de 5 a 100 mM,
- c) de 5 a 100 mM de metionina,
- d) pH de 5,0 a 6,0.

Más preferentemente, el polipéptido está comprendido en una composición que comprende lo siguiente:

- a) 2 mg/ml de dicho polipéptido,
- 25 b) tampón acetato de sodio 20 mM,
- c) 20 mM de metionina,
- d) pH 5,5.

30 En una realización, el polipéptido puede obtenerse de una fuente biológica. Esto puede comprender la purificación, es decir, la separación de otras moléculas, incluidas otras proteínas, tales como las proteínas de la célula hospedadora. Opcionalmente, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (que no forma parte de la presente invención) o el polipéptido de SEQ ID NO: 4 puede obtenerse en un procedimiento que comprende el (re)plegamiento y/o la purificación cromatográfica y/o la digestión por proteasas, y opcionalmente el ajuste a la concentración final de proteína y/o la preparación de una formulación deseada. En una realización, el polipéptido se puede obtener mediante expresión recombinante y purificación, en la que la purificación

35 comprende la purificación en una fase estacionaria de modo mixto. Preferentemente, el polipéptido para su uso según la presente invención está esencialmente libre de degradantes del polipéptido, en particular esencialmente libre de la variante des-nona del polipéptido.

40 De este modo, la presente invención también proporciona el polipéptido de una fuente recombinante y purificado como se describe en la presente memoria para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia, como se describe en la presente memoria.

También se divulga una composición que comprende un polipéptido seleccionado entre el polipéptido de SEQ ID NO: 3 y el polipéptido de SEQ ID NO: 4, la composición que no forma parte de la presente invención, en la que la composición se caracteriza por un pH de 5,0 a 6,0 (preferentemente pH 5,5), y comprende lo siguiente:

- a) de 0,2 a 20 mg/ml de dicho polipéptido (preferentemente 2 mg/ml),
- 45 b) tampón de acetato de sodio de 5 a 100 mM (preferentemente 20 mM),
- c) de 5 a 100 mM de metionina (preferentemente 20 mM).

Divulgación detallada de la invención

Esta memoria descriptiva en su totalidad, junto con las reivindicaciones y las figuras, divulga realizaciones específicas y/o preferidas y variantes de las características individuales de la invención. La presente invención también contempla como realizaciones particularmente preferentes aquellas realizaciones, que se generan combinando dos o más de las realizaciones y variantes específicas y/o preferentes descritas en la presente memoria para la presente invención. De este modo, la presente divulgación también incluye todas las entidades, compuestos, características, etapas, procedimientos o composiciones mencionados o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones o dos o más de dichas entidades, compuestos, características, etapas, procedimientos o composiciones. De este modo, a menos que se indique específicamente lo contrario en la presente memoria o que el contexto requiera otra cosa, la referencia a una única entidad, compuesto, característica, etapa, procedimiento o composición se entenderá que abarca una y una pluralidad (es decir, más de una, tal como dos o más, tres o más o todas) de dichas entidades, compuestos, características, etapas, procedimientos o composiciones. A menos que se indique específicamente lo contrario o que el contexto requiera otra cosa, cada realización, aspecto y ejemplo divulgado en la presente memoria se considerará aplicable a, y combinable con, cualquier otra realización, aspecto o ejemplo divulgado en la presente memoria.

En general, a menos que se definan específicamente de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica (por ejemplo, en medicina, oftalmología, neurología, genética, biología molecular, expresión génica, biología celular, cultivo celular, inmunología, neurobiología, cromatografía, química de proteínas y bioquímica). Los libros de texto y los artículos de revisión publicados, por ejemplo, en inglés, por lo general definen el significado tal y como lo entiende comúnmente un experto en la técnica.

La expresión "y/o", por ejemplo, "X y/o Y" se entenderá en el sentido de ya sea "X e Y" o "X o Y" y se considerará que proporciona una divulgación explícita de "y", de "o" y de ambos significados ("y" u "o").

Como se utilizan en la presente memoria, a menos que se especifique lo contrario, los términos "aproximadamente", "aprox." y "sustancialmente" significan todos aproximadamente o casi, y en el contexto de un valor numérico o intervalo establecido en la presente memoria designa preferentemente +/- 10 %, más preferentemente +/- 5 %, en torno al valor numérico o intervalo recitado o reivindicado.

A menos que se especifique expresamente lo contrario, la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se utiliza en el contexto del presente documento para indicar que pueden estar presentes opcionalmente otros miembros además de los miembros de la lista introducida por "que comprende". Sin embargo, se contempla como una realización específica de la presente invención que el término "que comprende" abarque la posibilidad de que no haya otros miembros presentes, es decir, a los efectos de esta realización, "que comprende" debe entenderse en el sentido de "que consiste en".

A menos que se especifique expresamente lo contrario, todas las indicaciones de cantidades relativas con respecto a la presente invención se hacen en base peso/peso. Las indicaciones de cantidades relativas de un componente caracterizado por un término genérico se relacionan con la cantidad total de todas las variantes o miembros específicos cubiertos por dicho término genérico. Si se especifica que un determinado componente definido por un término genérico está presente en una determinada cantidad relativa, y si este componente se caracteriza además por ser una variante o miembro específico cubierto por el término genérico, se entiende que no hay otras variantes o miembros cubiertos por el término genérico presentes adicionalmente de forma que la cantidad relativa total de componentes cubiertos por el término genérico supere la cantidad relativa especificada; más preferentemente no hay otras variantes o miembros cubiertos por el término genérico presentes en absoluto.

Todos los procedimientos y procedimientos descritos en la presente memoria pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

El término "agente", como se utiliza en la presente memoria, a menos que se especifique lo contrario, se refiere generalmente a un compuesto o composición, preferentemente a un compuesto. Un agente es capaz de producir un efecto en un organismo vivo y/o en una célula de un organismo vivo o derivada de un organismo vivo, por ejemplo, actuando sobre una célula y/o sobre un tejido corporal, o en un entorno. El estado físico de un agente no está particularmente limitado y, a menos que se especifique lo contrario, puede estar en el aire, en el agua y/o en estado sólido. El tipo de agente no está particularmente limitado, a menos que se especifique lo contrario, y de este modo, un agente puede ser una sustancia química y/o una biomolécula tal como una proteína o un ácido nucleico. Los agentes específicos definidos en la presente memoria son útiles en la presente invención.

Un "efecto adverso", como se utiliza en la presente memoria, es un efecto nocivo no deseado resultante de la administración de un agente (un fármaco) a un sujeto. Los efectos adversos incluyen, sin limitación, morbilidad, mortalidad, síndrome hiperalgésico, dolor, alteración del peso corporal, niveles de enzimas, pérdida de función o cualquier cambio patológico detectado a nivel microscópico, macroscópico o fisiológico. Los efectos adversos

pueden causar un cambio reversible o irreversible, incluido un aumento o disminución de la susceptibilidad del individuo a otras sustancias químicas, alimentos o procedimientos, tales como las interacciones farmacológicas.

Como se utilizan en la presente memoria, los términos "cromatografía", "cromatográfico" y similares se refieren generalmente a una técnica adecuada para la separación de una mezcla, en la que la mezcla se agrega a un material no líquido denominado "fase estacionaria" con el fin de separar, al menos parcialmente, uno o más constituyentes de la mezcla. Para ello, la fase estacionaria puede exponerse a un fluido y/o la mezcla puede disolverse en un fluido; dicho fluido en contacto con la fase estacionaria también puede denominarse "fase móvil". En general, cualquier etapa que se "lleve a cabo mediante cromatografía", como se describe en la presente memoria, puede denominarse sinónimamente "etapa cromatográfica".

El término "fase móvil", como se utiliza en la presente memoria, tiene el significado por lo general utilizado en la técnica y puede referirse a todos los fluidos puestos en contacto con la fase estacionaria durante la cromatografía, es decir, a los fluidos de lavado, así como a los fluidos (mezclas) que comprenden una proteína de interés, tales como una o más de las proteínas descritas en la presente memoria. En la presente invención, la mezcla sometida a cromatografía, como se especifica en la presente memoria, comprende por lo general una o más proteínas, tal como en particular las proteínas descritas en la presente memoria, tales como los polipéptidos de SEQ ID NO: 3 o 4, un precursor de cualquiera de ellos, una proteasa y/o proteínas de células hospedadoras (HCP).

Una "fase estacionaria" comprende por lo general una matriz base, que es un material insoluble en agua, normalmente en forma de partícula o gel, tal como una resina. En muchos casos, incluidas las realizaciones descritas en la presente memoria, una fase estacionaria comprende una matriz base y una unidad estructural que puede unirse al menos a un componente de la mezcla que se va a someter a cromatografía. La matriz base suele ser un material insoluble en agua, normalmente en forma de partículas o gel. Ejemplos no limitantes de matrices base son la sefarosa y la agarosa, por ejemplo la agarosa de alta rigidez.

Una "etapa cromatográfica", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la acción de agregar a un material cromatográfico (preferentemente una fase estacionaria) un líquido que comprende al menos un compuesto que se va a analizar y/o purificar, que es preferentemente una proteína (y en el contexto de la presente invención dicha proteína es más preferentemente el polipéptido de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4), lavando opcionalmente el material cromatográfico con una o más soluciones de lavado, y eluyendo dicho al menos un compuesto. En ese contexto, un procedimiento caracterizado por dos etapas cromatográficas, a modo de ilustración, se caracteriza porque un líquido que comprende al menos uno de tales compuestos que se va a analizar y/o purificar se agrega a un primer material cromatográfico, como se ha descrito anteriormente, y, tras la elución del mismo, el líquido que comprende al menos uno de tales compuestos se agrega a un segundo material cromatográfico, del que también se eluye, como se ha descrito anteriormente. El objetivo de cualquier "etapa cromatográfica" es que al menos un componente incluido en la mezcla aplicada a una fase estacionaria, preferentemente en cromatografía, se una a la fase estacionaria. Tal compuesto puede ser una o más proteínas descritas en la presente memoria. El compuesto puede recuperarse de la fase estacionaria, por ejemplo, por intercambio de la fase móvil y/o por exposición continuada a la fase móvil a lo largo del tiempo.

El término "une", cuando se utiliza con referencia a la cromatografía, tal como para describir la capacidad de unión de una fase estacionaria, no está particularmente limitado, pero por lo general se refiere a la unión no covalente. De este modo, por lo general, al menos un componente incluido en una mezcla, tal como al menos una proteína, se une de forma no covalente a la fase estacionaria. Una etapa cromatográfica comprende, opcional pero preferentemente, el lavado de la fase estacionaria a la que está unido el al menos un componente. El al menos un componente puede ser al menos una proteína, tal como al menos una proteína descrita en la presente memoria.

El término "heterólogo", como se utiliza en la presente memoria, describe algo que consta de múltiples elementos diferentes.

Los términos "disulfuro" y "enlace disulfuro" se utilizan, en el contexto de la presente invención, en el sentido comúnmente utilizado en la técnica. En general, un "disulfuro" se refiere a un grupo funcional con la estructura R-S-S-R'. El enlace también se denomina "enlace SS" y suele derivarse del acoplamiento de dos grupos tiol. Los enlaces disulfuro en las proteínas se forman entre los grupos tiol de los residuos de cisteína por el procedimiento de plegamiento oxidativo; dicho enlace disulfuro específico entre los grupos tiol de dos residuos de cisteína también puede denominarse "puente disulfuro". Sin querer ceñirse a una teoría concreta, normalmente se entiende en la técnica que, en las células eucariotas, los puentes disulfuro se forman en el lumen del retículo endoplásmico (y en el espacio intermembrana mitocondrial), pero no generalmente en el citosol, y, en lo que respecta a las procariotas, los puentes disulfuro se forman en el periplasma (de los respectivos organismos, en particular las bacterias gramnegativas); los puentes disulfuro también pueden encontrarse en las proteínas del entorno extracelular de las células eucariotas y procariotas.

Los términos "expresar", "expresado" y "expresión", "expresión génica" y similares, como se utilizan en la presente memoria, se relacionan con el uso de la información de un gen en la síntesis de un producto génico funcional. La expresión génica comprende al menos la transcripción, y opcionalmente comprende una o más características adicionales, opcionalmente seleccionadas de la lista abierta que comprende la edición del ARN, la traducción y la modificación postraduccional. En el contexto de la expresión recombinante de una proteína en una célula hospedadora, el término normalmente implica que la proteína es producida por la célula hospedadora (en cualquier compartimento de la célula y/o secretada y/o incorporada en cuerpos de inclusión), a menos que el contexto dicte lo contrario.

Los términos "trastorno ocular" y "trastorno oftálmico" se utilizan indistintamente en la presente memoria y comprenden todos los trastornos que afectan al ojo. Sin limitación, todos los trastornos que impliquen un daño y/o mal funcionamiento del nervio óptico y/o la retina están comprendidos en el significado de estos términos.

El término "heterólogo", como se utiliza en la presente memoria, describe algo que consta de múltiples elementos u orígenes diferentes. Por ejemplo, en una célula hospedadora no humana que comprende un gen humano (o gen que codifica un polipéptido no natural, tal como el polipéptido de la invención) dicho gen es "heterólogo" para la célula, y la célula puede ser capaz de expresión "heteróloga" del gen respectivo. La expresión de genes heterólogos también puede denominarse "recombinante".

El término "cuerpo de inclusión" tiene el significado por lo general utilizado en la técnica y se refiere a agregados o partículas que se encuentran en el citosol o en el periplasma de una célula hospedadora; los cuerpos de inclusión comprenden por lo general proteínas, tales como, en particular, proteínas expresadas recombinantemente en la célula hospedadora. Sin querer ceñirse a ninguna teoría en particular, se entiende que en el campo de la expresión recombinante, los cuerpos de inclusión contienen por lo general la proteína expresada recombinantemente pero relativamente poca proteína de la célula hospedadora (HCP), componentes ribosómicos o fragmentos de ADN/ARN. Sin querer ceñirse a ninguna teoría en particular, se entiende que los cuerpos de inclusión comprenden por lo general, al menos en parte, proteína que no está correctamente plegada (proteína mal plegada), en particular proteína mal plegada expresada recombinantemente. Se entiende que los cuerpos de inclusión comprenden por lo general proteína en una forma no plegada adecuadamente, es decir, en el contexto de la presente invención comprenden por lo general el polipéptido según la presente invención y/o un precursor del mismo, en una forma no plegada adecuadamente. El término "mal plegado" describe generalmente una biomolécula, tal como un ácido nucleico o un polipéptido, que no se encuentra en su conformación nativa, es decir, en una forma no plegada correctamente.

Por "aislado" se entiende el material que está sustancial o esencialmente libre de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un "péptido aislado" o una "proteína aislada", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un péptido o proteína, respectivamente, que se ha purificado del entorno celular y extracelular, tal como un tejido, que lo rodea en estado natural, por ejemplo, de la célula en la que se ha expresado, tal como una célula hospedadora. En una descripción alternativa, un "péptido aislado" o "proteína aislada" y similares, como se usan en la presente memoria, se refieren al aislamiento y/o purificación in vitro de un péptido o proteína, respectivamente, de su entorno celular natural y de la asociación con otros componentes del entorno en el que el péptido o proteína reside normalmente. En otro ejemplo, una "célula aislada", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una célula que ha sido purificada del entorno celular y extracelular, tal como tejido o colonias de células, que la rodean en un estado natural, por ejemplo, una célula hospedadora que ha sido eliminada del entorno que normalmente está adyacente a la célula. De acuerdo con la definición anterior de la palabra "aislado", "aislar", como se utiliza en la presente memoria, es el verbo que describe la actividad para obtener material "aislado", tal como por ejemplo una célula aislada o un péptido o proteína aislados.

Los términos "multi" y "múltiple" como se utilizan en la presente memoria significan una multitud, es decir, cualquier número de dos o más.

El término "mutación", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la alteración de la secuencia de nucleótidos del genoma de un organismo, virus o ADN extracromosómico u otros elementos genéticos. El término también se extiende a las mutaciones de una secuencia de aminoácidos, en particular la secuencia de aminoácidos de un gen portador de al menos una mutación (no silenciosa). A menos que se especifique lo contrario, una mutación de la secuencia de nucleótidos es una alteración permanente. Las mutaciones presentes en la línea germinal son normalmente heredables. En general, una mutación de la secuencia de nucleótidos puede dar lugar a muchos tipos diferentes de cambio en las secuencias: las mutaciones en los genes pueden no tener ningún efecto, alterar el producto de un gen o impedir que el gen funcione correctamente o por completo. Las mutaciones también pueden estar presentes en regiones no genéticas. A menos que se especifique lo contrario, la secuencia de tipo salvaje se utiliza como secuencia de referencia para describir una mutación. De este modo, por ejemplo, cuando se dice que un mutante dado se caracteriza por la mutación de la posición 100 de una secuencia polipeptídica, esto indica que en la posición 100 el mutante no tiene el mismo residuo de aminoácido que el polipéptido de tipo salvaje. Los tipos específicos de mutaciones de una secuencia de nucleótidos y/o una secuencia de aminoácidos incluyen alteraciones tales como deleciones, sustituciones,

adiciones, inserciones y variantes de empalme. Una "deleción" con respecto a una secuencia de nucleótidos se refiere a la ausencia de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos. Una "deleción" con respecto a una secuencia de aminoácidos se refiere a la ausencia de uno o más residuos de aminoácidos en el polipéptido. Una "adición" con respecto a una secuencia de nucleótidos se refiere a la presencia de uno o más nucleótidos adicionales en la secuencia de nucleótidos. Una "adición" con respecto a una secuencia de aminoácidos se refiere a la presencia de uno o más residuos de aminoácidos adicionales en el polipéptido relacionado. Una "sustitución" con respecto a una secuencia de nucleótidos se refiere a la sustitución de uno o más nucleótidos por otro(s) nucleótido(s) en la secuencia de nucleótidos. Una "sustitución" con respecto a una secuencia de aminoácidos se refiere a la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos por otro(s) residuo(s) de aminoácidos en el polipéptido. Las adiciones, deleciones y sustituciones a una secuencia de nucleótidos, tales como a un marco de lectura abierto, pueden ser en el extremo 5', en el extremo 3' y/o internas. Las adiciones, deleciones y sustituciones de un polipéptido pueden producirse en el extremo amino, en el extremo carboxi y/o internas. Una "inserción" con respecto a una secuencia de nucleótidos y/o una secuencia polipeptídica es una adición de uno o más nucleótidos, o uno o más residuos de aminoácidos, respectivamente, específicamente en una posición interna de la secuencia respectiva. El término "variante de empalme" se utiliza para describir que el ARN que codifica una secuencia polipeptídica se empalma de forma diferente al ARN de tipo salvaje respectivo, por lo general como resultado de una mutación a nivel del ácido nucleico, lo que suele dar lugar a un producto de traducción del polipéptido que es diferente del polipéptido de tipo salvaje. El término "variante de empalme" puede utilizarse no sólo con respecto al ARN respectivo, sino también con respecto a la secuencia de ADN plantilla respectiva (por lo general ADN genómico) y con respecto a la secuencia del polipéptido codificado por tal ARN.

El término "mutante" se refiere generalmente a una secuencia de ácido nucleico o aminoácido que es diferente de la secuencia de tipo salvaje. De este modo, una secuencia mutante de ácido nucleico o de aminoácido presenta al menos una mutación con respecto a la secuencia de tipo salvaje respectiva. En los casos en los que existen polimorfismos en la secuencia del ácido nucleico que, sin embargo, no se reflejan a nivel del respectivo polipéptido codificado (mutaciones silenciosas, degeneración del código genético), el término "mutante", a nivel del ácido nucleico, se refiere específicamente sólo a aquellas variantes del ácido nucleico que codifican un polipéptido mutante. Los mutantes pueden contener diferentes combinaciones de mutaciones, solas o en combinación, incluyendo más de una mutación y diferentes tipos de mutaciones.

El término "factor de crecimiento nervioso", abreviado "NGF" o "beta-NGF" se refiere a un factor neurotrófico y neuropéptido implicado en la regulación del crecimiento, mantenimiento, proliferación y supervivencia de determinadas neuronas y otras células, de acuerdo con el significado común en la técnica (véase, por ejemplo, Levi-Montalcini, 2004, Progress in Brain Research, vol. 146, p. 525-527). A menos que el contexto indique lo contrario, el término factor de crecimiento nervioso se refiere únicamente al NGF de tipo salvaje y no incluye los polipéptidos de SEQ ID NO: 3 o 4. El NGF de tipo salvaje es la subunidad beta 2,5S de 26 kDa que se obtiene de un precursor del NGF, que es biológicamente activo: el NGF de tipo salvaje se une con al menos dos clases de receptores: el receptor de tropomiosina quinasa A (TrkA) y el receptor de baja afinidad del NGF (LNGFR/p75NTR). El término "NGF", a menos que se especifique lo contrario, se refiere al NGF de cualquier especie, preferentemente de mamíferos; sin embargo, siempre se prefiere el NGF humano. "hNGF", como se utiliza en la presente memoria, significa NGF humano. A menos que el contexto indique lo contrario, los términos "NGF" y "hNGF" se refieren al NGF de tipo salvaje, es decir, hNGF significa NGF de tipo salvaje. La secuencia de aminoácidos del NGF humano de tipo salvaje corresponde a las posiciones 121-239 de SEQ ID NO: 1 (gris en la figura 24). Las secuencias de NGF no humanas están disponibles, por ejemplo, en la literatura científica, mediante búsquedas de secuencias, tales como BLAST, utilizando las posiciones 121-239 de SEQ ID NO: 1 como cebo, y en bases de datos públicas de proteínas como Swissprot.

Los términos "muteína del NGF" y "muteína del NGF", o, con referencia al NGF "muteína del mismo, se utilizan en la presente memoria indistintamente para referirse a un polipéptido que se caracteriza por al menos una mutación, en comparación con el NGF de tipo salvaje, como se describe con más detalle en la presente memoria. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 son muteínas de NGF. Preferentemente, una muteína de NGF tiene una identidad de secuencia del 80 al 99,5 % con el NGF, en particular con el NGF humano, más preferentemente una muteína tiene una identidad de secuencia del 90 al 99 % con el NGF, en particular con el NGF humano.

Los términos "parte madura" "porción madura", con referencia al NGF, se utilizan indistintamente con el término "beta-NGF" y se refieren a un polipéptido del NGF que se caracteriza porque no comprende el pro-péptido (y por tanto, por supuesto, tampoco el prepropéptido) del NGF. Por analogía, el término "parte madura" también se utiliza para referirse a los polipéptidos de SEQ ID NO: 3 o 4, ya que estos polipéptidos tampoco comprenden un pro-péptido (y por tanto, por supuesto, no un prepropéptido). Preferentemente, la parte madura tampoco comprende un péptido terminal C escindible codificado por el marco de lectura abierto del NGF de tipo salvaje; tal péptido terminal C escindible, en el caso del NGF humano, consiste en los dos residuos de aminoácidos "RA" (240 y 241 en SEQ ID NO: 1). Más particularmente, la parte madura se puede obtener, sin limitación, por escisión de un pro-NGF con la proteasa furina (y con otras proteasas capaces de escindir con precisión directamente el terminal N del primer residuo de aminoácido del NGF, o del polipéptido de SEQ ID NO: 3 o 4, respectivamente. Por ejemplo, es bien sabido que el sitio de escisión de la Furina del NGF humano, y de

muchos ortólogos, consiste en la secuencia R¹S²K³R⁴ (código de aminoácidos de una letra, secuencias numeradas desde el extremo N a la C; en recuadro en la figura 25)). En el NGF maduro, normalmente no está presente ni el sitio de escisión de furina ni ningún aminoácido terminal N del sitio de escisión de furina. A título ilustrativo, la parte madura del NGF humano consiste en el polipéptido representado por las posiciones de aminoácidos 122-239 de la SEQ ID NO: 1. La parte madura del NGF no humano puede identificarse, por ejemplo, mediante la búsqueda de secuencias y/o el análisis de secuencias, en el que dicha parte madura del NGF humano se utiliza para la alineación de secuencias.

Los términos "péptido" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en la presente memoria y se refieren a una cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos (amida), y ambos términos incluyen, sin limitación, todos los polipéptidos como se establece en la figura 2.

El término "precursor", como se utiliza en la presente memoria con referencia al NGF, se refiere a cualquier secuencia de péptidos a partir de la cual se puede obtener NGF mediante escisión proteolítica. A título ilustrativo, tanto el pro-NGF como el pre-pro-NGF, así como sus variantes, son ejemplos típicos de precursores del NGF. El término "precursor", como se utiliza en la presente memoria, puede referirse a precursores cuyo residuo de aminoácido más terminal C es el residuo más terminal C del NGF, y también a precursores que se extienden en el terminal C más allá del residuo más terminal C del NGF, siempre que el NGF pueda obtenerse a partir de ellos mediante escisión proteolítica: aunque el precursor natural del pro-NGF humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) comprende un dipéptido terminal C (residuos de aminoácidos 240 y 241 en SEQ ID NO: 1, en negrita en la figura 1), es preferible en la presente invención que el precursor no comprenda un péptido escindible terminal C codificado por el marco de lectura abierto del NGF de tipo salvaje; tal péptido escindible terminal C, en el caso del NGF humano, consiste en los dos residuos de aminoácidos "RA" (240 y 241 en SEQ ID NO: 1).

Los términos "pre-péptido" o "pre-secuencia", como se utilizan en la presente memoria, se refieren en general indistintamente a una secuencia polipeptídica codificada por parte del marco de lectura abierto de NGF, terminal N directamente adyacente al pro-péptido. A título ilustrativo: un pre-péptido es NGF consiste en la secuencia que comprende la secuencia continua que va desde el residuo 1 de SEQ ID NO: 1 al residuo 18 de SEQ ID NO: 1. Las secuencias de los respectivos pre-péptidos de precursores de NGF no humanos están disponibles, por ejemplo, en la literatura científica, mediante búsquedas de secuencias, como BLAST, utilizando las posiciones 1-18 de SEQ ID NO: 1 como cebo, y en bases de datos públicas de proteínas como Swissprot. Un polipéptido o proteína formado por el pre-péptido y el pro-NGF, en el que el terminal C del pre-péptido es directamente adyacente al terminal N del pro-NGF, puede denominarse en la presente memoria "pre-pro-NGF".

Los términos "pro-péptido" o "pro-secuencia", como se utilizan en la presente memoria, se refieren en general indistintamente a una secuencia polipeptídica codificada en la naturaleza por parte del marco abierto de lectura del NGF, terminal N directamente adyacente al NGF maduro, pero cuya secuencia polipeptídica no incluye el pre-péptido. Por ejemplo: el precursor de tipo salvaje del NGF contiene un pro-péptido. El pro-péptido del precursor de NGF, consiste en la secuencia que comprende la secuencia continua que va desde el residuo 19 de SEQ ID NO: 1 al residuo 121 de SEQ ID NO: 1. Las secuencias de los respectivos pro-péptidos del pro-NGF no humano están disponibles, por ejemplo, en la literatura científica, mediante búsquedas de secuencias, tales como BLAST, utilizando las posiciones 19-121 de SEQ ID NO: 1 como cebo, y en bases de datos públicas de proteínas como Swissprot.

"pro-NGF", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de péptidos que comprende tanto la parte madura del NGF como el respectivo pro-péptido, pero no el respectivo pre-péptido. El pro-NGF humano consiste en la secuencia que comprende la secuencia continua que va desde el residuo 19 de SEQ ID NO: 1 a al menos el residuo 239 de SEQ ID NO: 1. Aunque el pro-NGF humano de tipo salvaje comprende un dipéptido terminal C (residuos de aminoácidos 240 y 241 en SEQ ID NO: 1, en negrita en la figura 25), es preferible que el pro-NGF obtenido y utilizado en la presente invención no comprenda un péptido terminal C escindible codificado por el marco de lectura abierto del NGF de tipo salvaje; tal péptido terminal C escindible, en el caso del NGF humano, consiste en los dos residuos de aminoácidos "RA" (240 y 241 en SEQ ID NO: 1). Las secuencias del pro-NGF no humano están disponibles, por ejemplo, en la literatura científica, mediante búsquedas de secuencias, tales como BLAST, utilizando las posiciones 19-239 de SEQ ID NO: 1 como cebo, y en bases de datos públicas de proteínas como Swissprot.

Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan indistintamente en la presente memoria y se refieren tanto al ARN como al ADN, incluidos el ADNc, el ADN genómico, el ADN sintético y los equivalentes de ADN/ARN que contienen análogos de nucleótidos, análogos de fosfato y/o análogos de azúcar. Un ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario (es decir, una cadena sentido o una cadena antisentido). Ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen genes, marcos de lectura abiertos, fragmentos de genes, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARNsi, micro-ARN, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ácidos nucleicos aislados de cualquier tipo y sondas de ácidos nucleicos de secuencia, y cebadores, así como análogos de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos pueden tener cualquier tipo de estructura tridimensional.

El término "péptido" según la invención comprende oligo- y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden dos o más, preferentemente 3 o más, preferentemente 4 o más, preferentemente 6 o más, preferentemente 8 o más, preferentemente 10 o más, preferentemente 13 o más, preferentemente 16 más, preferentemente 21 o más y hasta preferentemente 8, 10, 20, 30, 40 o 50, en particular 100 aminoácidos unidos covalentemente a una cadena por enlaces peptídicos.

El término "proteína" se refiere preferentemente a péptidos grandes, preferentemente a péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero en general los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" son sinónimos y se utilizan indistintamente en la presente memoria, a menos que el contexto indique lo contrario. De este modo, los términos "polipéptido de SEQ ID NO: 4" y "proteína de SEQ ID NO: 4" tienen el mismo significado.

El término "farmacéuticamente aceptable" describe en general que una determinada sustancia puede administrarse a un sujeto, opcional y preferentemente en combinación con un agente, sin que el agente cause efectos adversos intolerables, a la dosificación utilizada.

Los términos "portador farmacéuticamente aceptable" y "excipiente farmacéuticamente aceptable" se utilizan para referirse a uno o más de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles y adecuados para la administración a un sujeto como se describe en la presente memoria, o que no interfieren de otro modo con dicha administración. Ejemplos de tales portadores farmacéuticamente aceptables comprenden sin limitación uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. Particularmente para el caso de composiciones farmacéuticas líquidas, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los soportes farmacéuticamente aceptables pueden contener además sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que aumentan la vida útil o la eficacia del agente. Un portador farmacéuticamente aceptable está por lo general comprendido en una composición según la presente invención.

El término "agente farmacéuticamente activo" se refiere a un agente que puede usarse en la administración a un sujeto donde el agente sería beneficioso, por ejemplo, para mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno. Además, un "agente farmacéuticamente activo" puede tener un efecto positivo o ventajoso sobre la afección o el estado de enfermedad de un sujeto cuando se administra al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Preferentemente, un agente farmacéuticamente activo tiene propiedades curativas y puede administrarse para mejorar, aliviar, mitigar, invertir, retrasar la aparición o disminuir la gravedad de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno. Un agente farmacéuticamente activo puede tener propiedades profilácticas y puede utilizarse para retrasar la aparición de una enfermedad o para disminuir la gravedad de tal enfermedad o condición patológica. Por ejemplo, un agente de la invención se considera en la presente memoria como un ingrediente farmacéuticamente activo para el tratamiento de la fibrosis quística, según se reivindica. En otro ejemplo, una proteína farmacéuticamente activa puede utilizarse para tratar una célula o un individuo que normalmente no expresa una proteína, o no a los niveles deseados, o que expresa mal una proteína, por ejemplo, una proteína farmacéuticamente activa puede compensar una mutación, o la falta de una expresión suficientemente alta, mediante el suministro de una proteína deseable. El término "péptido o proteína farmacéuticamente activa" incluye proteínas o polipéptidos completos, y también puede referirse a fragmentos farmacéuticamente activos de los mismos. También puede incluir análogos farmacéuticamente activos de un péptido o proteína.

Un "marco de lectura abierto" u "ORF" es un tramo continuo de codones que comienza con un codón de inicio y termina con un codón de parada.

Los términos "sujeto" y "paciente", como se utilizan en la presente memoria, se refieren a un mamífero. Por ejemplo, los mamíferos en el contexto de la presente invención son los seres humanos, los primates no humanos, los animales domesticados, incluidos, pero no limitados a, perros, gatos, ovejas, vacas, cabras, cerdos, caballos, etc., los animales de laboratorio, incluidos, pero no limitados a, ratones, ratas, conejos, etc., así como los animales en cautividad, tales como los animales de los zoológicos. Los términos "sujeto" y "paciente", tal y como se utilizan en la presente memoria, incluyen en particular a los seres humanos. El sujeto (humano o animal) tiene dos juegos de cromosomas, es decir, es diploide. El término "paciente" se refiere a un sujeto que padece una afección, corre el riesgo de padecerla, la ha padecido o se prevé que la padecerá, y que puede ser sometido a terapia, por ejemplo, mediante la administración de un agente. El estado del paciente puede ser crónico y/o agudo. De este modo, un "paciente" también puede describirse como un sujeto sometido a una terapia y/o que necesita una terapia.

El término "terapia" debe entenderse en sentido amplio y se refiere al tratamiento de un sujeto con el objetivo de prevenir o tratar una afección en el sujeto. En realizaciones preferidas, la terapia incluye específicamente la administración de un agente al sujeto.

El término "tripsina", como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a una enzima proteolítica clasificada como EC 3.4.21.4). La tripsina escinde las cadenas peptídicas principalmente en el lado carboxilo de los aminoácidos lisina o arginina, normalmente excepto cuando alguno de ellos va seguido de prolina. Sin querer atarse a la teoría, se entiende que la tripsina es una serina proteasa, y que la tripsina se encuentra de forma natural en el sistema digestivo de muchos vertebrados, donde hidroliza proteínas. En la presente invención se prefiere la tripsina de fuentes recombinantes. Aunque, *in vivo*, la tripsina se forma junto con un pro-péptido (denominado "tripsinógeno"), el término "tripsina", como se utiliza en la presente memoria, se refiere preferentemente a la tripsina madura desprovista de cualquier pro-péptido. El uso de tripsina para la escisión proteolítica también puede denominarse "proteólisis con tripsina" o "tripsinización", y se dice que las proteínas resultantes de la escisión con tripsina han sido "tripsinizadas".

Una "variante" de un precursor de NGF o del polipéptido de SEQ ID NO: 3 o 4, se refiere a un polipéptido o proteína en el que la secuencia de aminoácidos que no forma parte del NGF maduro (beta-NGF) o no forma parte de SEQ ID NO: 3 o 4, respectivamente, se caracteriza por al menos una mutación en comparación con un precursor de tipo salvaje de NGF, tal como por ejemplo con un pro-NGF de tipo salvaje o un pre-pro-NGF de tipo salvaje; dicha al menos una mutación se encuentra preferentemente terminal N a la secuencia de aminoácidos del NGF maduro (beta-NGF). De este modo, como se usa en la presente memoria, una "variante" de un precursor de NGF o similar se refiere a un péptido o proteína en el que el pre-péptido y/o el pro-péptido se caracterizan por al menos una mutación, con respecto a la secuencia de aminoácidos del pre-péptido y/o del pro-péptido, por ejemplo pero sin limitación aquellas variantes descritas en el documento WO 2013/092776 A1 y en por US 2018/0086805 A1. A título ilustrativo, el documento WO 2013/092776 A1 describe "variantes" de pro-NGF en las que el sitio de escisión de furina (de tipo salvaje) está ausente debido a una o más mutaciones específicas.

El término "vector" o "vector de clonación" se refiere generalmente a un ácido nucleico que puede introducirse en una célula hospedadora. Ejemplos de vectores incluyen, sin limitación, plásmidos, fagos y todos los demás tipos de ácidos nucleicos que pueden introducirse en una célula hospedadora. El término "vector" debe entenderse en sentido amplio y comprenderá los vectores que codifican un péptido o proteína para la expresión heteróloga (tales vectores pueden servir como plantillas, para la generación de transcritos), y los que no lo hacen. Los vectores del primer tipo contendrán un marco de lectura abierto que codifica una proteína o un péptido, que podrá expresarse cuando el vector esté presente en una célula hospedadora. Aunque el tipo de vector que elija el experto dependerá del tipo de célula hospedadora que elija, en un caso particular, los vectores de clonación para todas las células hospedadoras comunes, incluida *E. coli*, están disponibles comercialmente, por lo que el experto elegirá un vector particular teniendo plenamente en cuenta la célula hospedadora elegida.

El término "tipo salvaje" se utiliza en la presente memoria para referirse a un gen o una proteína que se encuentra por lo general en la naturaleza, preferentemente en un sujeto sano. Un gen o una proteína que no es "de tipo salvaje" se denomina en la presente memoria "mutante" o "mutado", o similares. A título ilustrativo, SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de aminoácidos de un precursor de la NGF humana de tipo salvaje; SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos del NGF humano de tipo salvaje.

La presente invención se basa en varios descubrimientos, que están interrelacionados y, de este modo, juntos llevan a los inventores a llegar a los diversos aspectos de la invención, que se describirán todos individualmente a continuación.

El agente según la presente invención

La presente invención proporciona un agente para el tratamiento y/o prevención de trastornos oftálmicos en un sujeto mamífero. El agente que puede utilizarse en la administración a un sujeto en el que el agente sería beneficioso, por ejemplo, para mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno. En particular, el agente útil en la presente invención es un polipéptido de SEQ ID NO: 4; otro agente útil para el tratamiento y/o prevención de trastornos oftálmicos en un sujeto mamífero es el polipéptido de SEQ ID NO: 3, que no forma parte de la presente invención. De este modo, la presente invención, en particular, proporciona una de SEQ ID NO: 4 para su uso en terapia. La terapia comprende por lo general la administración de dicho polipéptido a un cuerpo humano o animal, como se describe a continuación.

Los polipéptidos de SEQ ID NO: 3 (que no forma parte de la presente invención) y SEQ ID NO: 4 se proporcionan como agentes farmacéuticamente activos. Los polipéptidos de SEQ ID NO: 3 (que no forma parte de la presente invención) o SEQ ID NO: 4 se proporcionan para uso médico, en particular para el tratamiento y/o prevención de trastornos oftálmicos en un sujeto mamífero. Opcionalmente, los polipéptidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 proceden de una fuente recombinante. De este modo, la presente divulgación proporciona también el polipéptido recombinante de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 para uso médico, tal como se describe en la presente memoria.

El agente según la presente invención, también denominado en la presente memoria "polipéptido de SEQ ID NO: 4" se describirá ahora con más detalle. El término "polipéptido de SEQ ID NO: 3" y términos similares indican en la presente memoria un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos definida por SEQ

ID NO: 3 y/o un agente con actividad biológica equivalente, que no forman parte de la presente invención. El término "polipéptido de SEQ ID NO: 4" y términos similares indican en la presente memoria un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos definida por SEQ ID NO: 4 y/o un agente con actividad biológica equivalente. De este modo, dentro de estos términos también se incluyen partes o análogos funcionalmente equivalentes de tales polipéptidos. Un ejemplo de una parte biológicamente equivalente del polipéptido podría ser un dominio o subsecuencia del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la presente invención) o el polipéptido de SEQ ID NO: 4, que incluye el sitio de unión para permitir que el dominio o la subsecuencia ejerzan sustancialmente la misma actividad biológica que el polipéptido de longitud completa de SEQ ID NO: 3 (que no forma parte de la presente invención) o el polipéptido de longitud completa de SEQ ID NO: 4 o alternativamente un gen que codifique dicho polipéptido. El término "sustancialmente la misma actividad biológica" se refiere a una parte equivalente o a un polipéptido análogo que tenga al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 % y más preferentemente al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de la actividad del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la presente invención) o el polipéptido de SEQ ID NO: 4 en los ensayos descritos en el ejemplo 4. Un ejemplo de análogo biológicamente equivalente del polipéptido podría ser una proteína de fusión que incluya al menos una parte de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la presente invención) o el polipéptido de SEQ ID NO: 4, pero también puede ser un análogo homólogo del polipéptido. Asimismo, moléculas completamente sintéticas que imitan la actividad biológica específica del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la presente invención) o el polipéptido de SEQ ID NO: 4 constituirían "análogos biológicamente equivalentes".

Más preferentemente, el término "polipéptido de SEQ ID NO: 3" y términos similares indican en la presente memoria un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos definida por SEQ ID NO: 3, que no forma parte de la presente invención; tales agentes son opcionalmente proteínas de fusión que comprenden, entre otras, la secuencia de aminoácidos definida por SEQ ID NO: 3. Más preferentemente, el término "polipéptido de SEQ ID NO: 3" y términos similares indican en la presente memoria un polipéptido consistente en la secuencia de aminoácidos definida por SEQ ID NO: 3; en esta realización, el agente consiste en un polipéptido formado por los 118 residuos de aminoácidos en orden secuencial definidos por SEQ ID NO: 3. En esta y otras realizaciones, este polipéptido lleva opcionalmente uno, dos o tres enlaces internos de cisteína, de modo que los residuos de cisteína (Cys, C) están unidos covalentemente entre sí para formar puentes disulfuro intramoleculares. Los enlaces de cisteína son preferentemente equivalentes a los del NGF humano de tipo salvaje.

Igualmente más preferentemente, el término "polipéptido de SEQ ID NO: 4" y términos similares indican en la presente memoria un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos definida por SEQ ID NO: 4; tales agentes son opcionalmente proteínas de fusión que comprenden, entre otras, la secuencia de aminoácidos definida por SEQ ID NO: 4. Más preferentemente, el término "polipéptido de SEQ ID NO: 4" y términos similares indican en la presente memoria un polipéptido consistente en la secuencia de aminoácidos definida por SEQ ID NO: 4; en esta realización, el agente consiste en un polipéptido formado por los 118 residuos de aminoácidos en orden secuencial definidos por SEQ ID NO: 4. En esta y otras realizaciones, el polipéptido lleva opcionalmente uno, dos o tres enlaces internos de cisteína, de modo que los residuos de cisteína (Cys, C) están unidos covalentemente entre sí para formar puentes disulfuro intramoleculares. Los enlaces de cisteína son preferentemente equivalentes a los del NGF humano de tipo salvaje.

El polipéptido de la presente invención puede caracterizarse opcionalmente por otras modificaciones postraduccionales. Tales modificaciones postraduccionales incluyen opcionalmente la glucosilación y/o la fosforilación. Preferentemente, sin embargo, el polipéptido según la presente invención está libre de glucosilación y/o fosforilación. De hecho, teniendo en cuenta que los ejemplos experimentales expuestos en la presente memoria demuestran un efecto beneficioso en la curación de trastornos oculares y una proporción beneficiosa beneficio-efecto adverso, por lo que el polipéptido utilizado se obtuvo mediante expresión recombinante citosólica en bacterias, que por lo general no da lugar a glucosilación y/o fosforilación, es plausible que el efecto beneficioso de la presente invención no dependa de tal tipo de modificación postraduccional. Por lo tanto, en realizaciones preferidas, el polipéptido según la presente invención no se caracteriza por glucosilación y/o fosforilación.

Por lo general, el polipéptido según la presente invención es un polipéptido no natural que no es producido naturalmente por el sujeto al que se administra el polipéptido. Esto se asocia no sólo con la ventaja de la detectabilidad en el sujeto tras la administración, sino que también evidencia que la administración (de una fuente externa, tal como por ejemplo las composiciones preparadas según la presente divulgación) necesita ser administrada al sujeto para lograr el éxito en el tratamiento o la prevención del trastorno.

Preferentemente, el polipéptido según la presente invención es un polipéptido aislado. Más preferentemente, el polipéptido según la presente invención está esencialmente libre de proteínas de la célula hospedadora, productos de degradación (tales como la variante des-nona, por ejemplo) y proteasa (tal como la tripsina, por ejemplo). Cuando el polipéptido según la presente invención está esencialmente libre de proteínas de la célula

hospedadora, productos de degradación (tales como la variante des-nona, por ejemplo), y proteasa (tal como la tripsina, por ejemplo) también puede denominarse "polipéptido puro". Preferentemente, el polipéptido según la presente invención se administra como polipéptido puro. Más preferentemente, el polipéptido puro consistente en SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la presente invención) o el polipéptido puro consistente en SEQ ID NO: 4 tiene un porcentaje en peso de 90 % o más, preferentemente 92 % o más, más preferentemente 93 % o más, más preferentemente 94 % o más, más preferentemente 96 % o más, más preferentemente 97 % o más, más preferentemente 98 % o más, más preferentemente 99 % o más, más preferentemente 99,2 % o más, más preferentemente 99,4 % o más, más preferentemente 99,6 % o más, más preferentemente 99,8 % o más, más preferentemente 99,9 % o más, con respecto a la proteína total en la composición. Tal polipéptido puro está disponible en base a la divulgación presentada en la presente memoria, incluyendo los ejemplos 1 y 2. Más preferentemente, el polipéptido puro según la presente invención tiene un grado de pureza compatible con las buenas prácticas de fabricación (GMP).

Como se demostró en los experimentos del presente documento, en particular en el ejemplo 4, las dosis administradas del agente según la presente invención no indujeron ningún síndrome hiperalгésico (dolor) en experimentos separados. La ausencia de dolor es especialmente notable porque el agente se administró por vía tóptica, y repetidamente, al ojo dañado, también en un contexto crónico (para más detalles, véanse los ejemplos).

Opcionalmente, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o de SEQ ID NO: 4 se administra en una cantidad eficaz a un sujeto que lo necesite. A continuación se describen los detalles de la administración, la cantidad eficaz y el sujeto que la necesita.

Los polipéptidos consistentes en SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) y de SEQ ID NO: 4, respectivamente, difieren en una o dos posiciones de la secuencia de aminoácidos del factor de crecimiento nervioso humano (NGF, también denominado NGF humano de tipo salvaje o NGF de tipo salvaje, véase SEQ ID NO: 2). La diferencia del polipéptido según la presente invención con respecto al polipéptido de SEQ ID NO: 2 tiene un efecto notable en el tratamiento o la prevención de los trastornos oculares y la ausencia de efectos secundarios, como se divulga en detalle en la presente memoria y se apoya en los ejemplos experimentales expuestos en la presente memoria.

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una neurotrofina necesaria para el desarrollo y la supervivencia de poblaciones neuronales específicas. El NGF es un péptido homodimérico que desencadena de forma natural la proliferación y la homeostasis de las neuronas. En el organismo, el NGF se une al menos a dos tipos de receptores: el receptor de tropomiosina quinasa A (TrkA) y el receptor de neurotrofina NGF de baja afinidad p75 (LNGFR/p75^{NTR}/p75). Ambos están asociados a determinados trastornos en seres humanos y animales, aunque los respectivos mecanismos de acción son probablemente diferentes. Se han propuesto varias aplicaciones terapéuticas para el NGF, pero pocas han madurado hasta llegar al mercado.

Sin embargo, muchos usos terapéuticos del NGF que se han previsto en el pasado no han madurado hasta convertirse en productos terapéuticos de NGF comercializados, y una razón puede verse en que el NGF, además del efecto deseado sobre la proliferación y homeostasis de las neuronas, está asociado con el dolor: puede, cuando se administra por vía tóptica o sistémicamente, causar hiperalgesia (Lewin et al., 1994, Eur. J. Neurosci., vol. 6, p. 1903-1912; Della Seta et al., 1994, Pharmacol. Biochem. Behav., vol. 49, p. 701; Dyck et al., 1997, Neurology, vol. 48, 501-505; McArthur, et al., 2000, Neurology, vol. 54, p. 1080-1088; Svensson et al., 2003, Pain, vol. 104, p. 241-247; Ruiz et al., 2004, Brain Res., vol. 1011, p. 1-6). Como solución, se desarrollaron versiones mutantes del NGF ("muteínas"), que se asocian con una actividad nociceptiva reducida ("NGF sin dolor"), y que se caracterizan por al menos una mutación en el dominio del NGF que interactúa con el receptor TrkA (WO 2008/006893 A1, Malerba et al. PLOS One, 2015, vol. 10: e0136425). Sin embargo, tales polipéptidos no están hasta ahora disponibles al público en pureza farmacéuticamente aceptable, y no han sido propuestos o desarrollados para el tratamiento o prevención de trastornos oftálmicos del ojo, posiblemente también en vista del prejuicio y la experiencia negativa general con la investigación sobre factores de crecimiento en este campo terapéutico en general.

Se sabe que el NGF (de tipo salvaje) afecta a las células diana a través de la unión a dos receptores separados, (a) receptor tirosina quinasa A (TrkA), que conduce a la supervivencia neuronal, y (b) receptor de neurotrofina p75, que está implicado en la regulación de la muerte celular (Mesentier-Louro et al., 2017, Int. J. Mol. Sci., vol. 18(98), de modo que los elementos de secuencia polipeptídica con NGF de tipo salvaje, tras el aplastamiento del nervio óptico, también pueden tener el efecto de exacerbar la degeneración de la retina a través de la estimulación de la apoptosis, véase Mesentier-Louro et al., 2018, Mol. Neurobiol., vol. 56, p. 1056-1069. También se sabe que el residuo R100 del NGF humano de tipo salvaje está implicado en la unión del NGF a p75, y que la mutación de ese residuo afecta a la unión a p75, véase, por ejemplo, el documento WO 2008/006893 A1. A diferencia del NGF de tipo salvaje, hNGF, los polipéptidos de la presente invención tienen una menor afinidad de unión por p75 (véase, por ejemplo, Malerba et al., 2015, PlosOne, 10(9): e0136425). El NGF humano P61SR100E corresponde al polipéptido de SEQ ID NO: 4. Entre varios mutantes del NGF humano (mutantes hNGF), el mutante NGF humano P61SR100E se considera el más prometedor y se menciona que los mutantes son adecuados, entre otras cosas, para las enfermedades oftálmicas. Sin embargo, los usos

específicos de tratamiento y/o prevención según la presente invención no se enseñan en esas referencias, y esas referencias tampoco hacen que los respectivos polipéptidos estén disponibles con una pureza lo suficientemente alta como para permitir su uso médico en humanos. De este modo, los polipéptidos para su uso según la presente invención, como se describen y proporcionan en la presente memoria, proporcionan varias ventajas inesperadas sobre el NGF humano de tipo salvaje. En particular, los resultados experimentales en los que se basa la presente invención (véanse los ejemplos) no pueden explicarse únicamente por el hecho de que el agente según el presente sea "indoloro", ya que su capacidad para inducir dolor nunca se ha investigado experimentalmente en una zona inervada del ojo, es decir, una zona caracterizada por nociceptores expuestos. Además, aunque la administración del agente según la presente invención es causante del fortalecimiento del nervio (véase, por ejemplo, el ejemplo 3), la administración no se asocia con dolor.

la estabilidad y, de este modo, la pureza a largo plazo del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la presente invención) o SEQ ID NO: 4 del mismo pueden obtenerse y/o mejorarse mediante los aspectos y realizaciones descritos en la presente memoria. De este modo, la presente divulgación no sólo pone a disposición un nuevo tratamiento o prevención para un trastorno oftálmico, sino que también proporciona el agente adecuado para tal tratamiento o prevención, en un grado de pureza adecuado para aplicaciones terapéuticas, incluida la administración a un mamífero. El agente de la presente invención no estaba disponible anteriormente al público en un grado de pureza tan ventajoso.

El polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 no se encuentra en la naturaleza y también puede denominarse polipéptido no natural. De este modo, el agente según la presente invención no es NGF de tipo salvaje, y en particular no es NGF humano de tipo salvaje.

Preferentemente, el polipéptido no natural según la presente invención se suministra con un alto grado de pureza. Opcionalmente, el polipéptido comprende puentes disulfuro internos. Opcionalmente, el polipéptido está correctamente plegado. Opcionalmente, el polipéptido es soluble en un medio acuoso.

La presente invención se basa, en parte, en experimentos con modelos animales de daño o trastorno del nervio óptico (véase el ejemplo 4). El polipéptido ha inducido una mejora significativa y dependiente de la dosis en el tiempo de curación de los trastornos que implican un daño y/o trastorno del nervio óptico en comparación con los animales tratados con placebo. Esta mejora es evidente a dosis desprovistas de efectos secundarios relacionados con el dolor, lo que demuestra un beneficio potencial sobre el estado de la técnica.

En particular, los datos generados en modelos *in vivo* de trastornos que implican un daño y/o trastorno del nervio óptico han demostrado que el polipéptido de la presente invención es indoloro, pero conserva la actividad de dirigirse al sistema receptor de NGF, y así proporciona como un medio terapéutico para el tratamiento o prevención de trastornos oftálmicos. En efecto, el polipéptido de la invención conserva las propiedades tróficas del NGF de tipo salvaje sobre la angiogénesis y la reinervación que favorecen la cicatrización del nervio óptico sin ejercer los efectos pro-nociceptivos del NGF de tipo salvaje en el lugar de aplicación y a nivel sistémico.

Se proporciona un polipéptido para su uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno oftálmico en un sujeto mamífero, en el que el polipéptido se selecciona entre el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) y el polipéptido de SEQ ID NO: 4. También se proporciona el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia, como se describe en la presente memoria.

Más particularmente, la presente invención se refiere a un uso terapéutico específico del polipéptido de SEQ ID NO: 4, en el que el uso terapéutico específico es el tratamiento y/o prevención de un trastorno oftálmico en un sujeto mamífero. De este modo, la presente invención también proporciona el polipéptido de SEQ ID NO: 4 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia, en el que la terapia comprende el tratamiento y/o la prevención de un trastorno oftálmico en un sujeto mamífero. El sujeto mamífero es por lo general un sujeto caracterizado por la necesidad de tal tratamiento.

El polipéptido de SEQ ID NO: 3 así como el polipéptido de SEQ ID NO: 4 se caracteriza por una mutación de la secuencia de aminoácidos del NGF humano (hNGF, SEQ ID NO: 2), en la que dicha mutación está asociada a una actividad nociceptiva reducida. En particular, la arginina en la posición 100 del hNGF está sustituida por ácido glutámico. La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente hallazgo de que se puede conseguir un efecto terapéutico sin los efectos secundarios conocidos de la técnica anterior.

Sin querer estar atado a una teoría particular, se prefiere que el polipéptido según la presente invención comprenda uno o más puentes disulfuro, y más preferentemente tres puentes disulfuro. La NGF humana madura y correctamente plegada se caracteriza por tres puentes disulfuro (que unen las posiciones 136 ↔ 201, 179 ↔ 229, 189 - 231, los números de posición se refieren a SEQ ID NO: 1; véase Wiesmann et al., 1999, Nature, vol. 401, p. 184-188). Sin querer estar atado a una teoría particular, se prefiere que el polipéptido según la presente invención comprenda puentes disulfuro equivalentes (cuyos números de posición están disponibles para el experto alineando el polipéptido según la presente invención con el polipéptido de SEQ ID NO: 1 y Wiesmann et al., supra.

Descripción de la presencia y ausencia de efectos adversos

Preferentemente, el tratamiento y/o la prevención no causan efectos secundarios o adversos en el sujeto al que se administra o se ha administrado el polipéptido. De este modo, preferentemente, la administración del polipéptido de la invención no es causante de ningún efecto indeseado en el sujeto mamífero.

- 5 Un efecto secundario o adverso que preferentemente está ausente en este contexto es la hiperalgesia o dolor. Se prefiere específicamente que el tratamiento y/o prevención según la presente invención no cause hiperalgesia en el sujeto mamífero. De este modo, preferentemente, la administración del agente según la presente invención no induce ningún síndrome hiperalgésico (dolor).

- 10 Es importante señalar que la ausencia de dolor no sólo provoca un tratamiento más agradable (o menos desagradable) que la administración de un compuesto de referencia asociado con el dolor (tal como el NGF de tipo salvaje), sino que es, al menos en parte, causante del éxito del tratamiento o la prevención de los trastornos oculares como tales: considerando que el polipéptido según la presente invención se administra preferentemente por vía tópica, más preferentemente por vía tópica sobre el ojo, la ausencia de dolor permitirá al sujeto tratado aceptar la administración del polipéptido sin reacciones adversas tales como rasparlo o lavarlo
- 15 o retirarlo de otro modo para evitar el dolor, y como resultado de ello, el polipéptido ejercerá un efecto terapéuticamente beneficioso, tal como el tratamiento o la prevención del trastorno ocular. De este modo, la ausencia de dolor asociada al polipéptido de la presente invención será adecuada para superar las reticencias de los consumidores y las preocupaciones de las autoridades reguladoras. En otras palabras, la ausencia de dolor se asocia a un aumento significativo de la proporción beneficio-riesgo en comparación con los agentes
- 20 que se asocian a dolor.

En particular, preferentemente, el tratamiento y/o la prevención no causan hiperalgesia en el sujeto mamífero. En una realización, el sujeto al que se administra el polipéptido de la invención no padece alodinia mecánica. Más concretamente, no se induce alodinia mecánica en el sujeto al que se administra el polipéptido de la invención, de modo que el sujeto al que se administra el polipéptido no sufre alodinia mecánica.

- 25 Otro efecto secundario o adverso que preferentemente está ausente en este contexto es la malignidad o el cáncer. En particular, la administración del polipéptido de la presente invención a un sujeto preferentemente no está asociada con un crecimiento celular anormal, y aún más preferentemente no está asociada con un crecimiento celular anormal con el potencial de invadir o propagarse a otras partes del cuerpo. Se prefiere particularmente que la administración del polipéptido de la presente invención a un sujeto no esté asociada a
- 30 un cáncer de ojo.

De este modo, en resumen, preferentemente, la administración del polipéptido de la presente invención a un sujeto no se asocia con efectos adversos tales como malignidad y/o dolor.

- 35 Por lo general, la administración del agente según la presente invención es bien tolerada por el sujeto. En particular, preferentemente, la administración del polipéptido según la presente invención no está asociada a la formación de anticuerpos antifármaco en el sujeto. De hecho, como la secuencia de aminoácidos del polipéptido según la presente invención difiere en sólo una o dos posiciones de aminoácidos del NGF humano de tipo salvaje, es plausible que la tolerabilidad inmunológica en humanos sea particularmente ventajosa, y es plausible que la administración del polipéptido de la presente invención no esté asociada con la formación de anticuerpos antifármaco en humanos.

- 40 Preferentemente, la administración según la presente invención influye positivamente en uno o más de los siguientes aspectos: inflamación, deposición de matriz extracelular, innervación y angiogénesis.

Detectabilidad del polipéptido

- 45 Preferentemente, el polipéptido para su uso según la presente invención puede ser reconocido selectivamente por un reactivo específico con respecto al NGF endógeno (por ejemplo, humano). Los términos "reconocido selectivamente" y "detectable" se utilizan indistintamente en la presente memoria y se refieren en general a la identificación específica, preferentemente por medios moleculares, de la proteína, en una muestra biológica.

A este respecto, el polipéptido según la presente invención es preferentemente detectable por un anticuerpo u otra molécula inmunorreactiva.

- 50 Una proteína detectable por un anticuerpo u otra molécula inmunorreactiva también puede denominarse antígeno. En algunas realizaciones, una muestra biológica puede caracterizarse por mostrar -o no mostrar- uno o más antígenos específicos. En el contexto de la presente invención, el polipéptido administrado al sujeto es preferentemente detectable en una muestra biológica obtenida del sujeto tras la administración del polipéptido. Una forma no limitativa de mostrar la presencia de una proteína es por Western Blot, pero otros procedimientos inmunológicos están igualmente comprendidos en el contexto de la presente invención. El propio anticuerpo u
- 55 otra molécula inmunorreactiva está marcado con fluoróforos o es reconocido por un anticuerpo secundario marcado con fluoróforos u otra molécula inmunorreactiva, que se agrega a tal efecto. De este modo en algunos

casos, también se agrega una molécula secundaria que ayuda a la detección, tal como por ejemplo un anticuerpo secundario opcionalmente marcado, para facilitar la detección.

Según la invención, se dice que un antígeno está presente en una muestra biológica si el nivel está por encima del límite de detección y/o si el nivel es lo suficientemente alto como para permitir la unión de anticuerpos específicos del antígeno agregados a la muestra. Según la invención, se dice que un antígeno no se expresa en una célula si el nivel de expresión está por debajo del límite de detección y/o si el nivel de expresión es demasiado bajo para permitir la unión por anticuerpos específicos del antígeno agregados a la célula.

Un anticuerpo u otra molécula inmunorreactiva puede reconocer un epítipo en la célula. El término "epítipo" se relaciona con un determinante antigénico en una molécula tal como un antígeno, es decir, a una parte o fragmento de la molécula que es reconocido, es decir, unido, por el sistema inmunitario, por ejemplo, que es reconocido por un anticuerpo u otra molécula inmunorreactiva. La detección de un epítipo específico para cualquier antígeno concreto permite normalmente concluir que ese antígeno concreto se expresa en la célula analizada.

En una realización, una muestra obtenida de un sujeto, en particular el sujeto al que se ha administrado el polipéptido según la presente invención, puede caracterizarse mediante inmunofenotipado. "Inmunofenotipado" significa generalmente que la célula o la muestra puede caracterizarse por medio de moléculas específicas de antígeno, tales como anticuerpos u otras moléculas inmunorreactivas, que se agregan a la muestra para determinar si un antígeno está presente. El inmunofenotipado incluye la clasificación de células mediante diversos procedimientos, incluida la citometría de flujo, así como procedimientos analíticos en células lisadas y muestras lisadas, tales como transferencia Western.

En la presente invención, se prefiere particularmente un polipéptido que pueda detectarse específicamente incluso en presencia de NGF de tipo salvaje, tal como NGF humano de tipo salvaje. Mientras que cualquier mutación de una secuencia de aminoácidos, tal como cualquier mutación puntual, por ejemplo, puede hacer que un polipéptido sea específicamente detectable incluso en presencia del respectivo polipéptido de tipo salvaje no mutado, y por lo tanto cada uno de los polipéptidos de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la presente invención) y el polipéptido de SEQ ID NO: 4 puede detectarse específicamente a primera vista incluso en presencia de NGF humano de tipo salvaje. Se trata en particular del polipéptido de SEQ ID NO: 4 para el que se dispone de un anticuerpo que puede distinguir dicho polipéptido del NGF humano de tipo salvaje (WO 2008/006893 A1).

De este modo, preferentemente el polipéptido se caracteriza por al menos la ausencia de prolina (que está presente en la posición 61 de SEQ ID NO: 2, como referencia) en la posición 61, más preferentemente mediante la sustitución de la prolina en la posición 61 por otro aminoácido. En una realización particularmente preferida, la prolina en la posición 61 se sustituye por serina. El polipéptido para su uso según la presente invención es el polipéptido de SEQ ID NO: 4. Este polipéptido se caracteriza por al menos la ausencia de prolina en la posición 61, más preferentemente por la sustitución de la prolina en la posición 61 por otro aminoácido. En SEQ ID NO: 4, prolina en la posición 61 de SEQ ID NO: 3 se sustituye por serina.

Trastorno oftálmico

Según la presente invención, el polipéptido de SEQ ID NO: 4 es para el uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno oftálmico.

El trastorno oftálmico puede ser hereditario y/o adquirido.

En algunas realizaciones, el trastorno oftálmico es o comprende una lesión ocular. En una realización, la lesión ocular comprende un daño y/o trastorno del nervio óptico y/o de la retina.

Aunque términos como "trastorno oftálmico", "daño", "trastorno", "ojo", "nervio óptico", "retina" y otros términos se utilizan en la presente memoria en singular, la presente invención también es aplicable a sujetos que tienen múltiples trastornos oftálmicos, daños, trastornos, y a la administración a, y tratamiento de, todos (ambos) ojos, todos (ambos) nervios ópticos y todas (ambas) retinas de los sujetos.

Los trastornos preferidos a tratar o prevenir según la presente divulgación son enfermedades implicadas en la vía óptica. En general, la vía óptica incluye la retina, el nervio óptico, el quiasma óptico, las radiaciones ópticas y la corteza occipital. De este modo, los trastornos preferidos que deben tratarse o prevenirse según la presente divulgación son los trastornos que afectan a uno o más de la retina, el nervio óptico, el quiasma óptico, las radiaciones ópticas y la corteza occipital. Los daños a lo largo de la vía óptica pueden causar diversos defectos del campo visual. Estos defectos del campo visual pueden tratarse o prevenirse. De este modo, la presente divulgación también contempla el tratamiento y/o prevención de defectos del campo visual, incluyendo la pérdida parcial y completa de visión.

Los trastornos oftálmicos incluyen, sin limitación, fatiga visual, ojos rojos, ceguera nocturna, ojo vago, ojos bizcos (estrabismo), nistagmo, daltonismo, uveítis, presbicia, visión borrosa, dolor ocular, sensibilidad a la luz,

moscas volantes, sequedad ocular, exceso de lagrimeo, cataratas, glaucoma, trastornos retinianos, conjuntivitis, trastornos de la córnea, dolor ocular, problemas en los párpados, cambios en la visión, visión reducida, problemas asociados a las lentes de contacto, trastornos asociados a un daño y/o trastorno del nervio óptico y trastornos asociados a un daño y/o trastorno de las células ganglionares de la retina. El polipéptido según la presente invención puede administrarse a un sujeto que sufra un daño y/o trastorno del nervio óptico y trastornos asociados con un daño y/o trastorno de las células ganglionares de la retina, con el fin de tratar el trastorno respectivo. Alternativa o adicionalmente, el polipéptido según la presente invención puede administrarse a un sujeto en riesgo de sufrir un daño y/o trastorno del nervio óptico y trastornos asociados con un daño y/o trastorno de las células ganglionares de la retina, con el fin de prevenir el trastorno respectivo. La presente invención también es aplicable, sin limitación a la lista de enfermedades que incluyen glaucoma, queratitis neurotrófica, neuritis óptica, atrofia del nervio óptico, drusas de la cabeza del nervio óptico y glioma de la vía óptica. Las neuropatías del nervio óptico a las que es aplicable la presente invención incluyen, sin limitación, las siguientes: glaucoma, queratitis neurotrófica, neuritis óptica, atrofia del nervio óptico, drusas de la cabeza del nervio óptico y glioma de la vía óptica.

El polipéptido según la presente invención se utiliza en el tratamiento y/o prevención de un trastorno oftálmico que afecta al nervio óptico. En algunas realizaciones, el nervio óptico está dañado o afectado. Como se muestra, por ejemplo, en el ejemplo 4, el polipéptido de la presente invención, cuando se administra en una realización de la presente invención, tiene un efecto curativo directo sobre tales trastornos oftálmicos. De este modo, preferentemente, el trastorno oftálmico que se va a tratar y/o prevenir mediante el uso del polipéptido según la presente invención implica un daño y/o trastorno del nervio óptico. En la presente memoria se describen sujetos que padecen tales daños y/o trastornos del nervio óptico, y la presente invención y la siguiente descripción de daños y/o trastornos específicos que afectan al nervio óptico son aplicables a todos esos sujetos, a menos que el contexto indique lo contrario. Los trastornos que implican un daño y/o trastorno del nervio óptico incluyen, sin limitación, glaucoma, queratitis neurotrófica, neuritis óptica, atrofia del nervio óptico, drusas en la cabeza del nervio óptico y glioma de la vía óptica. La presente invención comprende el tratamiento y/o prevención de todos estos trastornos, así como de otros trastornos que afectan al nervio óptico. En tales realizaciones, el agente según la presente invención se proporciona para el uso en el tratamiento de la prevención de un desorden que implica un daño y/o un trastorno del nervio óptico.

También se describe el uso del polipéptido en el tratamiento y/o prevención de un trastorno oftálmico que afecta a la retina. En algunas realizaciones, la retina está dañada o afectada. La retina es la capa más interna de tejido sensible a la luz del ojo de los mamíferos. El ojo crea ópticamente una imagen bidimensional enfocada del mundo visual en la retina, que traduce esa imagen en impulsos neuronales al cerebro para crear la percepción visual. La retina neural está formada por varias capas de neuronas interconectadas por sinapsis y se apoya en una capa externa de células epiteliales pigmentadas (células fotorreceptoras). El trastorno oftálmico puede caracterizarse por un trastorno de la retina. Por ejemplo, el trastorno puede estar causado por un trastorno de la retina neural y/o de las células epiteliales de la retina. Los trastornos retinianos preferidos incluyen la degeneración macular (relacionada con la edad o no relacionada con la edad), la retinopatía (retinopatía diabética o no), la retinosis pigmentaria, el retinoblastoma, la distrofia de conos y bastones (CORD, por sus siglas en inglés y el desprendimiento de retina (separación de la retina), la retinosis pigmentaria se hereda normalmente y provoca la pérdida de la visión nocturna y de la visión periférica. La degeneración macular se caracteriza por la pérdida de visión central debido a la muerte o deterioro de las células de la mácula. En la separación de la retina, ésta se desprende de la parte posterior del globo ocular. Tanto la retinopatía hipertensiva como la retinopatía diabética se caracterizan por el daño de los pequeños vasos sanguíneos que irrigan la retina y, en algunos casos, está causada por la diabetes mellitus. El retinoblastoma es un cáncer de retina. En algunos casos, el nervio óptico está físicamente dañado o afectado, tal como el aplastamiento del nervio óptico (ONC, Ejemplo 4) y el glioma de la vía óptica.

La presente divulgación también describe el uso del polipéptido en un sujeto que padece neuropatía. Un sujeto puede padecer neuropatía, como en particular neuropatía del nervio óptico. Estos sujetos pueden ser diabéticos o no diabéticos. La neuropatía puede ser local o sistémica. La reducción de la neuropatía puede ser local y/o sistémica. La reducción de la neuropatía incluye la reducción de la neuropatía ocular. Las neuropatías del nervio óptico incluyen, sin limitación, las siguientes: glaucoma, glioma de la vía óptica, neuropatía óptica isquémica anterior, neuropatía óptica postraumática, atrofia óptica posthidrocefalia, degeneración transináptica de las fibras del nervio óptico, compresión de la vía quiasmática preóptica, atrofia óptica autosómica dominante, neuropatía óptica hereditaria de Leber, neuropatía óptica del síndrome de Wolfram. La administración a niños está contemplada explícitamente en la invención, en particular pero no limitada a las siguientes afecciones: glioma de la vía óptica y atrofia óptica post hidrocefalia.

El polipéptido según la presente invención es para el uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno oftálmico que implica células ganglionares retinianas. En algunas realizaciones, las células ganglionares de la retina están dañadas o afectadas. Tales enfermedades han sido descritas, por ejemplo, por Garcia et al., 2016, Cytokine Growth Fact. Rev., vol. 34, p. 1359-1601 y por Levin et al., 2002, Progr. Retin. Eye Res., vol. 21, p. 465-484). En general, una célula ganglionar de la retina (RGC) es un tipo de neurona situada cerca de la superficie interna (la capa de células ganglionares) de la retina del ojo. Sin embargo, todas las células ganglionares de la retina tienen también un largo axón que se extiende hasta el cerebro. Estos axones forman el nervio óptico, el

quiasma óptico y el tracto óptico. De este modo, muchos trastornos que afectan al nervio óptico son también enfermedades que afectan a las células ganglionares de la retina, y viceversa. Estos términos no se excluyen mutuamente. Del mismo modo, muchos trastornos que afectan a la retina son también enfermedades que afectan a las células ganglionares de la retina, y viceversa. Estos términos no se excluyen mutuamente. Los trastornos que implican un daño y/o trastorno de las células ganglionares de la retina incluyen, sin limitación, glaucoma, glioma de la vía óptica, neuropatía óptica isquémica anterior, neuropatía óptica postraumática, atrofia óptica posthidrocefalia, degeneración transsináptica de las fibras nerviosas ópticas, compresión de la vía quiasmática preóptica, atrofia óptica autosómica dominante, neuropatía óptica hereditaria de Leber, neuropatía óptica del síndrome de Wolfram. La administración a niños está contemplada explícitamente en la invención, en particular pero no limitada a las siguientes afecciones: glioma de la vía óptica y atrofia óptica post hidrocefalia. En algunas realizaciones, los RCG están físicamente dañados o afectados, tales como el aplastamiento del nervio óptico (ONC, Ejemplo 4) y el glioma de la vía óptica. La presente invención comprende el tratamiento y/o prevención de todos estos y otros trastornos que implican daño y/o trastorno de las RGC. En tales realizaciones, el agente según la presente invención se proporciona para su uso en el tratamiento de la prevención de un trastorno que implica un daño y/o un trastorno de RGC.

Las enfermedades oftálmicas más preferidas que se van a tratar y/o prevenir según la presente invención se seleccionan de la lista que consiste en glaucoma, queratitis neurotrófica, neuritis óptica, atrofia del nervio óptico, drusas de la cabeza del nervio óptico y glioma de la vía óptica.

Sujetos para los que el agente según la presente invención es particularmente adecuado

Según la presente invención, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 puede administrarse a un sujeto que necesite tal administración. Un sujeto que necesite tal administración puede ser un sujeto que padezca un trastorno descrito en la presente memoria, un sujeto en riesgo de padecer dicho trastorno, o que padezca dicho trastorno. El agente se administra al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ser determinada por el médico a la vista de la divulgación en la presente invención.

En particular, el polipéptido según la invención se administra a un sujeto mamífero. El sujeto también puede denominarse "paciente". Lo más preferible es que el sujeto mamífero sea un ser humano.

El sujeto puede ser un sujeto adulto o un sujeto no adulto, tal como un niño o un adolescente. La administración a niños se contempla explícitamente en la invención.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para tratar a un paciente que padece un trastorno oftálmico, en el que el procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la presente invención) o el polipéptido de SEQ ID NO: 4 al paciente. Los términos "paciente" y "sujeto" se utilizan indistintamente en la presente memoria, en particular con referencia a un paciente/sujeto caracterizado por un trastorno oftálmico, como se describe en la presente memoria.

El trastorno oftálmico se caracteriza por un daño y/o trastorno del nervio óptico y/o de las células ganglionares de la retina del sujeto. Tales daños y/o trastornos incluyen el mal funcionamiento y la reducción de la función de las células ganglionares de la retina. Los trastornos caracterizados por un daño y/o trastorno del nervio óptico y/o de las células ganglionares de la retina se han descrito anteriormente, por ejemplo, y la siguiente descripción de los sujetos es aplicable a todos esos daños y/o trastornos en tales sujetos, a menos que el contexto indique lo contrario.

En el contexto de la presente invención, el término "prevenir" debe entenderse en sentido amplio e incluye no sólo la prevención de la aparición del trastorno, sino también la prevención de la progresión del trastorno. En particular, en el contexto de un trastorno que implique un daño y/o trastorno del nervio óptico, el término "prevenir" también incluye la prevención de una mayor progresión del daño del nervio óptico.

En el contexto de la presente invención, el término "tratar" debe entenderse en sentido amplio e incluye sin limitación la mejora de los síntomas del trastorno. De hecho, se prefiere y también se demuestra por los ejemplos experimentales expuestos en la presente memoria que conseguir la mejora del trastorno oftálmico, como por ejemplo la restauración (parcial) de la visión u otra mejora o mejora de la afección o trastorno, es una parte integral preferida de la invención tal como se reivindica en la presente memoria. De hecho, lograr el efecto terapéutico reivindicado es una característica técnica funcional de la presente invención. Los ejemplos expuestos en la presente memoria hacen plausible que dicha característica técnica funcional sea alcanzable como resultado directo de la administración del polipéptido de la presente invención. En otras palabras, los presentes inventores han identificado que el polipéptido de la presente invención es causante de lograr una mejoría en un sujeto que padece un trastorno oftálmico. El trastorno oftálmico se caracteriza preferentemente por un daño y/o trastorno del nervio óptico.

La presente invención es particularmente adecuada para un subgrupo de sujetos que padecen un trastorno oftálmico. Tales subgrupos se describen en la presente memoria. También es posible que un sujeto concreto pertenezca a uno o más de los subgrupos descritos en la presente memoria; la administración del polipéptido

según la presente invención a sujetos que pertenezcan a uno de los subgrupos descritos en la presente memoria está igualmente comprendida en la presente invención como la administración del polipéptido según la presente invención a sujetos que pertenezcan a más de uno de los subgrupos descritos en la presente memoria.

- 5 La invención no se limita a causas particulares de daño y/o trastorno del nervio óptico. Las causas mecánicas del daño y/o trastorno del nervio óptico están comprendidas en la invención, así como las causas no mecánicas del mismo. Además, las causas diabéticas del daño y/o trastorno del nervio óptico están comprendidas en la invención, así como las causas no diabéticas del mismo.

- 10 En algunas realizaciones, el polipéptido según la presente invención es opcionalmente para administración a un sujeto que ha sido sometido a cirugía. De acuerdo con lo anterior, el polipéptido según la presente invención es adecuado para tratar o prevenir la una o más complicaciones postoperatorias en el ojo. Alternativamente, el polipéptido según la presente invención también es adecuado para prevenir la cirugía en un sujeto. Por ejemplo, en el glioma de la vía óptica, el nervio óptico puede fortalecerse mediante la administración del polipéptido de la invención, y esto puede hacer que la cirugía sea innecesaria o prescindible. De este modo, la presente
15 invención también proporciona una administración no invasiva.

La presente invención es adecuada para tratar trastornos oftalmológicos, como en particular daños y/o trastornos del nervio óptico en sujetos diabéticos y no diabéticos. Más adelante se describen con más detalle los daños y/o trastornos del nervio óptico.

- 20 Pueden producirse trastornos oftálmicos en sujetos diabéticos. Tales trastornos oftálmicos pueden tratarse y/o prevenirse basándose en la presente invención.

En algunas realizaciones, el mamífero al que se administra el polipéptido de la invención, preferentemente un humano, padece diabetes mellitus o tiene predisposición a padecer diabetes mellitus; el sujeto respectivo se denomina en la presente memoria "sujeto diabético".

- 25 La diabetes mellitus es una enfermedad común y debilitante que afecta a diversos órganos. Los procedimientos para detectar la diabetes son bien conocidos en la técnica. Los procedimientos de detección de la diabetes, en una realización, no forman parte de la presente invención, pero pueden facilitar el tratamiento o la prevención de un trastorno oftálmico de acuerdo con la presente invención.

En realizaciones típicas, la diabetes mellitus se selecciona entre la diabetes mellitus de tipo 1 y la diabetes mellitus de tipo 2.

- 30 Opcionalmente, el trastorno oftálmico comprende un trastorno causado por la diabetes mellitus o que implica de otro modo la diabetes mellitus. De este modo, la presente invención es aplicable tanto a sujetos que padecen diabetes mellitus como a sujetos que no padecen diabetes mellitus. En algunas realizaciones, el agente según la presente invención es para la administración a un sujeto diabético. De este modo, el polipéptido según la invención puede administrarse al ojo en un sujeto diabético. De este modo, en una realización, el uso del
35 polipéptido según la presente invención comprende la administración al ojo de un sujeto diabético.

De este modo, la presente invención proporciona un tratamiento y/o prevención a afecciones oftálmicas en un sujeto afectado por diabetes. De hecho, según la presente invención, un tratamiento médico eficaz no sólo puede ayudar a los pacientes a recuperarse de estas complicaciones oculares, sino que también puede conducirlos a una mejor calidad de vida y a una reducción de los cuidados y/o gastos médicos.

- 40 De este modo, la presente invención proporciona una ventaja sobre los procedimientos de tratamiento actuales, que a menudo pueden no ser capaces de proporcionar un procedimiento eficaz para tratar trastornos oftálmicos. La presente invención proporciona un tratamiento y/o prevención de tales trastornos oftálmicos.

Administración en el ojo

- 45 El tratamiento o la prevención según la presente invención puede llevarse a cabo mediante la administración, preferentemente tópica, del polipéptido de la invención. Según la presente invención, el ojo del sujeto es el lugar preferente de administración del polipéptido de la invención. En general, cuando en la presente memoria se dice que el polipéptido se administra en el ojo de un sujeto, dicha administración puede ser en la superficie del ojo o en el interior del ojo, a menos que el contexto indique lo contrario.

- 50 Preferentemente, el polipéptido se administra en el ojo. Más preferentemente, la administración se selecciona del grupo que consiste en la administración tópica al ojo y la administración intravítrea, siendo la administración tópica al ojo la más preferida.

En realizaciones preferidas, el agente según la presente invención es para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno que implique un daño y/o trastorno del nervio óptico, y para ello, se administra al

ojo. Según la presente invención, el polipéptido es adecuado para el tratamiento o prevención de daños y/o trastornos del nervio óptico, y para tales fines, se administra al ojo.

- 5 La presente invención no se limita a los sujetos que tienen un trastorno oftálmico en un solo ojo, ni a los que tienen un trastorno oftálmico en ambos ojos. De este modo, los términos "ojo" y "nervio óptico", independientemente de su uso en singular o plural en la presente divulgación, incluyen explícitamente todas las realizaciones en singular y plural.

En algunas realizaciones, la administración se lleva a cabo en un hospital. En algunas realizaciones, el tratamiento no se lleva a cabo en un hospital. Por ejemplo, la administración de un colirio no suele requerir la hospitalización del sujeto.

- 10 De manera opcional pero no mutuamente excluyente, el trastorno oftálmico comprende al menos una lesión mecánica. De este modo, la presente invención también comprende el tratamiento o la prevención de lesiones mecánicas, siendo el tratamiento de dichas lesiones prácticamente más significativo que la prevención. Entre estos trastornos se incluyen los que afectan al aplastamiento del nervio óptico (ONC) y otros trastornos que afectan al nervio óptico.

- 15 En resumen, y como se detalla en la presente memoria, según la presente invención, el polipéptido se administra al ojo de un sujeto que padece o corre el riesgo de padecer un trastorno oftálmico.

En otra realización el agente según la presente invención está para el tratamiento o la prevención de cánceres en el ojo, tal como sin la limitación glioma óptico del camino, y/o de trastornos del ojo asociados a tales cánceres.

- 20 En otra realización, el agente según la presente invención es para el tratamiento o prevención de un trastorno oftálmico que resulta de un trastorno genético en el sujeto o está influenciado por un trastorno genético en el sujeto.

Vía de administración

La presente invención proporciona un polipéptido heterólogo para su administración a un sujeto.

- 25 Preferentemente, el polipéptido es para administración tópica. De este modo, preferentemente, el polipéptido de la invención se administra en el ojo. En algunas realizaciones, el polipéptido se administra por vía intravítrea. En algunas realizaciones, el polipéptido se administra por vía tópica en el ojo.

- 30 Más preferentemente, el polipéptido se administra sobre la superficie del ojo. En otras palabras, el polipéptido según la presente invención se administra preferentemente por vía tópica, más preferentemente por vía tópica sobre el ojo. Más preferentemente, el polipéptido se administra sobre la conjuntiva del sujeto. La administración en la conjuntiva del sujeto también se denomina administración "conjuntival". La administración conjuntival se lleva a cabo preferentemente mediante colirios.

- 35 La administración según la presente invención por lo general no implica la cirugía del sujeto. En una realización, la administración del polipéptido de la invención no comprende ni abarca una etapa invasiva que represente una intervención física sustancial en el cuerpo que requiera conocimientos médicos profesionales para llevarse a cabo y que conlleve un riesgo sustancial para la salud incluso cuando se lleve a cabo con el cuidado y los conocimientos profesionales requeridos. Por el contrario, en realizaciones más típicas, la administración del polipéptido de la invención, en particular la administración tópica, se considera generalmente segura para el sujeto y, por lo tanto, el polipéptido puede ser administrado por el propio sujeto, particularmente en el caso de un sujeto humano.

- 40 Opcionalmente, el ojo se cubre con un emplasto y/o vendaje ocular antes y/o durante y/o después de la administración. La enorme variedad de tipos de emplastos y/o apósitos oculares disponibles no está limitada por la presente invención. De este modo, se puede utilizar cualquier emplasto y/o apósito ocular a menos que técnicamente sea claramente inadecuado. Se prefieren los emplastos y/o apósitos oculares adecuados para cubrir el ojo. En algunas realizaciones, el polipéptido según la invención se administra simultáneamente a la aplicación de un emplasto o apósito ocular; opcionalmente, el emplasto o apósito ocular comprende el polipéptido de la invención, opcionalmente en forma de un medio acuoso aplicado al apósito ocular antes de la administración.

- 45 En una realización alternativa y más preferida, el polipéptido se administra repetidamente. En una realización particularmente preferida, el polipéptido se administra repetidamente de una a cinco veces al día. En una realización, el polipéptido se administra una vez al día. En una realización, el polipéptido se administra dos veces al día. En una realización, el polipéptido se administra tres veces al día (véase también el ejemplo 4). En una realización, el polipéptido se administra cuatro veces al día. En una realización, el polipéptido se administra cinco veces al día. Se prefiere especialmente que el polipéptido se administre a un sujeto humano dos veces al día. Todas las administraciones antes mencionadas se repiten preferentemente a lo largo de varios días,

como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, el polipéptido puede administrarse repetidamente durante un período de tres a 30 días, preferentemente de siete a 14 días, y preferentemente de una a cinco veces por cada uno de estos días.

- 5 Preferentemente, el agente según la presente invención, cuando se administra al ojo como se describe en la presente memoria, no causa un síndrome hiperalgésico (dolor). De este modo, el agente según la presente invención puede entrar en contacto con fibras nociceptivas (nervios), incluido el nervio óptico, sin causar un síndrome hiperalgésico (dolor). Por esta y otras razones, la presente invención proporciona una gran ventaja, en particular para el tratamiento y/o prevención de trastornos que afectan al nervio óptico.

Momento de la administración

- 10 En general, el polipéptido según la presente invención se administra repetidamente o en una única administración.

En una realización, el polipéptido se administra en una única administración. En esa realización, el polipéptido se administra en una única administración, y la administración se interrumpe después de esa única administración.

- 15 En una realización alternativa, el polipéptido se administra repetidamente durante un periodo de tres a 30 días, preferentemente de siete a 14 días. Opcionalmente, la administración se interrumpe tras la finalización de dicho intervalo.

- 20 En una realización, el polipéptido se administra repetidamente. En una realización, el polipéptido se administra repetidamente, por ejemplo, hasta la curación completa del trastorno oftálmico, o al menos hasta que se observe una mejoría de los síntomas del trastorno. Alternativamente, el polipéptido se administra repetidamente durante un periodo de tres a 30 días, preferentemente de siete a 14 días. Opcionalmente, la administración se interrumpe tras la finalización de dicho intervalo. En una realización particularmente preferida, el polipéptido se administra repetidamente al menos tres veces al día.

Preferentemente, el polipéptido se administra tras un daño del nervio óptico.

- 25 Preferentemente, el polipéptido se administra lo antes posible tras el diagnóstico de daño del nervio óptico para minimizar la extensión de la muerte de las RGC. "Lo antes posible" incluye las realizaciones de un día o menos después del diagnóstico de la lesión del nervio óptico. Sin embargo, el polipéptido sigue siendo neuroprotector si se administra días después de que se produzca el daño del nervio óptico. Preferentemente, el polipéptido se administra al menos tres días después de la inducción de una lesión del nervio óptico. Preferentemente, el polipéptido se administra al menos cuatro días después de la inducción de una lesión del nervio óptico. Preferentemente, el polipéptido se administra al menos cinco días después de la inducción de una lesión del nervio óptico. Preferentemente, el polipéptido se administra al menos seis días después de la inducción de una lesión del nervio óptico. Preferentemente, el polipéptido se administra al menos siete días después de la inducción de una lesión del nervio óptico. Preferentemente, el polipéptido se administra al menos ocho días después de la inducción de una lesión del nervio óptico. Preferentemente, el polipéptido se administra al menos nueve días después de la inducción de una lesión del nervio óptico. Preferentemente, el polipéptido se administra al menos diez días después de la inducción de una lesión del nervio óptico. Sin embargo, lo más preferible es que el polipéptido se administre al menos cuatro días después de la inducción de una lesión del nervio óptico. En todas estas realizaciones anteriores, "al menos (número) días después de la inducción del daño" significa, en el caso de administración repetida, que la primera dosis se administra después del número de días indicado. Opcionalmente, pueden administrarse otras dosis más tarde, en el mismo día y/o en días posteriores, de acuerdo con la presente divulgación.

Dosis

- 45 Los agentes y composiciones descritos en la presente memoria se administran en cantidades eficaces. Según la presente invención, una "cantidad eficaz" es la cantidad o dosis que consigue una reacción deseada o un efecto deseado, ya sea sola o junto con otras dosis. En el caso del tratamiento de un trastorno concreto, la reacción deseada se refiere preferentemente a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende ralentizar el progreso de la enfermedad y, preferentemente, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una afección también puede comprender un retraso de la aparición o una prevención de la aparición de dicha enfermedad o dicha afección. En algunas realizaciones, la reacción deseada comprende la curación completa de los síntomas del trastorno, a nivel local y/o sistémico.

- 55 Una cantidad eficaz de un agente o composición descrita en la presente memoria dependerá de la afección o trastorno que se va a tratar, la gravedad del trastorno, los parámetros individuales del sujeto al que se administra el agente, tales como la edad, la afección fisiológica, la afección o afecciones acompañantes (si están presentes), el tamaño y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia acompañante (si está presente), la vía específica de administración y otros parámetros. De acuerdo con lo anterior, las dosis administradas de

los agentes descritos en la presente memoria pueden depender de varios de dichos parámetros. En caso de que la reacción de un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, pueden utilizarse dosis más altas (o dosis efectivamente más altas conseguidas por una vía de administración diferente y más localizada).

Según la presente invención, las dosificaciones adecuadas y terapéuticamente eficaces para la administración de un agente terapéutico para su administración a un sujeto humano para el tratamiento y/o prevención de un ojo pueden determinarse basándose en dosificaciones adecuadas y terapéuticamente eficaces determinadas experimentalmente para la administración de un agente terapéutico para su administración a un sujeto roedor, en particular, un ratón, para el tratamiento y/o prevención de un trastorno ocular.

Los modelos animales (Ejemplo 4) son útiles para establecer las respuestas farmacológicas, así como para evaluar las toxicidades potenciales de los productos de tratamiento. En algunas realizaciones, la dosis que se administra al sujeto es una dosis como la descrita en el ejemplo 4, en el ejemplo 5 o en el ejemplo 6.

Preferentemente, la dosis del polipéptido se determina al inicio del tratamiento o antes. En una realización, la dosificación se ajusta para la(s) administración(es) posterior(es), dependiendo de la progresión del tratamiento. En una realización alternativa, la dosificación no se ajusta para la(s) administración(es) posterior(es), de modo que las dosificaciones subsiguientes corresponden a la primera dosis.

El polipéptido es activo tanto por vía tópica (por ejemplo) conjuntival como por vía intravítrea. Específicamente para la administración tópica (más preferentemente conjuntival) (preferentemente colirios) la dosis preferida/cada dosis tiene una cantidad de 0,3 a 30 µg del polipéptido por ojo, más preferentemente de 1 a 10 µg del polipéptido por ojo, y más preferentemente aproximadamente 5 µg del polipéptido por ojo. Lo más preferible es que estas dosificaciones indicadas sean específicamente para su administración al ojo humano.

Procedimiento de obtención del polipéptido

En una realización, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (que no forma parte de la presente invención) y el polipéptido de SEQ ID NO: 4 puede obtenerse a partir de una fuente biológica. Opcionalmente, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (que no forma parte de la presente invención) y el polipéptido de SEQ ID NO: 4 puede obtenerse mediante expresión recombinante. Para ello, se introduce un marco de lectura abierto que codifica el polipéptido respectivo en una fuente de proteínas recombinantes, por ejemplo una célula hospedadora o un sistema libre de células para la expresión de proteínas. De hecho, teniendo en cuenta que el NGF humano sólo se produce en cantidades ínfimas *in vivo*, el NGF de ratón se produce normalmente como una mezcla heterogénea de diversas proteínas (véase WO 2000/022119 A1), y los polipéptidos de la presente invención no son naturales y, de este modo, no se producen en absoluto *in vivo*, la posibilidad más significativa de producir el polipéptido de la presente invención es mediante expresión recombinante, de acuerdo con sugerencias equivalentes para NGF de tipo salvaje en el estado de la técnica (WO 2000/022119 A1, WO 2008/006893 A1; Rattenholl et al., Eur. J. Biochem, 2001, vol. 268, p. 3296-3303, US 2018/0086805 A1). Sin embargo, ha sido un reto constante obtener tales polipéptidos con un grado de pureza suficiente para su administración a un mamífero. Este reto ha sido superado por la presente invención, como se describe en detalle en este documento (véanse también los ejemplos 1 y 2).

Preferentemente, el polipéptido según la presente invención puede obtenerse por expresión recombinante en bacterias. Más preferentemente, el polipéptido según la presente invención se puede obtener por expresión recombinante citosólica en bacterias. En general, las células bacterianas, en particular *E. coli*, son capaces de producir de forma recombinante elevadas cantidades de proteínas recombinantes, pero, como ocurre con muchos otros genes expresados de forma recombinante, la producción de NGF recombinante y polipéptidos similares en bacterias da lugar a un producto de traducción biológicamente inactivo que se acumula en la célula (citósol) en forma de agregados (los denominados cuerpos de inclusión (IB) (WO 2000/022119 A1; US 2018/0086805 A1). En contraste con el NGF, se sabe que el pro-NGF es bastante inestable y requiere grandes esfuerzos para su repliegamiento y purificación con bajas tasas de recuperación, lo que hace que el procedimiento de producción de NGF a través de pro-NGF en bacterias sea relativamente difícil y caro. De este modo, las principales dificultades asociadas con el NGF producido por bacterias y polipéptidos similares producidos por bacterias, mediante las respectivas proformas, se refieren al plegamiento, el procesamiento y la purificación de la proteína recombinante. Estas dificultades ya se han resuelto (véanse los ejemplos 1 y 2). Como resultado, los polipéptidos de SE ID NO: 3 (no forma parte de la invención) y SEQ ID NO: 4 están disponibles en un grado de pureza adecuado para su administración a un mamífero, incluido el ser humano.

Preferentemente, el polipéptido según la presente invención se expresa junto con una pro-secuencia. Sin limitación, una pro-secuencia adecuada es la pro-secuencia del NGF humano de tipo salvaje (posiciones de aminoácidos 18 a 121 de SEQ ID NO: 1), por lo general fusionado al terminal N del polipéptido de SEQ ID NO: 3 o 4. En el caso del NGF de tipo salvaje, aunque no forma parte del NGF maduro y, por tanto, no es necesaria para la función biológica del NGF, se demostró que la presencia de la pro-secuencia unida covalentemente promueve el repliegamiento del NGF recombinante a partir de cuerpos de inclusión con la formación concomitante de enlaces disulfuro de la parte madura (beta-NGF). De este modo, la presencia de la pro-secuencia unida covalentemente influye positivamente en el rendimiento y la tasa de repliegamiento en

comparación con el replegamiento *in vitro* de NGF maduro a partir de cuerpos de inclusión (Rattenholl et al., Eur. J. Biochem, 2001, vol. 268, p. 3296-3303). Sin querer estar atado a una teoría en particular, lo mismo es plausible y postulado en la presente memoria para el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) y SEQ ID NO:4.

De este modo, cuando el polipéptido según la presente invención se ha producido en cuerpos de inclusión, se requiere un plegamiento correcto, y esto normalmente se logra postraduccionalmente, al igual que la escisión de la pro-secuencia unida covalentemente; en el pasado se han propuesto procedimientos sofisticados para el plegamiento, la escisión y la purificación, en particular para el NGF humano de tipo salvaje. En particular, la mayoría de los estudios publicados sobre el NGF aplican un régimen general de replegamiento establecido previamente por Rattenholl et al. (2001, Eur. J. Biochem, 2010, vol. 268, p. 3296-3303). Dentro de este estudio original, se investigaron en detalle varios parámetros del replegamiento de proteínas (por ejemplo, la temperatura, el tiempo de replegamiento, el pH de la reacción de replegamiento, la concentración de arginina, glutatión y proteínas) y se evaluó su efecto sobre la eficacia del replegamiento. El protocolo de Rattenholl et al. se basa en la re-naturalización de la pro-forma, que tiene una solubilidad muy pobre, obtenible a partir de cuerpos de inclusión tras la producción recombinante en procariotas, mediante la cual el pro-NGF se solubiliza en una solución de un agente desnaturizante en una concentración desnaturizante, se transfiere a una solución no desnaturizante o débilmente desnaturizante, de modo que se mantenga la solubilidad y el pro-NGF desnaturizado disuelto pueda asumir una conformación biológicamente activa, incluida la formación de enlaces disulfuro como en el NGF nativo, y posteriormente se purifique el NGF y se elimine la pro-secuencia proteolíticamente (WO 2000/022119 A1; Rattenholl et al., Eur. J. Biochem, 2001, vol. 268, p. 3296-3303). En particular, en este estudio se observó que una baja concentración de proteína conduce a un mayor rendimiento específico de producto correctamente plegado en comparación con una mayor concentración de proteína. A modo de ejemplo, concentraciones de proteína en torno a 50 mg por litro de reacción de replegamiento dieron lugar a un rendimiento específico de ~ 25 % de pro NGF correctamente plegada, mientras que esta fracción se redujo al 10 % en concentraciones de proteína de 500 mg por litro. Basándose en esto, Rattenholl et al. sugieren que la concentración de proteína en la solución de replegamiento tiene que ser muy baja: según Rattenholl et al., se espera un rendimiento de 15-20 mg de proteína correctamente plegada por litro de reacción de replegamiento. Sin embargo, esto requeriría un aumento de escala (por ejemplo, más allá de la escala de laboratorio) para la purificación de incluso unos pocos cientos de mg de proteína recombinante.

Aunque el pro-NGF humano contiene un sitio nativo de escisión para la proteasa furina (Arg¹-Ser²-Lys³-Arg⁴; R¹S²K³R⁴), y la furina escinde el pro-NGF en ese sitio *in vivo*, la furina no está disponible en pureza o cantidad comercialmente relevante. Según la presente invención, el polipéptido según la presente invención, cuando se expresa junto con una prosecuencia, por ejemplo en *E. coli*, se escinde preferentemente por la proteasa tripsina (EC 3.4.21.4), que está disponible comercialmente. De hecho, para el NGF de tipo salvaje se ha informado de que la tripsina produciría NGF maduro biológicamente activo satisfactorio, que puede purificarse eventualmente (Rattenholl et al., Eur. J. Biochem, 2001, vol. 268, p. 3296-3303), y la proteólisis basada en tripsina del pro-NGF expresado recombinantemente ha sido adoptada entretanto por otros (por ejemplo, D'Onofrio et al., 2011, PLoS One, vol. 6, e20839). Sin embargo, posteriormente se demostró que la escisión del pro-NGF de tipo salvaje con tripsina para producir beta-NGF está asociada a varios inconvenientes, ya que cantidades bajas de tripsina conducirían a una escisión ineficiente, mientras que cantidades altas de tripsina disminuirían aún más la selectividad de la escisión, ya que la tripsina es capaz de escindir en el terminal C cualquier residuo de arginina y lisina (residuo R y K), de modo que mediante la digestión del pro-NGF que contiene R¹S²K³R⁴ por la tripsina, se obtendrían varios productos de digestión alternativos; por tanto, el uso de tripsina como enzima de escisión conduciría a rendimientos muy bajos de NGF correctamente escindida, y a problemas de purificación y rendimiento, ya que los diferentes productos de escisión no se separan económicamente en condiciones estándar. Como solución, se propuso expresar una variante del pro-NGF, en la que el sitio de corte de la proteasa R¹S²K³R⁴ en el pro-péptido se sustituye al menos en las posiciones R¹ y K³ correspondientes a las posiciones 101 y 103 de la secuencia pro-NGF humana de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) por otro aminoácido (WO 2013/092776 A1). En un ejemplo, R¹ y K³, respectivamente, se sustituyen por valina (V) y alanina (A), transformando el sitio de escisión original de furina R¹S²K³R⁴ en V¹S²A³R⁴, en el que la tripsina es capaz de escindir específicamente sólo el terminal C de R⁴; la escisión mediada por tripsina de un pro-NGF respectivo también puede denominarse "procedimiento VSAR". Aunque WO 2013/092776 A1 no dice nada sobre los polipéptidos de SEQ ID NO: 3 o 4 según la presente invención, se ha propuesto inicialmente que el procedimiento VSAR es aplicable a determinadas variantes de muteínas pro-NGF, aunque se informó de que las condiciones de proteólisis debían titularse con cuidado (US 2018/0086805 A1). Al llegar a la presente invención, los presentes inventores descubrieron que la tecnología VSAR, contrariamente a sugerencias anteriores, no resuelve satisfactoriamente los problemas de pureza asociados a la producción recombinante del polipéptido de la presente invención con una pureza satisfactoria. De hecho, la purificación del beta-NGF expresado recombinantemente o de sus muteínas, no sólo de las proteínas de la célula hospedadora (HCP), sino también de la tripsina (u otra proteasa utilizada para la escisión) sigue siendo un reto; no hace falta decir que se requeriría que una enzima proteolítica (como la tripsina) estuviera ausente de una preparación final de una proteína farmacéutica, para evitar la proteólisis durante el almacenamiento del polipéptido, de modo que el polipéptido sea sustancialmente puro y no degradado en el momento de administrarlo a un sujeto, según la presente invención. Los presentes inventores han resuelto este reto, tal y como se describe en la presente

memoria. De este modo, los polipéptidos según SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 están disponibles en alta pureza y, por tanto, esencialmente libres de tripsina y/o de productos de degradación del polipéptido. Aunque determinados procedimientos para la producción de NGF (por ejemplo, WO2013092776 A1) y del polipéptido de SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, Malerba et al., 2015, PLOS One, vol. 10, e0136425) se han descrito previamente, la presente divulgación muestra que, sorprendentemente, los procedimientos previamente publicados son insuficientes para obtener el polipéptido respectivo a alta pureza. Como solución a estas insuficiencias, la presente divulgación proporciona un nuevo procedimiento y aspectos relacionados, como se describe en detalle en la presente memoria.

Un procedimiento para obtener el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) y el polipéptido de SEQ ID NO: 4 a partir de la expresión recombinante, por ejemplo en una célula hospedadora, puede comprender la purificación. Purificación, en el sentido más amplio, significa que el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 se separa de otras moléculas, incluidas otras proteínas, tales como las proteínas de la célula hospedadora. De este modo, la purificación puede incluir la separación de una o más moléculas, incluidas otras proteínas, tales como proteínas de la célula hospedadora, proteasas (por ejemplo, tripsina) y/o productos de degradación del polipéptido según la invención.

El procedimiento para la producción del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) y el polipéptido de SEQ ID NO: 4 según la presente invención comprende preferentemente las siguientes etapas:

(a) obtención de un precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4,

(d) purificación,

y la purificación en la etapa (d) comprende por lo general la purificación en una fase estacionaria de modo mixto. De este modo, en una realización, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 puede obtenerse mediante expresión recombinante y purificación, en la que la purificación comprende la purificación en una fase estacionaria de modo mixto. La expresión "en fase estacionaria de modo mixto" debe entenderse en sentido amplio y significa que una mezcla que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 o precursor de cualquiera de ellos, junto con otras especies moleculares, se expone a una fase estacionaria de modo mixto, por ejemplo, mediante cromatografía u otra etapa de procedimiento adecuada. En efecto, preferentemente una mezcla que comprenda el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 o precursor de cualquiera de ellos, junto con otras especies moleculares, se somete a cromatografía, de modo que la purificación en la etapa (d) comprende la purificación por cromatografía de modo mixto. Preferentemente, la cromatografía de modo mixto comprende el uso de una fase estacionaria que tiene un grupo cargado, preferentemente cargado negativamente, y un grupo aromático y/o un grupo hidrofóbico.

Purificación, en el sentido más amplio, según la presente invención, significa que el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 de la misma está separada, al menos parcialmente, de otras especies moleculares, incluidas otras proteínas, tales como proteínas de células hospedadoras, precursoras y/o productos de degradación. Como resultado, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4, al menos parcialmente purificado. Mientras que las otras especies moleculares pueden ser opcionalmente descartadas o no, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 se obtiene preferentemente y se conserva como resultado de la purificación.

Preferentemente, la cromatografía de modo mixto comprende el uso de una fase estacionaria que tiene un grupo cargado, preferentemente cargado negativamente, y un grupo aromático y/o un grupo hidrofóbico.

Cada una de estas etapas puede comprender a su vez varias acciones que, para simplificar, también pueden denominarse etapas. A título ilustrativo, y como se detalla más adelante, la etapa (d) puede comprender más de una etapa de purificación, por ejemplo, en más de una fase estacionaria.

Cualquier letra o número utilizado en la presente memoria en relación con una o más etapas del procedimiento, tales como por ejemplo (a), (b), (c), (d), (d1), (d2), no debe entenderse como limitativo, sino más bien como referencia. No debe entenderse que la secuencia de eventos en el procedimiento o uso según la presente invención pueda estar limitada por la secuencia alfabética de letras o la secuencia numérica de números. No obstante lo anterior, se prefiere encarecidamente que la secuencia de eventos en el procedimiento o uso según la presente invención sea una secuencia descrita en la presente memoria.

Aspectos adicionales de la cromatografía de modo mixto, particularmente fases estacionarias adecuadas, se describirán con más detalle a continuación, pero estos aspectos son generalmente aplicables a la presente invención. De este modo, en particular, todas las fases estacionarias, incluidas todas las realizaciones de las mismas, que se describen a continuación como particularmente útiles para la cromatografía de modo mixto en la etapa (d2) son generalmente útiles para la purificación del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) y/o el polipéptido de SEQ ID NO: 4 según la presente invención, y puede utilizarse en todo tipo de realizaciones, tal como en combinación con una etapa de (d1) cromatografía de captura o sin ella. En efecto,

el ejemplo 2B describe que pueden lograrse algunas ventajas utilizando cromatografía de modo mixto en una variación de un protocolo según el estado de la técnica.

Opcionalmente, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o el polipéptido de SEQ ID NO: 4 puede obtenerse en un procedimiento que comprende el (re)plegamiento y/o la purificación cromatográfica y/o la digestión por proteasas, y opcionalmente el ajuste a la concentración final de proteína y/o la preparación de una formulación deseada.

De este modo, la administración del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 a un sujeto que lo necesite, tal y como se describe en la presente memoria, gracias a la pureza y el rendimiento industrialmente relevantes del polipéptido de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, que está a disposición del experto basándose en la divulgación de la presente memoria. De este modo, la presente divulgación también describe un procedimiento para la producción del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4.

El procedimiento para la producción del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 según la presente invención comprende preferentemente las siguientes etapas:

(a) obtención de un precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, por ejemplo mediante expresión recombinante,

(d) purificación, en la que la purificación comprende la purificación en una fase estacionaria de modo mixto.

También se prefiere en la presente invención que el precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 se somete a una etapa

(c) exposición a una proteasa.

Dicha exposición se lleva a cabo por lo general antes de la etapa (d).

El procedimiento de la presente invención se caracteriza también preferentemente porque no se realiza ninguna purificación cromatográfica antes de la exposición a la proteasa. De hecho, la presente divulgación (Ejemplos 1, 2) muestra que la digestión con proteasa funciona bien y eficazmente también en una fracción cruda obtenida de una célula hospedadora, es decir, cuando no se ha realizado ninguna purificación cromatográfica antes de la exposición a la proteasa.

Preferentemente, la etapa de obtención (a) comprende la expresión de un precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4, preferentemente de expresión recombinante. Más preferentemente, la expresión recombinante se realiza en una célula hospedadora. Después de cultivar la célula hospedadora, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 se obtiene en una fracción del cultivo celular. La fracción puede consistir en las células hospedadoras, es decir, en caso de que la proteína no sea secretada sustancialmente por las células hospedadoras. Este es el caso, por ejemplo, cuando el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 se produce en cuerpos de inclusión y/o de otro modo en un compartimento intracelular que incluye el citosol. Las células hospedadoras adecuadas pueden seleccionarse entre células hospedadoras procariotas y eucariotas, aunque en las realizaciones típicas se prefieren las células hospedadoras procariotas. Las células hospedadoras procariotas preferidas incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), preferentemente *E. coli* Rosetta (DE3). En una realización, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 se obtiene en una conformación distinta de la conformación nativa y/o en agregados, más preferentemente en cuerpos de inclusión. A continuación, preferentemente el procedimiento de la presente invención comprende una etapa (b) de (re)plegamiento del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4. Preferentemente, la etapa (c) se lleva a cabo después de la etapa (b).

Preferentemente, en el etapa (c) la proteasa es una proteasa capaz de escindir el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (que no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 de tal manera que el polipéptido (maduro) de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En una realización particular, dicha proteasa es tripsina, preferentemente tripsina porcina, opcionalmente expresada recombinantemente.

Preferentemente, la etapa de purificación (d) comprende las siguientes etapas, preferentemente en orden secuencial:

(d1) captura,

(d2) pulido.

Preferentemente, la etapa de captura (d1) se lleva a cabo mediante cromatografía, preferentemente cromatografía en columna. Más preferentemente, dicha etapa de captura (d1) se lleva a cabo utilizando una fase estacionaria de cromatografía de intercambio catiónico o una fase estacionaria de cromatografía de modo

mixto. Aún más preferentemente dicha etapa de captura (d1) se lleva a cabo utilizando una fase estacionaria de cromatografía de modo mixto, que es preferentemente Capto MMC.

Preferentemente, la etapa de pulido (d2) se lleva a cabo mediante cromatografía, preferentemente cromatografía en columna. Más preferentemente, dicha etapa de pulido se lleva a cabo utilizando una fase estacionaria de cromatografía de intercambio catiónico. Aún más preferentemente dicha etapa de captura (d1) se lleva a cabo utilizando sefarosa SP, preferentemente sefarosa SP con un tamaño de partícula pequeño. SP es la abreviatura de sulfopropil.

Opcionalmente, el procedimiento según la presente invención comprende una etapa adicional de ajuste a la concentración final de proteína y/o preparación de una formulación deseada. Como resultado, se obtiene una composición según la invención.

En otros términos, la presente invención proporciona cromatografía de modo mixto para la preparación del polipéptido de SEQ ID NO: 3 (que no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4. La cromatografía de modo mixto es útil en la preparación de los polipéptidos. En realizaciones preferidas, el precursor del polipéptido según la invención se expone a una proteasa con el fin de digerirlo, y la cromatografía de modo mixto se utiliza en una etapa posterior a la exposición a la proteasa. En realizaciones preferidas, no se realiza ninguna purificación cromatográfica del polipéptido de la invención antes de dicha exposición a la proteasa.

Pureza del polipéptido

El polipéptido de la invención está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. El polipéptido de la invención se aísla antes de ser administrado. En una realización, el "polipéptido aislado" se refiere al polipéptido que se ha purificado del entorno celular y extracelular, tal como el tejido, que lo rodea en estado natural, por ejemplo, de la célula en la que se ha expresado, como una célula hospedadora. En otra realización, "polipéptido aislado" se refiere al aislamiento y/o purificación *in vitro* de un polipéptido, respectivamente, de su entorno celular natural y de la asociación con otros componentes del entorno en el que el polipéptido reside normalmente.

Preferentemente, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (que no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 para su uso según la presente invención está sustancialmente libre de impurezas. Tal polipéptido ventajosamente puro de SEQ ID NO: 4 se puede obtener como se describe en la presente memoria.

El polipéptido según la invención se considera un péptido o proteína farmacéuticamente activo.

En una realización particularmente ventajosa de la presente invención, el polipéptido según la presente invención se obtiene esencialmente libre de productos de degradación de dicho polipéptido. En particular, la presente divulgación muestra que, contrariamente a los informes sobre NGF humano de tipo salvaje en el estado de la técnica, la exposición de un precursor de SEQ ID NO: 4 a la tripsina escindiría inherentemente parcialmente dicho precursor C terminalmente del residuo 9 arginina (Arg, R) de SEQ ID NO: 4, ya sea antes o después de la purificación, si ésta no elimina completamente la tripsina (variante des-nona, datos no mostrados). Mediante el procedimiento específico de purificación proporcionado en la presente invención, el polipéptido según la presente invención puede obtenerse esencialmente libre de tripsina y/o de la variante des-nona.

Preferentemente, el polipéptido obtenible como se ha descrito anteriormente está esencialmente libre de degradantes del polipéptido. En particular, la presente divulgación hace que el polipéptido de la invención esté disponible con un grado de pureza nuevo y mejorado, y se prefiere que el polipéptido se administre con tal grado de pureza. Preferentemente, el polipéptido de la invención para su uso según la invención se caracteriza por un grado de pureza de al menos el 90 %. Más preferentemente, el polipéptido de la invención para su uso según la invención se caracteriza por un grado de pureza de al menos el 91 %. Más preferentemente, el polipéptido de la invención para su uso según la invención se caracteriza por un grado de pureza de al menos el 92 %. Más preferentemente, el polipéptido de la invención para su uso según la invención se caracteriza por un grado de pureza de al menos el 93 %. Más preferentemente, el polipéptido de la invención para su uso según la invención se caracteriza por un grado de pureza de al menos el 94 %. Más preferentemente, el polipéptido de la invención para su uso según la invención se caracteriza por un grado de pureza de al menos el 95 %. Más preferentemente, el polipéptido de la invención para su uso según la invención se caracteriza por un grado de pureza de al menos el 96 %. Más preferentemente, el polipéptido de la invención para su uso según la invención se caracteriza por un grado de pureza de al menos el 97 %. Más preferentemente, el polipéptido de la invención para su uso según la invención se caracteriza por un grado de pureza de al menos el 98 %. Aún más preferentemente, el polipéptido de la invención para su uso según la invención se caracteriza por un grado de pureza de al menos el 99 %.

Más preferentemente, el polipéptido de la invención para su uso según la invención se caracteriza por un grado de pureza mayor que 99,0 %, tal como un grado de pureza mayor que 99,1 %, mayor que 99,2 %, mayor que 99,3 %, mayor que 99,4 %, mayor que 99,5 %, mayor que 99,6 %, mayor que 99,7 %, mayor que 99,8 %, mayor que 99,9 %.

En la presente memoria, "grado de pureza" se refiere generalmente al porcentaje en peso (w) del polipéptido según la presente invención con respecto al peso (w) de material biológico distinto del polipéptido de la presente invención. A título ilustrativo, en general, a un grado de pureza del 99,0 %, el polipéptido de la presente invención está presente en una cantidad relativa (peso) de 99,0 unidades (por ejemplo, 1,0 mg), y la suma del peso de todo el material biológico distinto del polipéptido de la presente invención es de 1,0 unidades (por ejemplo, 1,0 mg). Tal material biológico distinto del polipéptido de la presente invención incluye, sin limitación, proteínas de la célula hospedadora, ácidos nucleicos, proteasa(s) tales como, por ejemplo, tripsina, inactivada o no, productos de degradación del polipéptido de la invención tales como y otras macromoléculas de origen biológico. En una realización particular, el grado de "pureza" se refiere a la pureza frente a polipéptidos distintos de los polipéptidos de la invención. A título ilustrativo, en dicha realización, con un grado de pureza del 99,0 %, el polipéptido de la presente invención está presente en una cantidad relativa (peso) de 99,0 unidades (por ejemplo, 1,0 mg), y la suma del peso de todos los polipéptidos que no son idénticos al polipéptido de la presente invención es de 1,0 unidades (por ejemplo, 1,0 mg). Los productos de degradación del polipéptido de la presente invención, para evitar dudas, se incluyen en los "polipéptidos que no son idénticos al polipéptido de la presente invención". Un producto de degradación particular es la variante des-nona (véanse los ejemplos 1 y 2).

En particular, esencialmente libre de la variante des-nona del polipéptido. La variante des-nona es un producto de degradación no caracterizado previamente del polipéptido de la presente invención que se asocia con la producción de determinadas variantes de NGF incluyendo el polipéptido de la presente invención, a menos que el polipéptido se produzca por el nuevo procedimiento aquí divulgado (véanse, por ejemplo, los ejemplos 1 y 2). "Esencialmente libre" en este contexto pretende significar que el polipéptido de la invención para su uso según la invención se caracteriza por un grado de pureza, con respecto a la variante des-nona, mayor que 99,0 %, tal como un grado de pureza mayor que 99,1 %, mayor que 99,2 %, mayor que 99,3 %, mayor que 99,4 %, mayor que 99,5 %, mayor que 99,6 %, mayor que 99,7 %, mayor que 99,8 %, mayor que 99,9 %, todo ello con respecto a la variante des-nona. En la realización más preferida, la variante des-nona es indetectable y/o ausente.

También se prefiere que el polipéptido según la presente invención esté esencialmente libre de cualquier proteasa (tal como la tripsina). "Esencialmente libre" en este contexto significa que el polipéptido de la invención para su uso según la invención se caracteriza por un grado de pureza, con respecto a la suma de todas las proteasas (incluida la tripsina), mayor que 99,0 %, tal como un grado de pureza mayor que 99,1 %, mayor que 99,2 %, mayor que 99,3 %, mayor que 99,4 %, mayor que 99,5 %, mayor que 99,6 %, mayor que 99,7 %, mayor que 99,8 %, mayor que 99,9 %, todo ello con respecto a la suma de todas las proteasas (incluida la tripsina). En la realización más preferida, la tripsina es indetectable y/o ausente.

Tal grado de alta pureza, en las realizaciones descritas anteriormente, se asocia con una mejor aceptabilidad por parte de las autoridades reguladoras y califica al polipéptido de la presente invención como un medicamento para su uso en sujetos mamíferos, incluidos los seres humanos, en particular. De este modo, el grado de pureza según la presente invención permite por primera vez el uso de este polipéptido para su administración al ojo, incluido el ojo humano, de forma segura y fiable. El alto grado de pureza con respecto a la proteasa (tripsina) en particular permite el almacenamiento del polipéptido también en forma no congelada.

Composiciones

A continuación, se describirán composiciones que comprenden el polipéptido de la presente invención.

En las composiciones según la presente invención, el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (que no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 está comprendido como principio activo. Pueden incluirse otros ingredientes.

En una realización, el polipéptido se encuentra en un medio acuoso. Dicho medio acuoso es para la administración al sujeto mamífero.

Una composición acuosa particular para su uso según la presente invención es una composición líquida adecuada para su uso como colirios. En general, los colirios son gotas de un líquido adecuado para administrar por vía ocular. El término "colirios" no está particularmente limitado, y generalmente se refiere a una composición, por lo general una composición líquida acuosa, que puede ser administrada al ojo sin causar daño al ojo. En general, los colirios tienen menos riesgo de efectos secundarios que, por ejemplo, los medicamentos orales o los de inyección intravítrea. Por estas y otras razones, se prefieren especialmente los colirios.

De este modo, en una realización, el polipéptido está comprendido en una composición adecuada para su uso como colirios.

Dichos colirios están previsto para su administración al sujeto mamífero. Se prevé el uso de colirios por vía ocular para administrar el agente de la presente invención. Preferentemente, los colirios se administran por vía tópica en el ojo.

Los procedimientos para fabricar colirios son conocidos en la técnica. Sin limitación y a título meramente ilustrativo, en el documento WO 2016/162812 A1 se han descrito procedimientos para fabricar colirios.

En algunas realizaciones, el polipéptido está comprendido en una composición, tal como una composición de colirio, que comprende adicionalmente uno o más portadores y/o uno o más excipientes. El término "portador", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de naturaleza natural o sintética, que se combina con el principio activo para permitir, potenciar o facilitar la aplicación del principio activo. El término "excipiente", como se utiliza en la presente memoria, pretende indicar todas las sustancias que pueden estar presentes en una composición farmacéutica de la presente invención y que no son ingredientes activos como tales.

Preferentemente, la composición según la presente invención comprende al menos agua como excipiente. En algunas realizaciones, la composición según la presente invención comprende medios acuosos, y más preferentemente la composición según la presente invención está en forma de una solución acuosa. En una realización, el polipéptido se incluye en un medio acuoso, y el medio acuoso se administra al sujeto mamífero. El medio acuoso puede ser, por ejemplo, una solución acuosa. Las soluciones acuosas y otras composiciones respectivas, en algunas realizaciones, pueden obtenerse directamente de la purificación de NGF en medios acuosos. Por ejemplo, cuando el agente según la presente invención se obtiene por purificación a partir de una fuente biológica mediante purificación, las composiciones acuosas respectivas pueden obtenerse directamente a partir de la última etapa de purificación, por ejemplo, elución a partir de la última columna cromatográfica (normalmente la etapa de pulido) y/o filtración. Alternativamente, las composiciones respectivas están disponibles a través de una etapa adicional de ajuste a la concentración final de proteína y/o preparación de una formulación deseada. tal etapa adicional puede incluir, por ejemplo, una etapa de clarificación o filtración, como se describe en la presente memoria, y/o la adición de uno o más excipientes y/o uno o más portadores. En la presente memoria se describen, sin limitación alguna, composiciones ejemplares útiles para la presente invención.

De este modo, el polipéptido puede estar presente en una composición, por ejemplo, en una composición farmacéutica. Las composiciones descritas en la presente memoria son preferentemente estériles y contienen preferentemente el polipéptido como péptido o proteína farmacéuticamente activa, y opcionalmente de otros agentes, mencionados o no mencionados en la presente memoria. Las composiciones pueden estar en cualquier estado, por ejemplo, líquidas, congeladas, liofilizadas, etc.

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden comprender sales, sustancias tampón, conservantes, portadores, diluyentes y/o excipientes, todos los cuales son preferentemente farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" describe algo no tóxico y/o que no interactúa con la acción del principio activo de la composición farmacéutica.

Entre las sustancias tampón adecuadas para su uso en la invención se incluyen el ácido acético en una sal, el ácido cítrico en una sal, el ácido bórico en una sal y el ácido fosfórico en una sal. Por ejemplo, es preferible que el polipéptido de la invención, como resultado de los diversos aspectos de la presente invención, pueda obtenerse en un tampón que tenga un pH comprendido entre 4,5 y 6,5, preferentemente entre 5,0 y 6,0. En una realización, un tampón de acetato es un tampón adecuado para tales fines, y por lo tanto es particularmente preferido. De este modo, en una realización, el polipéptido de la invención se obtiene en un tampón acetato que tiene un pH entre 4,5 y 6,5, preferentemente entre 5,0 y 6,0. En particular, se considera que el acetato es un tampón óptimo para estabilizar el NGF y los derivados del mismo en el intervalo de pH comprendido entre pH 5,0 y pH 5,8.

Dado que el NGF, y probablemente también los polipéptidos según la presente invención, es sensible a la oxidación en los residuos de metionina, la metionina se incluye preferentemente en la formulación.

La presente divulgación también se refiere a un polipéptido de SEQ ID NO: 4, en el que la composición se caracteriza por un pH de 5,0 a 6,0 (preferentemente pH 5,5), y comprende lo siguiente:

- a) de 0,2 a 20 mg/ml de dicho polipéptido (preferentemente 2 mg/ml),
- b) tampón de acetato de sodio de 5 a 100 mM (preferentemente 20 mM),
- c) de 5 a 100 mM de metionina (preferentemente 20 mM).

De este modo, preferentemente, el polipéptido está comprendido en una composición que comprende lo siguiente:

- a) 0,2 a 20 mg/ml del polipéptido de la presente invención,
- b) tampón de acetato de sodio de 5 a 100 mM,
- c) de 5 a 100 mM de metionina,

d) pH de 5,0 a 6,0.

Un intervalo de pH más preferido es de 5,0 a 5,8.

Más preferentemente, el polipéptido está comprendido en una composición que comprende lo siguiente:

- a) 2 mg/ml de dicho polipéptido,
- 5 b) tampón acetato de sodio 20 mM,
- c) 20 mM de metionina,
- d) pH 5,5.

Otra formulación preferida dentro de la presente invención es la siguiente:

- 1 mg/ml de polipéptido de SEQ ID NO: 4 (preferido)
- 10 tampón de acetato de Na 10 mM
- 10 mM de Metionina
- 154 mM de NaCl
- 0,1 mg/ml de Polisorbato 80
- pH 5,5

- 15 Se prevé que estas y otras formulaciones sean adecuadas como producto farmacéutico para uso ocular.

Las composiciones anteriores son preferentemente colirios. Las composiciones anteriores son preferentemente acuosas.

La composición (formulación) según la presente invención puede conservarse, sin limitación, según una o más de las siguientes realizaciones:

- 20 – Primera realización: la formulación anterior puede almacenarse congelada a -70 grados C (datos no mostrados), y descongelarse antes de su administración.
- Segunda realización: la formulación anterior puede almacenarse en el frigorífico, preferentemente en el intervalo de temperatura de +2 a + 8 grados C (datos no mostrados).
- 25 – Tercera realización: la formulación anterior puede someterse a secado o liofilización y, a continuación, almacenarse, por ejemplo, a temperatura ambiente (datos no mostrados). Puede reconstituirse antes de la administración.

- 30 Todas las realizaciones anteriores proporcionan determinadas ventajas de la congelación a, por ejemplo, -20 grados C, ya que esto evita el uso de transporte de hielo seco, la necesidad de descongelar y volver a mezclar después de la descongelación, etc. En tales realizaciones, la formulación según la presente invención supera determinados inconvenientes de las formulaciones farmacéuticas de NGF del estado de la técnica, tal como el oxervato (cenegermin) en particular.

En el ejemplo 3 se ejemplifica una composición particularmente preferida para la administración según la presente invención.

- 35 Los conservantes adecuados para su uso en las composiciones según la presente invención incluyen los conocidos en la técnica, entre los que se encuentran, a título ilustrativo pero no limitativo, el alcohol bencílico, el benzalconio y sus sales, el M-cresol, el fenol, el clorobutanol, el parabeno y el timerosal. Estos y otros conservantes se incluyen opcionalmente en la composición según la presente invención.

- 40 De este modo, la presente invención proporciona el polipéptido de SEQ ID NO: 3 (que no forma parte de la presente invención) o SEQ ID NO: 4 para uso terapéutico, es decir, para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. La terapia puede incluir la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad. En vista del potencial de uso terapéutico, dicho polipéptido también puede denominarse proteína o péptido farmacéuticamente activo.

- 45 Opcionalmente, la administración según la presente invención se acompaña de la administración de al menos un agente antimicrobiano, tal como un antibiótico. El agente antimicrobiano puede formar parte de la composición que comprende el polipéptido según la presente invención o, alternativamente, puede

administrarse al sujeto por separado, en el mismo sitio o en otro diferente, por la misma vía de administración o por otra diferente.

Aplicabilidad industrial

- 5 El polipéptido de SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la invención) o SEQ ID NO: 4 descrito en la presente memoria es adecuado para diversos fines, por ejemplo, para aplicaciones terapéuticas como las descritas en la presente memoria.

Los siguientes ejemplos y figuras pretenden ilustrar algunas realizaciones preferidas de la invención y no deben interpretarse como una limitación del alcance de la invención, que se define mediante las reivindicaciones.

Ejemplos

10 Materiales y procedimientos comunes a más de un ejemplo

- 15 A menos que se especifique lo contrario, los siguientes ejemplos experimentales se refieren específicamente al polipéptido de SEQ ID NO: 4 caracterizado, con respecto al NGF humano de tipo salvaje, por las sustituciones P61S R100E (denominado "NGF P61S R100E", Malerba et al. PLOS One, 2015, vol. 10, e0136425, SEQ ID NO: 4), así como pro-formas etc. del mismo. El polipéptido de SEQ ID NO: 4 también puede denominarse "NGF muteína", pero hay que tener en cuenta que la idoneidad terapéutica, específica para esta proteína, según esta invención, y como se demuestra en los ejemplos experimentales, en particular en el ejemplo 4, es notablemente diferente del NGF humano de tipo salvaje. Asimismo, como se describe en el ejemplo 2, la purificación del polipéptido de SEQ ID NO 4 difiere de los protocolos de purificación publicados para NGF de tipo salvaje, y el procedimiento específico para preparar dicho polipéptido según la presente invención es adecuado para conseguir una alta pureza, en particular ausencia de variante des-nona y tripsina.

- 25 El polipéptido de SEQ ID NO: 4 se expresó recombinantemente como precursor. Para tal fin, SEQ ID NO: 4 se fusionó con el pro-péptido del NGF humano de tipo salvaje (posiciones 1-121 de SEQ ID NO: 1). En otras palabras, el precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 consistía en el precursor del NGF humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1), excepto por las sustituciones P61S R100E en la porción madura del NGF humano de tipo salvaje (pero, para mayor claridad, faltan los 2 aminoácidos más terminales C de SEQ ID NO: 1 que no forman parte de la secuencia polipeptídica del NGF humano de tipo salvaje). La expresión se realizó en *E. coli* Rosetta (DE3) (cepa: *E.coli* Rosetta (DE3) / pET11a-hpro NGF P61S R100E), en forma de cuerpos de inclusión insolubles.

Equipo

30 **Tabla 1** Lista de equipos utilizados.

Dispositivo	Inventario	Número de serie	Proveedor
Biorreactores de 1 l (incl. sensores y bombas)	E023, E024	07462/09, 07463/09	Sartorius Stedim
Biorreactor de 10 l	E082	-	Sartorius Stedim
Fuente de alimentación 300 V	E018; E019	-	VWR
Åkta Explorer100a	E011	001054	GE Healthcare
Åkta Explorer100a	E054	18111241	GE Healthcare
Autoclave Systec VX-120	E050	2512	Systec GmbH
Centrífuga Galaxy 14D	E016	904090	VWR
Centrífuga Sorvall Evolution RC	F683	-	Sorvall
Banco limpio	E006	40970929	Thermo
Cámara de electroforesis Novex Mini Cell	-	-	Invitrogen
Homogeneizador de alta presión APV 2000	F688	5-07,791	APV
HPLC, Serie 1100	E053	-	Agilent
Agitador magnético MR Hei-Mix S	E013	30948231	Heidolph

(Continuación)

Dispositivo	Inventario	Número de serie	Proveedor
Agitador magnético PC-620D	686	-	Corning
pH-metro inlab pH720	E017	9080718	WTW
Fotómetro Genesys 10uv	E051	2L9Q013008	Thermo
Pipetus	-	-	Hirschmann Laborgeräte
Bomba VL 1000	F606	0208004	Verder
Escala	F651	-	Sartorius
Escala	E030	W092934	Kern
Escala	E009	-	Mettler
Agitador IKA KS 4000ic	E049	-	IKA
Vortexer	E012	40934086	VWR

Parámetros proteicos de las proteínas y péptidos descritos en la presente memoria

- 5 Los valores teóricos de los parámetros proteicos de las proteínas relevantes se calcularon con la herramienta ProtParam de ExPASy, disponible en <http://web.expasy.org/protparam>. En la tabla 2 se muestran los siguientes:

Tabla 2: propiedades deducidas teóricamente de las proteínas/polipéptidos pertinentes

	pro-forma de SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 4	Tripsina porcina
MW monomérico	24,8 kDa	13,23 kDa	24,4 kDa
pI	9,7	8,2	7,0
ε	25168 l / mol / cm	19668 l / mol / cm	34295 l / mol / cm

Procedimientos analíticosSDS-PAGE y Western Blot

- 10 SDS-PAGE y Western Blot se realizaron siguiendo procedimientos estándar. Para el SDS-PAGE, se utilizaron geles NuPAGE Bis-TRIS al 12 % (No. de artículo NP0342BOX de Thermo Fisher) en condiciones reductoras a voltios constantes (175 V) en tampón de migración NuPAGE MES (No. de artículo NP0002 de Thermo Fisher). El anticuerpo primario para Western Blot se adquirió en Santa Cruz Biotechnology (NGF (H-20) sc-548). Ejemplos de resultados se muestran, por ejemplo, en la figura 9A y en la figura 10.

15 CEX-HPLC Analítica

CEX-HPLC se realizó utilizando un ProPac SCX-10 de Dionex. La columna se operó con tampón citrato 50 mM, pH 5,5 a 1 ml/min. Para la elución, se agregó NaCl 1 M (B) y se ejecutó un gradiente lineal durante 50 minutos de 0-100 % de B. En la figura 9B se muestra un ejemplo.

SE-HPLC

- 20 La SE-HPLC se realizó utilizando un Superdex 200 Increase 10/300 GL de GE Healthcare. La columna se operó en PBS. El producto se detectó a 280 nm.

Endotoxina, ADN y HCP

La endotoxina, el ADN y las proteínas de la célula hospedadora (HCP) se determinaron según protocolos estándar.

Ejemplo 1: expresión del polipéptido de SEQ ID NO: 4 como proteína precursoraCepa de producción

- 5 El gen que codifica para pro-NGF se clonó en el plásmido de expresión pET11a. El gen procedía de *H. sapiens* y se introdujeron dos mutaciones puntuales (P61S y R100E) en el marco abierto de lectura. Posteriormente, se transformaron células Rosetta (DE3) químicamente competentes con el plásmido de expresión y se seleccionó una única colonia (la cepa resultante se denominó CEPA-E5901 (= E.coli Rosetta (DE3) / pET11a-pro NGF P61S R100E

NGF RCB C-151101)). Las alícuotas se almacenaron a <-60°C, en 1,0 ml.

En el ejemplo 1, se describe el desarrollo inicial de la fermentación basado en la cepa CEPA-E5901.

10 Equipo

Dispositivo	Inventario-	Número de serie	Proveedor
Autoclave Systec VX-120	E050	2512	Systec GmbH
Centrífuga Galaxy 14D	E016	904090	VWR
Centrífuga Sorvall Evolution RC	F683	-	Sorvall
Banco limpio	E006	40970929	Thermo Scientific
Agitador magnético MR Hei-Mix S	E013	30948231	Heidolph
Agitador magnético PC-620D	686	-	Corning
pH-metro inlab pH720	E017	9080718	WTW
Fotómetro Genesys 10uv	E051	2L9Q013008	Thermo Spectronics
Pipetus	-	-	Hirschmann Laborgeräte
Agitador IKA KS 4000ic	E049	-	IKA
Peso Kern 572	E030	W092934	Kern
Peso Mettler AE160	E009	-	Mettler
Biorreactores de 1 l (incl. sensores y bombas)	E023, E024	07462/09, 07463/09	Sartorius Stedim

Medios de crecimientoMedio complejo para la fermentación

- 15 El medio complejo utilizado para la fermentación estaba compuesto por: 49,3 g/l de extracto de levadura, 0,61 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l de NH_4Cl , 14,2 g/l de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 10 g/l de glucosa. La alimentación utilizada para esta fermentación estaba compuesta por 263 g/l de extracto de levadura y 133 g/l de glucosa.

Medio mínimo (MM) para la fermentación

Constituyente	MM I - Conc. final [mM]	MM II - Conc. final [mM]
Cloruro de aluminio, hexahidrato	N/A	0,000063
Sulfato de amonio	39,4	N/A
Ácido bórico	0,005	0,000125
Cloruro de calcio, dihidrato	2	0,000875
Ácido cítrico, monohidrato	25,2	10
Cloruro de cobalto (II), hexahidrato	N/A	0,00075

(continuación)

Constituyente	MM I - Conc. final [mM]	MM II - Conc. final [mM]
Sulfato de cobalto (II), heptahidrato	0,014	N/A
Sulfato de cobre (II), pentahidrato	0,032	0,00425
Fosfato diamónico	N/A	35
Fosfato dipotásico	N/A	45
Hidrógeno fosfato disódico	7,5	N/A
Cloruro férrico, hexahidrato	0,37	0,17
Kanamicina	0,103	0,103
Sulfato de magnesio, heptahidrato	4	3
Sulfato de manganeso (II), monohidrato	0,142	0,00375
Polipropilenglicol 2000	N/A	N/A
Cloruro de potasio	53,6	N/A
Cloruro de sodio	8,5	40
Dihidrógeno fosfato de sodio, monohidrato	31,9	N/A
Molibdato de sodio, dihidrato	0,001	0,00005
Sulfato de cinc, heptahidrato	0,073	0,000375

Para la fase por lotes, ambos medios básicos fueron enriquecidos con 30 g/l de glucosa. Si no se indica lo contrario, la alimentación tenía la misma composición que el respectivo medio discontinuo, pero contenía 300 g/l de la respectiva fuente de carbono.

Placas de agar-LB con ampicilina y cloranfenicol

Se vertieron placas de agar-LB frescas. El medio estaba compuesto por 10 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl y 15 g/l de agar. Tras el autoclave, el medio se enriqueció con 100 µg/ml de ampicilina y 30 µg/ml de cloranfenicol.

Fermentación

Si no se indica lo contrario, la fermentación, en este ejemplo 1, se realizó en biorreactores de vidrio con agitación de 1 l controlados por una unidad Biostat B de Sartorius. Por lo general, la pO_2 se controlaba al 30 %, la temperatura de cultivo se fijaba a 37 °C y el pH se controlaba a 7 utilizando ácido fosfórico 2 M e hidróxido de amonio al 25 %. Salvo indicación contraria, la fase discontinua fue seguida de una alimentación exponencial con $F_0=6$ g/l/h y $\mu=0,25$ /h. Por razones prácticas, todas las alimentaciones exponenciales se aproximaron mediante dos alimentaciones lineales. Por lo general, la inducción de la expresión del producto se ejecutó mediante la adición de 1 mM de IPTG y, tras la inducción, se aplicó una tasa de alimentación constante de 10 g/l/h. La biomasa celular se recogió por centrifugación utilizando un Sorvall Evolution RC de Thermo Scientific. La centrifugadora estaba equipada con un rotor SLC-6000 y el cultivo se centrifugó a 8500 rpm y 4 °C durante 30 min.

Cuantificación relativa del producto en muestras de biomasa

En determinados puntos temporales, las muestras de cultivo se diluyeron a una OD_{600} de 10 y la biomasa de alícuotas de 100 µl de esta dilución se peletizó. Las pellas se vuelven a suspender en 150 µl de tampón Laemmli (no reductor) y las muestras se hirvieron durante 5 min. a 95°C. se analizaron 10 µl de cada muestra en un gel Bis-Tris al 10 % de Novex. La separación electroforética se realizó durante 90 minutos a 125 V y los geles se tiñeron con Coomassie. Se escanearon los geles destañados y se determinó la abundancia de la banda correspondiente al precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 se cuantificó mediante densitometría. Para corregir aún más las variabilidades en la biomasa utilizada, la intensidad de la banda correspondiente al

precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 se normalizó con respecto a la intensidad de una proteína de mantenimiento.

La acumulación relativa de producto se calculó a partir del aumento de la banda correspondiente al precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4, post y preinducción. En particular, el valor medido representa un rendimiento específico (es decir, normalizado a una $OD_{600}=10$). Para obtener el rendimiento absoluto de una fermentación determinada, hay que tener en cuenta la densidad celular real (cf. más adelante).

Cuantificación absoluta del producto en muestras de biomasa

Un estándar para el precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 se obtuvo del Instituto Europeo de Investigación Cerebral (EBRI, Roma, Italia). El estándar se diluyó a una concentración de 65 µg/ml en tampón Laemmli. La concentración de proteínas indicada fue definida por el EBRI. Se preparó una curva estándar con 260, 520, 780, 1040 y 1300 ng del estándar para el precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4. Las muestras se analizaron en el mismo gel que la curva estándar y se consideró el factor de dilución de la muestra para calcular el rendimiento absoluto de producto en el momento dado.

Resumen y conclusiones del ejemplo 1

En base a lo anterior, se concluye que la cepa de producción (CEPA-E5901, cf. arriba) se utilizó con éxito para la fermentación a escala de 1 l. Aunque se ha evaluado la capacidad de diferentes composiciones de medios para promover el crecimiento bacteriano y la expresión del producto, el medio mínimo MM I enriquecido con 5 g/l de extracto de levadura demostró ser favorable en términos de rendimiento de expresión y densidad celular obtenible. En cuanto a la formación de productos, no se observaron diferencias significativas cuando el cultivo principal se realizó con o sin antibióticos (ampicilina y cloranfenicol, datos no mostrados).

El ejemplo 1 puede ampliarse para producir el polipéptido a escala industrial.

Ejemplo 2: purificación a escala de laboratorio, creación de CAPTO MMC

El precursor de SEQ ID NO: 4, utilizado en este ejemplo, se obtuvo en cuerpos de inclusión como se describe en el ejemplo 1.

Punto de partida para la optimización a la vista del estado de la técnica

Al principio, se pensó que un procedimiento para mejorar la purificación del polipéptido de la presente invención podría, en ausencia de indicaciones de lo contrario, seguir los pilares básicos de la purificación de NGF tal y como se ha informado previamente en la literatura. Sin embargo, también se tuvo en cuenta que, para una producción eficiente a gran escala, deberían considerarse adaptaciones adecuadas para una ampliación posterior. De este modo, se ha razonado, basándose en Rattenholl et al. (supra), en WO2013092776 A1, y en otras publicaciones, que el polipéptido de SEQ ID NO: 4 también puede obtenerse, al menos a escala de laboratorio, a través de su proforma, mediante digestión inespecífica con tripsina y posterior purificación. Se razonó que así se podría obtener un polipéptido maduro altamente puro de SEQ ID NO: 4. Sin embargo, sólo a través de las adaptaciones y modificaciones específicas descritas en este ejemplo puede obtenerse un polipéptido maduro altamente puro de SEQ ID NO: 4. Por lo tanto, la administración de un polipéptido de SEQ ID NO: 4 a un sujeto que lo necesita, se hace posible en particular debido a la gran pureza del polipéptido de SEQ ID NO: 4 como se describe en la presente memoria.

Equipo de producción del polipéptido de SEQ ID NO: 4

Dispositivo	No. de inventario	Número de serie	Proveedor
Biorreactores de 1 l (incl. sensores y bombas)	E023, E024	07462/09, 07463/09	Sartorius Stedim
Fuente de alimentación 300 V	E018; E019	-	VWR
Äkta Explorer100a	E011	001054	GE Healthcare
Äkta Explorer100a	E054	18111241	GE Healthcare
Autoclave Systec VX-120	E050	2512	Systec GmbH
Centrífuga Galaxy 14D	E016	904090	VWR
Centrífuga Sorvall Evolution RC	F683	-	Sorvall

(Continuación)

Dispositivo	No. de inventario	Número de serie	Proveedor
Banco limpio	E006	40970929	Thermo Scientific
Cámara de electroforesis Novex Mini Cell	-	-	Invitrogen
Homogeneizador de alta presión APV 2000	F688	5-07,791	APV
HPLC, Serie 1100	E053	-	Agilent
Agitador magnético MR Hei-Mix S	E013	30948231	Heidolph
Agitador magnético PC-620D	686	-	Corning
pH-metro inlab pH720	E017	9080718	WTW
Fotómetro Genesys 10uv	E051	2L9Q013008	Thermo Spectronics
Pipetus	-	-	Hirschmann Laborgeräte
Bomba VL 1000	F606	0208004	Verder
Escala	F651	-	Sartorius
Escala	E030	W092934	Kern
Escala	E009	-	Mettler
Agitador IKA KS 4000ic	E049	-	IKA
Vortexer	E012	40934086	VWR
Lista de equipos utilizados en el ejemplo 2.			

Los detalles del procedimiento de fabricación según este ejemplo, incluyendo las mejoras descritas en el ejemplo 2B, se dan en el resumen del procedimiento de la figura 1.

- 5 A menos que se especifique lo contrario, los procedimientos analíticos fueron los descritos en la sección anterior "Procedimientos analíticos".

Ejemplo 2A: purificación basada en los protocolos descritos previamente.

- 10 Células *E. coli* que expresan el precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 ("biomasa") se produjeron como se describe en el ejemplo 1, y las células se lisaron por adición de lisozima y posterior sonicación en hielo. Los cuerpos de inclusión ("IB") fueron (1) extraídos de las células hospedadoras y lavados con Triton X100 al 6 % (en NaCl 1,5 M, EDTA 60 mM) y, y (2) solubilizados en HCl de guanidinio 6 M ("gHCl"), Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 1 mM, DTT 100 mM (fresco). Los IB se solubilizaron durante 2 h a temperatura ambiente. Después, se bajó el pH a 3-4 agregando HCl al 37 %. La solución obtenida de este modo que comprende precursor solubilizado del precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 ("solubilizado") se dializó contra gHCl 6 M (pH 3-4).
- 15 Replegado del precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 se realizó en Tris-HCl 0,1 M, 1 M de l-arginina, 5 mM de EDTA, 0,61 g/l de glutatión oxidado y 1,53 g/l de glutatión reducido, pH 9,5 a +4 °C. Por lo tanto, se agregaron 50 µg de proteína por ml de tampón de replegado, cada hora. Tras el replegado, la reacción se dializó contra fosfato de sodio 50 mM pH 7,0. Mientras se intercambiaba el tampón, se produjo una precipitación significativa.
- 20 El precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 se purificó mediante una secuencia consecutiva de cromatografía de intercambio catiónico (Sefarosa SP HP operada con fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0 y eluida con un gradiente de NaCl) y posterior cromatografía de interacción hidrofóbica (Fenil Sefarosa HP, operada con fosfato de sodio 50 mM, sulfato de amonio 1 M pH 7,0). Después, se empleó otra diálisis para intercambiar el tampón de la muestra por fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0 (nótese que esta segunda diálisis podría, sin embargo, omitirse en el procedimiento). De nuevo, se precipitaron cantidades significativas de producto a lo largo del procedimiento
- 25 de reducción de la conductividad del tampón.

El precursor preparado de este modo del polipéptido de SEQ ID NO: 4 se sometió a una proteólisis limitada agregando 1 mg de tripsina por 250 mg de pro-NGF. La exposición del precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 a la proteasa fue durante 14 h a 2-8 °C.

- 5 El NGF madurado fue finalmente pulido sobre un intercambiador de cationes (Sefarosa SP XL operado con 50 mM de fosfato de sodio, pH 7,0 y eluido con un gradiente de NaCl). Finalmente, el producto se concentró a 0,5 - 1 mg/ml y se congeló a <-65 °C.

Ejemplo 2B: Mejoras

- 10 A continuación, se describen varias mejoras, en comparación con el ejemplo 2A, como se probaron e implementaron en el curso de llegar a la presente invención. Salvo que el contexto indique lo contrario, todos los detalles que no se indican expresamente son los descritos anteriormente para el ejemplo 2A.

Optimización de la solubilización de IB

- 15 Mientras que se había informado previamente que cantidades bajas de IB (como ejemplo recibidas de cultivos en matraz agitador) se resolvían fácilmente en el tampón de solubilización (gHCl 6 M, Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 1 mM, DTT 100 mM (fresco)), los IB obtenidos de fermentaciones de alta densidad celular no podían resolverse completamente. Esto pudo solucionarse agregando 2 M de urea a dicho tampón de solubilización, lo que resultó mejorar significativamente el rendimiento de solubilización (datos no mostrados). Para evitar dudas: la urea 2 M estaba presente además del gHCl 6 M y otros ingredientes.

Optimización del replegamiento

- 20 Se decidió, basándose inicialmente en Rattenholl et al. (2001, Eur. J. Biochem, vol. 268, p. 3296-3303; Rattenholl, 2001, Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Alemania)), pero sobre todo también teniendo en cuenta una posterior (up)escalabilidad, para realizar el replegamiento con 200 a 500 mg del precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 por litro de reacción de replegamiento, preferentemente 200 a 300 mg del precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 por litro de reacción de replegamiento. Esto condujo a un rendimiento
25 relativamente bueno del precursor solubilizado del polipéptido de SEQ ID NO: 4. En particular es importante considerar que por tal cantidad aumentada de NGF comparada al volumen de reacción de replegamiento, y bajo consideración que la reacción de replegamiento comprende ingredientes relativamente caros como glutatión y arginina, relativamente más el precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 por volumen de reacción de replegamiento, lo que debería hacer que el replegamiento fuera económicamente viable, también a escala
30 de producción.

Purificación del precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4

- 35 Purificación del precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4, tras el replegado, se realizó mediante un enfoque que utiliza el punto isoeléctrico bastante alto del pro-NGF y emplea una fase estacionaria de intercambio catiónico (concretamente Sefarosa SP) para la purificación. Para realizar este tipo de cromatografía, por razones técnicas, es necesario intercambiar el tampón de replegamiento por un tampón de baja conductividad. Al hacer esto, cantidades significativas el precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 precipitó (datos no mostrados). Esta observación podría atribuirse a la reducción de la concentración de arginina en el tampón.

- 40 Por lo tanto, se hicieron algunos esfuerzos para reemplazar la columna de captura por una diferente (una columna con diferente selectividad), que podría ser más tolerante a la presencia de arginina en la reacción de replegamiento. En un primer intento de hacerlo, se evaluó el rendimiento de varias fases estacionarias r, pero ninguno de los enfoques dio resultados prometedores (cf. Tabla 6). Por lo tanto, la fase estacionaria utilizada para la columna de captura se mantuvo tal y como estaba definida en el procedimiento anterior. Sin embargo, debido al elevado punto isoeléctrico (pI) del precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4, fue posible aumentar la conductividad del tampón de funcionamiento (agregando 250 mM de L-arginina) sin afectar al rendimiento.
45 Por esto, el precursor replegado del polipéptido de SEQ ID NO: 4 pudo estabilizarse hasta cierto punto y se redujo la cantidad de precursor precipitado (datos no mostrados).

Tabla anterior: Selectividades alternativas probadas para la captura del precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4, y evaluación del mismo.

Etapas de captura potencial	Descripción breve	Evaluación
Cromatografía de interacción hidrofóbica	La cromatografía de interacción hidrofóbica no es susceptible a la conductividad ni a la composición salina de la muestra cargada.	Si se agregaba sulfato de amonio o cloruro de sodio al producto presente en el tampón de replegamiento, la proteína precipitaba fuertemente. Incluso la adición de pequeñas cantidades de sulfato de amonio (hasta una concentración de 0,25 M) provocó la precipitación. Tampoco fue posible agregar cloruro de sodio sin provocar la precipitación del producto. Por lo tanto, una etapa de captura basado en fenil o butil-sefariosa no es una opción.
Cromatografía de modo mixto	Capto MMC es una fase estacionaria de modo mixto que combina propiedades hidrofóbicas con las de una fase estacionaria para intercambio catiónico. Dado que la unión no está mediada únicamente por interacciones iónicas, esta fase estacionaria es más tolerante a la sal que la fase estacionaria clásica de intercambio catiónico.	En una primera configuración, se enriqueció un tampón fosfato a pH 5,5 con 0,25 M de L-arginina y se facilitó la elución con un gradiente de NaCl. Sin embargo, con este procedimiento no se recuperaron cantidades significativas de producto (precursor).
Cromatografía de exclusión por tamaño	La cromatografía de exclusión por tamaño tiene una buena resolución y es independiente del tampón de muestra. El cuello de botella típico de este tipo de cromatografía (es decir, su capacidad limitada) no es aplicable, ya que se solicitan cantidades relativamente bajas de producto.	Aunque el cromatograma preparativo parecía prometedor, no se pudo lograr la separación del precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 de las impurezas. Esto puede deberse a la existencia de este precursor específico como mezcla polidispersa en las condiciones investigadas.

Con respecto a la cromatografía de modo mixto, se entiende, sin embargo sin querer estar atado a una teoría particular, que el precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 no eluye eficientemente de la cromatografía de modo mixto, mientras que el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4 sí.

Digestión por proteasas para producir NGF maduro

Para la fabricación del polipéptido de SEQ ID NO: 4, la tripsina (tripsina) es esencial y, por lo tanto, se razonó que lo ideal sería que la tripsina concreta seleccionada cumpliera los siguientes criterios:

1. Derivado de una fuente recombinante. La certificación de materias primas libres de animales es fundamental para el posterior cumplimiento de las GMP del procedimiento.

2. Baja actividad secundaria de la tripsina. En particular, la tripsina puede someterse a autólisis. Este procedimiento puede dar lugar a la denominada pseudotripsina, que tiene un espectro de sustrato ampliado y posee una actividad similar a la quimotripsina. Puede agregarse Ca^{2+} (por ejemplo, 1 mM de CaCl_2) para reducir la autólisis. Sin embargo, hoy en día se suele utilizar "tripsina modificada" para todos los protocolos que requieren una especificidad de secuencia estricta (por ejemplo, para la impresión dactilar de péptidos). Esta tripsina modificada se obtiene normalmente por acilación de los grupos ϵ -amino expuestos de los residuos de lisina de la tripsina.

3. Baja variabilidad entre lotes, para permitir un procedimiento de producción reproducible. Alternativamente, la enzima elegida debe entregarse con un certificado que indique la actividad específica del lote respectivo. La cantidad necesaria de enzima puede entonces basarse en la actividad y no en la masa.

A pesar de una búsqueda exhaustiva, no se identificó en el mercado comercial ninguna tripsina que cumpliera los criterios 1 y 2 a la vez. Se razonó que el criterio 1 es más importante. Para reducir la autólisis, la adición de

CaCl₂ puede ser suficiente. Como resultado, se utilizó una tripsina recombinante "de calidad GMP" de Roche (Roche 06369880103, Lot: 11534700) como materia prima para el procedimiento. La secuencia de esta enzima, que se expresa en *Pichia pastoris*, procede de *Sus scrofa*. Según su certificado, el lote de tripsina utilizado tiene una actividad específica de 4997 U/mg (determinada según la USP).

5 Omisión de una segunda etapa de purificación antes de la tripsinización

Dentro de un cribado inicial en busca de proporciones enzima/sustrato óptimas para la tripsinización pretendida, el precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 obtenido de la columna de captura (véase más arriba). En contraste con un procedimiento previamente establecido (European Brain Research Institute (EBRI), detalles no publicados, basado en Rattenholl et al., *supra*) se decidió no utilizar una cromatografía de interacción hidrofóbica adicional antes de la tripsinización. La decisión de omitir dicha segunda etapa de purificación en columna antes de la tripsinización se basó principalmente en dos líneas de pensamiento: Por un lado, el producto obtenido tras la columna de captura ya era prácticamente puro según SDS-PAGE. Por otra parte, la propia tripsinización puede ayudar a mejorar el perfil de impurezas mediante la digestión de las proteínas de la célula hospedadora (HCP) restantes.

La tabla 7 resume la matriz de condiciones cribadas en la primera ronda. Se investigaron los resultados de la tripsinización 12 % de SDS-PAGE (datos no mostrados). Los resultados (datos no mostrados) indican que la tripsinización produce de forma reproducible polipéptido estable de SEQ ID NO: 4 en una gama bastante amplia de relaciones enzima/sustrato (es decir, de 1 a 5 µg de tripsina por 375 µg de precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4). El momento de la digestión no es muy crítico. Por lo tanto, la detención de la reacción y el tiempo necesario para cargar la reacción en la columna de pulido no son aparentemente limitantes. Este hallazgo es de especial importancia, ya que la reacción no se puede apagar de forma adecuada o económica a escala preparativa.

Se realizaron algunos experimentos adicionales para refinar una proporción enzima/sustrato óptima para la tripsinización prevista, y se descubrió que con una proporción enzima/sustrato de 1/100 a 1/200 (peso de proteína/peso de proteína), se obtienen buenos rendimientos del polipéptido de SEQ ID NO: 4, por un lado, y bajas cantidades de productos truncados, por otro. Hay que señalar que en las condiciones utilizadas (es decir, en tampón fosfato/arginina (pH 7,0) a 2-8 °C e incubadas (expuestas a la proteasa) de dos a seis horas) la calidad de la digestión no dependía mucho de la proporción enzima/sustrato. Este hallazgo reviste especial importancia, ya que la digestión enzimática subyacente es propensa a pequeñas variaciones en el montaje experimental (por ejemplo, alteración de la actividad de la tripsina debida a la variabilidad entre lotes o al almacenamiento de la enzima; momento y temperatura de la etapa de incubación (exposición a la proteasa); errores en la determinación de las concentraciones de proteínas). Además, ésta es también la razón por la que no parece tener sentido ampliar el ajuste fino a pequeña escala para reducir aún más los posibles productos de truncamiento. Si se identificara una condición "óptima" a pequeña escala, seguiría existiendo una buena posibilidad de producir un patrón de producto ligeramente modificado la próxima vez que se repitiera prácticamente el mismo digerido a mayor escala.

Cromatografía de pulido con el fin de obtener un polipéptido puro, tras tripsinización

En contraste con un procedimiento previamente establecido (European Brain Research Institute (EBRI), detalles no publicados, basados en Rattenholl et al., *supra*), que empleaba una fase estacionaria de Sefarosa SP para el pulido del polipéptido maduro (nota: sefarosa SP es una fase estacionaria de intercambio catiónico), aquí se buscó una fase estacionaria más adecuada, basándose en las siguientes consideraciones: Para que se cargue eficientemente en una columna Sefarosa SP, es necesario reducir la conductividad de la solución que comprende el precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4, por ejemplo mediante el intercambio de tampones. Sin embargo, se sabe (por ejemplo, Ejemplo 2A) que la reducción de la fuerza iónica de la solución provoca la precipitación de la molécula diana y, por lo tanto, debe evitarse un intercambio tampón a un tampón de baja conductividad. Además, ya se utilizó una fase estacionaria de intercambio catiónico para la captura del precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4, y se prefiere una selectividad ortogonal para conseguir una mejor separación de los contaminantes restantes. Un tercer y último argumento en contra del uso de una fase estacionaria SP para la purificación de la reacción de tripsinización es que el precursor potencialmente remanente del polipéptido del precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 se uniría a esta columna y podría separarse del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4 simplemente por selectividad de elución y no por selectividad de unión.

Con el fin de establecer dicha columna de pulido ortogonal para la purificación del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4, se pretendía utilizar en un primer momento una columna de interacción hidrofóbica (HIC). Esta fase estacionaria no sólo se eligió por tener una selectividad ortogonal, sino también porque no es necesario un intercambio tampón a un tampón de baja conductividad. A pesar de haber probado varias fases estacionarias y condiciones de HIC (por ejemplo, fenil- y butil-sefarosa operadas con (NH₄)₂SO₄ 1 M y (NH₄)₂SO₄, 0,5 M respectivamente), no se pudo implementar ninguna etapa de pulido satisfactorio basado en HIC (datos no mostrados).

Sin embargo, en otra configuración experimental para una etapa de pulido, se probó la fase estacionaria de modo mixto Capto MMC y se pudo implementar con éxito. Se descubrió que con condiciones optimizadas, la fase estacionaria se une al polipéptido de SEQ ID NO: 4 de forma reversible y el producto puede eluirse aumentando el pH (datos no mostrados). Por el contrario, el precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 se une irreversiblemente a la fase estacionaria y sólo puede eluirse utilizando NaOH 1M como fase móvil (datos no mostrados). Además, se pudo demostrar que la tripsina no se une en absoluto a la columna operada en las mismas condiciones (datos no mostrados). Estos resultados proporcionan una clara evidencia de que la fase estacionaria Capto MMC es capaz de separar eficientemente el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4 de tripsina y del precursor restante del polipéptido de SEQ ID NO: 4.

10 Establecimiento de una cromatografía de membrana adicional

Para eliminar aún más las endotoxinas y el ADN, se incluyó en el procedimiento una membrana adicional de intercambio aniónico. En general, y como es comúnmente conocido, la cromatografía de membrana se caracteriza porque una solución que comprende un componente que se va a analizar o purificar (en el presente caso el polipéptido de SEQ ID NO: 4) pasa por encima o a través de una membrana, que normalmente está cargada. Para ello, en el presente caso se incorporó una membrana STIC (Sartorius, Goettingen, Alemania) en las posiciones indicadas en la figura 1. Podría demostrarse que el polipéptido de SEQ ID NO: 4 no se une a la membrana, y de este modo, se proporcionó una prueba de concepto de que la cromatografía de membrana es adecuada para la purificación del polipéptido de SEQ ID NO: 4. Para ilustrar la incorporación en todo el procedimiento, incluida la cromatografía de membrana, véase la figura 1.

20 Reproducibilidad del procedimiento según el ejemplo 2

Para comprobar la robustez del procedimiento, éste se llevó a cabo cinco veces y las fracciones resultantes se analizaron con respecto a su rendimiento y pureza. A lo largo de estos ciclos, se optimizaron constantemente los detalles del procedimiento y se adoptaron la composición de los tampones, los gradientes, etc., hasta que se establecieron los detalles finales optimizados del procedimiento (véase la figura 1). Los resultados indican que, a escala de laboratorio, aproximadamente 50 a 100 mg de polipéptido de SEQ ID NO: 4 pueden obtenerse a partir de una producción constante. En particular, mediante electroforesis en gel de poliácridamida SDS seguida de tinción de Coomassie o tinción de plata, se observó que el producto obtenido era relativamente puro (menos del cinco por ciento de proteínas de células hospedadoras contaminantes y sólo trazas de NGF truncado, datos no mostrados).

Para el precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 no se ha podido establecer ningún procedimiento significativo para la SE-HPLC. Por el contrario, el análisis SE-HPLC para el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4 fue sencillo y dio lugar a un pico de producto homogéneo de aprox. 16 kDa que encaja con un estado monomérico del polipéptido de SEQ ID NO: 4 n (datos no mostrados).

Resumen y conclusiones

Para este procedimiento, el precursor replegado del polipéptido de SEQ ID NO: 4 se capturó utilizando una Sefarosa SP FF ("FF" significa flujo rápido, es decir, una fase estacionaria con partículas relativamente grandes) y posteriormente se trató con tripsina para obtener NGF maduro. Para ello, la concentración de arginina de la reacción de replegamiento se redujo de 1 M (como recomienda la técnica anterior) a 350 mM.

Control de la escisión proteolítica del precursor del polipéptido de SEQ ID NO: 4 para producir el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4 se considera el factor más crítico para el procedimiento. En este caso, se identificaron las condiciones para facilitar de forma reproducible la escisión con alta eficiencia por un lado y evitar la formación de productos de degradación de NGF. Los datos experimentales expuestos en la presente memoria han demostrado que puede establecerse un procedimiento de producción aparentemente robusto en una gama bastante amplia de proporciones enzima/sustrato. Para la tripsinización, los rendimientos de las etapas son aparentemente buenos y no se esperan pérdidas significativas en esta fase del procedimiento. Aparentemente, el patrón de producto obtenido no depende en gran medida de las condiciones de reacción utilizadas (en términos de proporción enzima/sustrato y tiempo de incubación (tiempo de exposición a la proteasa)). En particular, incluso si se espera un buen rendimiento para el pulido de la enzima, al menos 2*x gramos del polipéptido de SEQ ID NO: 4 para obtener x gramo de polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4.

La purificación según este ejemplo es un procedimiento ligero que consiste en sólo dos etapas de purificación cromatográfica. El procedimiento de purificación existente se optimizó aún más y se adoptaron varios aspectos para su ampliación (véase la figura 1). Los procedimientos de disrupción celular utilizados anteriormente se sustituyeron por la homogeneización a alta presión y todos las etapas de diálisis pudieron sustituirse por la filtración de flujo tangencial. El procedimiento establecido de este modo es capaz de suministrar el polipéptido de SEQ ID NO: 4 a alta pureza.

A pesar de los retos mencionados, el procedimiento global es capaz de entregar un producto de calidad aceptable. En particular, el procedimiento produce el polipéptido de SEQ ID NO: 4 en un estado esencialmente

libre de degradantes del polipéptido, en particular esencialmente libre de la variante des-nona del polipéptido. De este modo, el procedimiento produce el polipéptido con una gran pureza.

En la figura 1 se representa esquemáticamente el procedimiento completo que incorpora las mejoras según el ejemplo 2, incluyendo la cromatografía de membrana.

- 5 El ejemplo 2 puede ampliarse para producir el polipéptido a escala industrial.

Ejemplo 3: preparación de una formulación según la presente invención.

Una formulación que comprende el polipéptido de SEQ ID NO: 4, preparado previamente según el ejemplo 2, se preparó teniendo en cuenta las sugerencias de Eng et al., 1997, Anal. Chem., vol. 69, p. 4184-4190.

En particular, la formulación preparada tiene la siguiente composición:

- 10 2 mg/ml de polipéptido según SEQ ID NO: 4, obtenido como se describe en el ejemplo 2
- tampón de acetato de Na 20 mM
- 20 mM de Metionina
- pH 5,5

- 15 En particular, se considera que el acetato es un tampón adecuado para estabilizar el NGF y sus derivados en el rango de pH de pH 5,0 a pH 5,8. Dado que el NGF, y probablemente también los polipéptidos según la presente invención, es sensible a la oxidación en los residuos de metionina, se incluye metionina en la formulación.

Las siguientes realizaciones funcionan, entre otras cosas, para la conservación de la formulación:

- 20 – Primera realización: la formulación anterior puede almacenarse congelada a -70 grados C (datos no mostrados), y descongelarse antes de su administración.
- Segunda realización: la formulación anterior puede almacenarse en el frigorífico, preferentemente en el intervalo de temperatura de +2 a + 8 grados C (datos no mostrados).
- 25 – Tercera realización: la formulación anterior puede someterse a secado o liofilización y, a continuación, almacenarse, por ejemplo, a temperatura ambiente (datos no mostrados). Puede reconstituirse antes de la administración.

- 30 Todas las realizaciones anteriores proporcionan determinadas ventajas de la congelación a, por ejemplo, -20 grados C, ya que esto evita el uso de transporte de hielo seco, la necesidad de descongelar y volver a mezclar después de la descongelación, etc. En tales realizaciones, la formulación según la presente invención supera determinados inconvenientes de las formulaciones farmacéuticas de NGF del estado de la técnica, tal como el oxervato (cenegermin) en particular.

Ejemplo 4: Prueba de concepto en mamíferos no humanos

El objetivo de este ejemplo es investigar la eficacia del polipéptido de SEQ ID NO: 4 para el tratamiento y/o prevención de trastornos oftálmicos en animales no humanos.

La presente invención se basa, en parte, en experimentos con modelos animales.

- 35 En la presente memoria se informa de un estudio de administración del polipéptido de SEQ ID NO: 4 a los animales no humanos. El polipéptido de SEQ ID NO: 4 puede obtenerse con un alto grado de pureza mediante la expresión descrita en el ejemplo 1 y la purificación descrita en el ejemplo 2. Se formuló como se describe en el ejemplo 3.

Materiales y procedimientos

- 40 Modelo de aplastamiento del nervio óptico (ONC)

Se alojaron ratas (Sprague Dawley, macho, 180-200 g, Charles River, Italia) en un vivario con temperatura y humedad controladas (ciclo de 12 h oscuridad/luz, libre acceso a comida y agua). Los experimentos conductuales se realizaron en una habitación tranquila, con temperatura controlada (20 a 22 °C) entre las 9 a.m. y las 5 p.m. por un operador ciego al estado del tratamiento farmacológico.

- 45 Para realizar el aplastamiento del nervio óptico (ONC), se anestesiaron ratas con una mezcla de ketamina y xilacina (90 mg/kg y 3 mg/kg, respectivamente, por vía intraperitoneal, i.p.) y se accedió al nervio óptico mediante una incisión en la conjuntiva temporalmente alrededor del ojo. El nervio óptico izquierdo se aplastó a

1 mm del disco óptico durante 10 segundos, aplicando una fuerza constante y consistente mediante pinzas de acción cruzada. Todos los procedimientos se realizaron en el ojo izquierdo en condiciones asépticas. El ONC se indujo en el ojo experimental izquierdo, mientras que el ojo derecho sirvió de control interno. Antes y después del procedimiento, se observó el fondo del ojo mediante el microscopio quirúrgico para evaluar la integridad del flujo sanguíneo retiniano.

En un primer escenario experimental, se diseccionaron retinas en los días 4, 7 y 14 después de la ONC y se sometieron a inmunodetección de células ganglionares retinianas para evaluar el curso temporal del daño retiniano. Los ojos contralaterales derechos no tocados ni tratados se utilizaron como control de la pérdida de células ganglionares de la retina inducida por la ONC. Se seleccionó el día 7 después de la ONC como punto temporal óptimo para la investigación inicial del efecto del polipéptido de SEQ ID NO: 4, ya que aproximadamente el 50 % de la población de células ganglionares de la retina estaba presente.

Las ratas fueron sometidas a tratamiento farmacológico tras inyección intravítrea y aplicación de colirio siguiendo un esquema de tratamiento de rescate para investigar el efecto del polipéptido de SEQ ID NO: 4 en un entorno experimental potencialmente trasladable a la clínica:

- tratamiento con vehículo o con el polipéptido de SEQ ID NO: 4: solución de 20, 2, 0,2 µg/ml; volumen de inyección intravítrea de 2 µl a partir del día 4 después de la lesión y hasta el día 7.
- tratamiento con vehículo o con el polipéptido de SEQ ID NO: 4: solución de 200 µg/ml; volumen de 25 µl de colirio a partir del día 4 después de la lesión y hasta el día 7, una, dos o tres veces al día.

Tras el tratamiento, se diseccionaron retinas y se sometieron a inmunodetección de células ganglionares retinianas para cuantificar el daño retiniano y el efecto de los diferentes tratamientos con el polipéptido de SEQ ID NO: 4.

Inmunohistoquímica

Las retinas disecadas se fijaron en formol durante 24 horas y se incrustaron en parafina. Se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) algunas secciones fijadas en formol e incluidas en parafina (5 µm) para su examen histológico. Otras secciones se sometieron a desparafinación y rehidratación mediante incubaciones secuenciales en xileno y series descendentes de etanol (100 %, 90 % y 70 %). La recuperación de antígenos se consiguió introduciendo las secciones en microondas en tampón citrato 10 mM (pH 6,0) durante 5 minutos. Las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios (Brn3a, 1:500; y RBPMS 1:500) 1 hora en una cámara húmeda. A continuación, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario IgG antirratón/conejo biotinilado prediluido o con anticuerpo secundario anticobaya biotinilado (1:200, #BA-7000, Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU.), 30 minutos a temperatura ambiente, y en solución de complejo avidina-biotina (#PK-7200, Vectastain Elite ABC-HRP Kit, Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU.) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las secciones se transfirieron a un sustrato de peroxidasa (#K3468, ImmPACT DAB, Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU.) durante 4-6 minutos para la reacción de revelado del cromógeno y se enjuagaron en agua destilada antes del montaje. Los núcleos se contrateñían con hematoxilina de Mayer. Se visualizaron los tejidos y se capturaron imágenes digitales con un microscopio óptico Leica DM2500 (Leica Microsystems, Milán, Italia).

Tras la selección a bajo aumento de las células inmunopositivas, se realizó la cuantificación de células totales, Brn3a+ y RBPMS+ en cajas de 7,104 µm² a campos de alto aumento (HPF, X400, Leica Microsystem). Para cada rata, se analizaron 3 secciones diferentes de cada ojo.

Los datos (medias ± SEM) se compararon mediante un ANOVA unidireccional seguido de comparaciones post hoc utilizando la corrección de Bonferroni. Se utilizó GraphPad Prism (versión 5.00, La Jolla, EE.UU.) para todos los análisis y P < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

En las ratas sometidas a tratamiento intravítreo con vehículo a partir del día 4 después de la ONC, de acuerdo con los datos generados, durante el montaje del modelo, se observó una disminución de alrededor del 60 % en el número de células ganglionares de la retina. El polipéptido de SEQ ID NO: 4 administrado por vía intravítrea a 3 niveles de dosis diferentes (20, 2, 0,2 µg/ml de solución; volumen de inyección de 2 µl) ejerció un efecto protector dependiente de la dosis sobre la pérdida de células ganglionares de la retina que alcanzó significación estadística en las ratas que recibieron inyecciones intravítreas con la solución de 20 µg/ml. En este grupo, el número de células ganglionares de la retina en el ojo sometido a la ONC era similar al del ojo contralateral sano (Figura 3).

Asimismo, en los grupos de ratas sometidas a tratamiento con ONC y colirio de vehículo a partir del día 4 después de la lesión, la pérdida de células ganglionares de la retina fue superponible a la cuantificada en la fase de puesta a punto del modelo y en el experimento de evaluación del efecto del polipéptido de SEQ ID NO: 4 después de la inyección intravítrea. El efecto de tratamiento de rescate de los colirios del polipéptido de SEQ

ID NO: 4 (200 µg/ml) aplicando 3 programas de tratamiento diferentes: una, dos o tres veces al día. Los datos generados muestran una actividad biológica significativamente superior de la solución de 200 µg/ml administrada tres veces al día, aunque también se observa una tendencia a la eficacia tras la administración una y dos veces al día (Figura 4).

- 5 Conclusión: Los efectos de rescate del polipéptido de SEQ ID NO: 4, cuando se administra cuatro días después de la lesión del nervio óptico es completamente inesperado y abre la posibilidad de que el compuesto pueda ser eficaz en la recuperación funcional de pacientes con trastornos del nervio óptico y otros trastornos retinianos por razones traumáticas, isquémicas, inflamatorias, metabólicas o neoplásicas, siempre que la pérdida de RGC forme parte del procedimiento patológico.

10 **Ejemplo 5: Comparación entre el polipéptido de SEQ ID NO: 2 y el polipéptido de SEQ ID NO: 4 en la provocación de comportamientos nociceptivos y alodinia facial tras la administración ocular en ratones**

El objetivo de este ejemplo es investigar la eficacia del polipéptido de SEQ ID NO: 4 para el tratamiento y/o prevención de trastornos oftálmicos en animales no humanos.

La presente invención se basa, en parte, en experimentos con modelos animales.

- 15 En la presente memoria se informa de un estudio de administración del polipéptido de SEQ ID NO: 4 a los animales no humanos. El polipéptido de SEQ ID NO: 4 puede obtenerse con un alto grado de pureza mediante la expresión descrita en el ejemplo 1 y la purificación descrita en el ejemplo 2. Se formuló como se describe en el ejemplo 3.

Objetivos de este ejemplo:

- 20 1. El presente ejemplo pretende comparar la actividad algogénica del polipéptido de SEQ ID NO: 4 a NGF humano de tipo salvaje (polipéptido de SEQ ID NO: 2) y NGF de ratón de tipo salvaje (mNGF) tras la instilación ocular en un modelo de ratón de constricción del nervio infraorbitario (CION).
- 25 2. El efecto del análogo de NGF (polipéptido de SEQ ID NO: 4) se evaluará midiendo su capacidad para inducir respuestas nociceptivas agudas tras la instilación ocular en comparación con el polipéptido de SEQ ID NO: 2, mNGF y el compuesto irritante de referencia capsaicina, conocido por inducir una respuesta nociceptiva. Se están probando las siguientes dosis: 0,5, 1, 5 y 10 µg en 5 µl/ojo, diluidos en solución salina isotónica (NaCl 0,9 %). La capsaicina se probará a 0,001-0,5 nmol/5µl/ojo.
- 30 3. A continuación, se comprobará la capacidad de una dosis subumbral de los distintos compuestos para inducir una respuesta nociceptiva tras la instilación ocular en el modelo de Constricción del Nervio Infraorbitario (CION).

Materiales y procedimientos

NGF murino (NGF de ratón, mNGF)

- 35 El NGF murino era NGF 2,5S nativo de ratón de alta pureza (>95 %) y se obtuvo por extracción y purificación a partir de glándulas submaxilares de ratón según el procedimiento descrito por Bocchini et al., 1969, Pro.c Natl. Acad. Sci., USA, vol. 64, p. 787-794. mNGF consta de los residuos 129-241 de la secuencia polipeptídica de UniProt P01139.

Modelos *in vivo* de nocicepción

- 40 Los experimentos con animales se llevarán a cabo de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (UE) para los procedimientos de cuidado de los animales y la legislación italiana (DLgs 26/2014) solicitud de la EU Directive 2010/63/EU. Los estudios se llevarán a cabo bajo los permisos de investigación de la Universidad de Florencia #194/2015-PR. Para las pruebas nociceptivas se utilizarán ratones C57BL/6 (macho, 25-30 g, Envigo, Milán, Italia). Los animales se alojarán en un vivario con temperatura y humedad controladas (ciclo luz/oscuridad de 12 h, libre acceso a comida y agua). Los experimentos conductuales se llevarán a cabo en una sala tranquila y con temperatura controlada (20 a 22 °C) entre las 9:00 y las 17:00 horas por un operador cegado al estado del tratamiento farmacológico.
- 45

Constricción del nervio infraorbitario (CION)

- 50 La CION se realizará en ratones C57BL/6 como se ha descrito (Vos et al., 1994, J. Neurosci., vol. 14, p. 2708-2723; Luiz et al., 2010, Neuropeptides, vol. 44, p. 87-92). En resumen, los ratones serán anestesiados con una inyección intraperitoneal (i.p.) de una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y xilacina (3 mg/kg) y se hará una incisión en la piel del labio superior izquierdo lateral a la nariz, y se expondrá el extremo rostral del nervio infraorbitario. A continuación, se colocarán dos ligaduras poco constrictivas (sutura de seda #6/0) alrededor del nervio infraorbitario con una distancia de 2 mm. En el procedimiento simulado, el nervio infraorbitario izquierdo se expondrá pero no se ligará. Se aplicarán a la herida sulfato de neomicina y sulfatiazol (polvo, 0,05 g y 9,95 g,

respectivamente; Boehringer Ingelheim Italia S.p.A, Italia) y se suturará la incisión. Se vigilará a los ratones, se les rehidratará adecuadamente y se le mantendrá a temperatura controlada (37 °C) hasta que se recuperen totalmente de la anestesia. Todos los experimentos se realizarán en el día 10 después de la cirugía. Al final de los experimentos, los animales serán eutanasiados con CO₂ inhalado más 10-50 % de O₂.

5 Ensayo de limpieza ocular en ratones

Instilación ocular (5 µl) de compuestos de prueba, polipéptido de SEQ ID NO: 4, polipéptido de SEQ ID NO: 2, mNGF, (todos, 0,5, 1, 5 y 10 µg en 5 µl/ojo) y capsaicina (0,5 nmol/5µl/ojo) o sus respectivos vehículos (solución salina isotónica, NaCl al 0,9 % y dimetilsulfóxido al 1 %, DMSO) se utilizarán para inducir una respuesta nociceptiva aguda como se ha descrito previamente (De Petrocellis et al., 2010, Pharmacol. Res., vol. 63, p. 294-299). Los ratones se colocarán individualmente dentro de una cámara de plexiglás y se aclimatarán durante 20 minutos antes del estímulo. El número de movimientos de limpieza ocular tras la instilación del fármaco en el ojo se registrará durante un período de 5 minutos y se considerará como índice de acritud.

En el día 10 después del procedimiento CION o simulado, los ratones recibirán una instilación ocular (5 µl/ojo) de una dosis subumbral del polipéptido de SEQ ID NO: 2, mNGF y el polipéptido de SEQ ID NO: 4, o capsaicina y se medirá la respuesta nociceptiva.

Resultados

En la primera parte del ejemplo, se probaron diferentes dosis (0,001-0,5 nmol) de capsaicina administrada por instilación ocular (5 µl/gota ocular), en su capacidad de inducir la respuesta nociceptiva aguda, medida como número de limpiezas oculares en un período de tiempo de 5 minutos. La capsaicina indujo una respuesta nociceptiva dependiente de la dosis, como demostró el aumento de las respuestas de las limpiezas oculares medidas tras la instilación ocular de capsaicina (0,001-0,5 nmol/5 µl/ojo) (Figura 5).

A continuación, se evaluaron diferentes dosis (0,001-5 µg 5 µl/ojo) de NGF de ratón (mNGF), NGF humano (polipéptido de SEQ ID NO: 2) y el polipéptido de SEQ ID NO: 4). Todos los compuestos indujeron un aumento dependiente de la dosis en la respuesta nociceptiva medida como el número de limpiezas oculares tras la aplicación ocular. La aplicación del polipéptido de SEQ ID NO: 2 mostró más potencia para inducir una respuesta nociceptiva en comparación con el mNGF y, lo que es más importante, en comparación con la forma mutada del polipéptido de SEQ ID NO: 2 (Figura 6).

A continuación, se evaluó el efecto de una dosis subumbral de los diferentes compuestos en un modelo de Constricción del Nervio Infraorbitario (CION). El modelo CION indujo una sensibilización a nuevos estímulos nociceptivos (Trevisan et al., 2016, Brain, 139 (Pt 5), p.1361-1377).

En el día 10 después del procedimiento CION o simulado, los ratones recibieron una instilación ocular de dosis subumbral de capsaicina (0,001 nmol/5µl/ojo), mNGF (0,001 nmol/5µl/ojo), polipéptido de SEQ ID NO: 2 (0,001 nmol/5µl/ojo), y el polipéptido de SEQ ID NO: 4 (0,001 nmol/5µl/ojo) se medirá la respuesta nociceptiva de limpieza ocular.

Los datos mostraron que en un modelo sensibilizado (modelo CION) las respuestas nociceptivas producidas por dosis subumbrales de capsaicina evocaron una respuesta más intensa en ratones operados con CION que en ratones operados simuladamente (Figura 7). Se obtuvieron los mismos resultados cuando el mNGF y el polipéptido de SEQ ID NO: 2 se instilaron en el ojo de ratones operados con CION. La instilación ocular del polipéptido de SEQ ID NO: 4 no consiguió inducir un aumento de la respuesta nociceptiva.

Ejemplo 6: Uso para el tratamiento o la prevención de trastornos oftalmológicos en humanos

El objetivo de este ejemplo es apoyar aún más la eficacia del polipéptido de SEQ ID NO: 4 para el tratamiento y/o prevención de trastornos oftálmicos en humanos.

Las dosificaciones adecuadas del polipéptido pueden ser determinadas por el experto en la materia basándose en las orientaciones dadas en la presente memoria.

Los inventores esperan utilizar en humanos las mismas concentraciones que resultaron eficaces en las ratas con lesión del nervio óptico (para colirio 200 µg/ml tres veces al día) para administración tópica, en particular. La más preferida es la administración conjuntival.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Esquema del procedimiento según el ejemplo 2, incluyendo las mejoras descritas en el ejemplo 2B.

Figura 2: Secuencias polipeptídicas. Asterisco (*) = posición 61 en el NGF humano maduro; cruz (+): posición 100 en el NGF humano maduro.

A: SEQ ID NO: 1: Secuencia de NGF preprohumana codificada por el respectivo marco de lectura abierto humano.

Pre-péptido: posiciones de aminoácidos; pro-péptido: posiciones de aminoácidos 19-121; NGF maduro: posiciones de aminoácidos 122-239; dipéptido terminal C: posiciones de aminoácidos 240-241.

5 Enlaces disulfuro (en la parte madura correctamente plegada): enlazan las posiciones de los aminoácidos 136 ↔ 201, 179 ↔ 229, 189 ↔ 231.

Sitio de escisión de furina (RSKR): posiciones de aminoácidos 118-121.

B: Descripción esquemática del pre-péptido, el pro-péptido y el NGF maduro.

C: SEQ ID NO: 2: Secuencia del NGF humano maduro.

10 **D:** SEQ ID NO: 3 (no forma parte de la presente invención)

E: SEQ ID NO: 4

Figura 3: Efecto del polipéptido de SEQ ID NO: 4 ("CHF 6467") tras su administración intravítrea. Análisis estadístico mediante el procedimiento de anova unidireccional seguido del análisis post-hoc de Bonferroni. N = 6/Grupo.

15 **Figura 4:** Efecto del polipéptido de SEQ ID NO: 4 tras el tratamiento con colirio. Análisis estadístico mediante el procedimiento de anova unidireccional seguido del análisis post-hoc de Bonferroni. N = 3/Grupo (Para más detalles, véase el ejemplo 4).

20 **Figura 5:** Respuesta de limpieza ocular dependiente de la dosis evocada por la instilación ocular (5 µl/gota ocular) de capsaicina (0,001-0,5 nmol) en ratones C57BL/6. Las barras de error indican la media ± SEM, 6-8 ratones por grupo. Veh es el vehículo de CPS. *P < 0,05, ***P < 0,001 frente a Veh. ANOVA unidireccional con corrección posthoc de Bonferroni.

25 **Figura 6:** Respuesta de limpieza ocular dependiente de la dosis evocada por la instilación ocular (5 µl/gota ocular) de NGF de ratón (mNGF), polipéptido de SEQ ID NO: 2 ("NGF humana") y el polipéptido de SEQ ID NO: 4 ("NGF mutado") (0,001-0,5 nmol) en ratones C57BL/6. Las barras de error indican la media ± SEM, 6-8 ratones por grupo. Veh es el vehículo de mNGF, polipéptido de SEQ ID NO: 2 y el polipéptido de SEQ ID NO: 4. *P < 0,05, ***P < 0,001 frente a Veh. ANOVA unidireccional con corrección post-hoc de Bonferroni.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de SEQ ID NO: 4 para su uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno oftálmico en un sujeto mamífero, en el que el trastorno oftálmico implica un daño y/o trastorno del nervio óptico o el trastorno oftálmico implica un daño y/o trastorno de las células ganglionares de la retina.
- 5 2. El polipéptido para su uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto mamífero es un humano.
3. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para administración en el ojo.
4. El polipéptido según la reivindicación 3, en el que la administración se selecciona del grupo que consiste en la administración tópica al ojo y la administración intravítrea, siendo preferible la administración tópica.
- 10 5. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido se administra repetidamente.
6. El polipéptido para su uso según la reivindicación 5, en el que el polipéptido se administra repetidamente al menos tres veces al día.
- 15 7. El polipéptido para su uso según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que el polipéptido se administra repetidamente, durante un período de tres a 30 días, preferentemente de siete a 14 días.
8. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido se administra tras un daño del nervio óptico.
9. El polipéptido para su uso según la reivindicación 8, en el que el polipéptido se administra al menos cuatro días después del daño del nervio óptico.
- 20 10. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el daño y/o trastorno del nervio óptico comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en glaucoma, queratitis neurotrófica, neuritis óptica, atrofia del nervio óptico, drusas de la cabeza del nervio óptico y glioma de la vía óptica.
- 25 11. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la dosis/cada dosis tiene una cantidad de 0,3 a 30 µg del polipéptido por ojo, más preferentemente de 1 a 10 µg del polipéptido por ojo, y más preferentemente 5 µg del polipéptido por ojo.
12. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido está comprendido en un medio acuoso, y el medio acuoso se administra al sujeto mamífero.
- 30 13. El polipéptido para su uso según la reivindicación 12, en el que dicho polipéptido está comprendido en una composición que comprende lo siguiente:
 - a) de 0,2 a 20 mg/ml de dicho polipéptido (preferentemente 2 mg/ml),
 - b) tampón de acetato de sodio de 5 a 100 mM (preferentemente 20 mM),
 - c) de 5 a 100 mM de metionina (preferentemente 20 mM),
 - d) pH de 5,0 a 6,0 (preferentemente pH 5,5).
- 35 14. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido está esencialmente libre de degradantes del polipéptido, en particular esencialmente libre de la variante des-nona del polipéptido.
- 40 15. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido se puede obtener mediante expresión recombinante y purificación, en el que la purificación comprende purificación en una fase estacionaria de modo mixto.

Fig. 1a

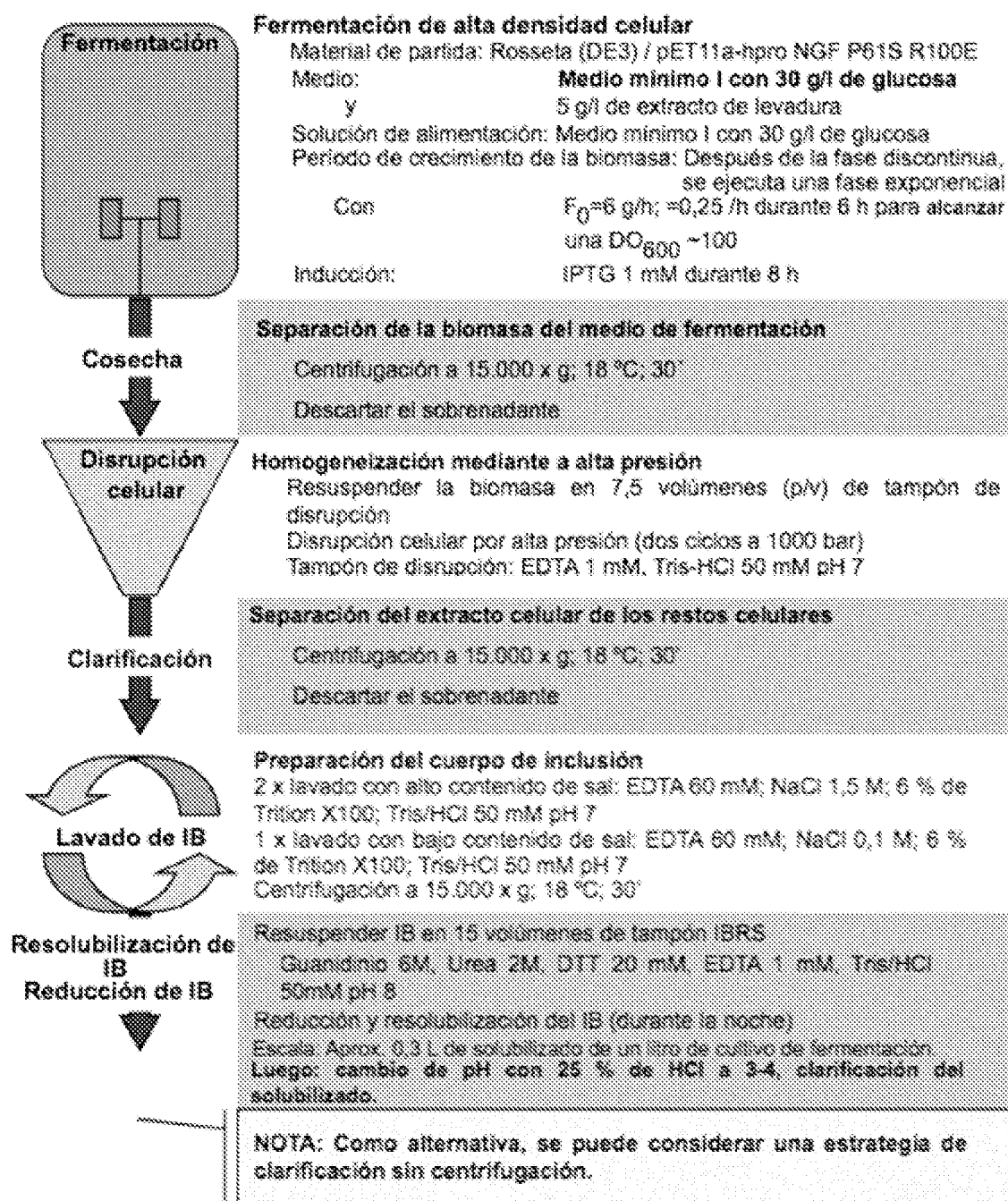


Fig. 1b

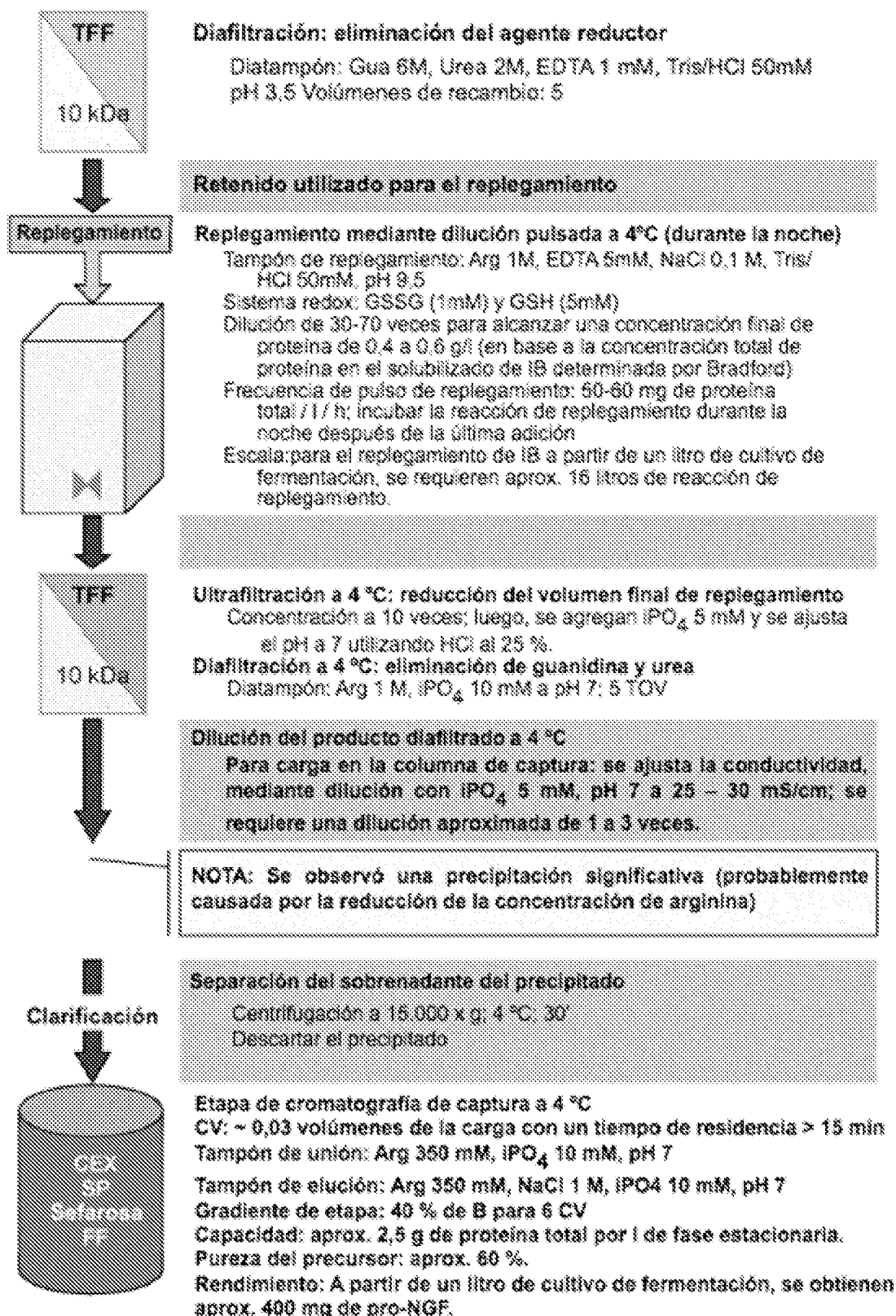


Fig. 1c

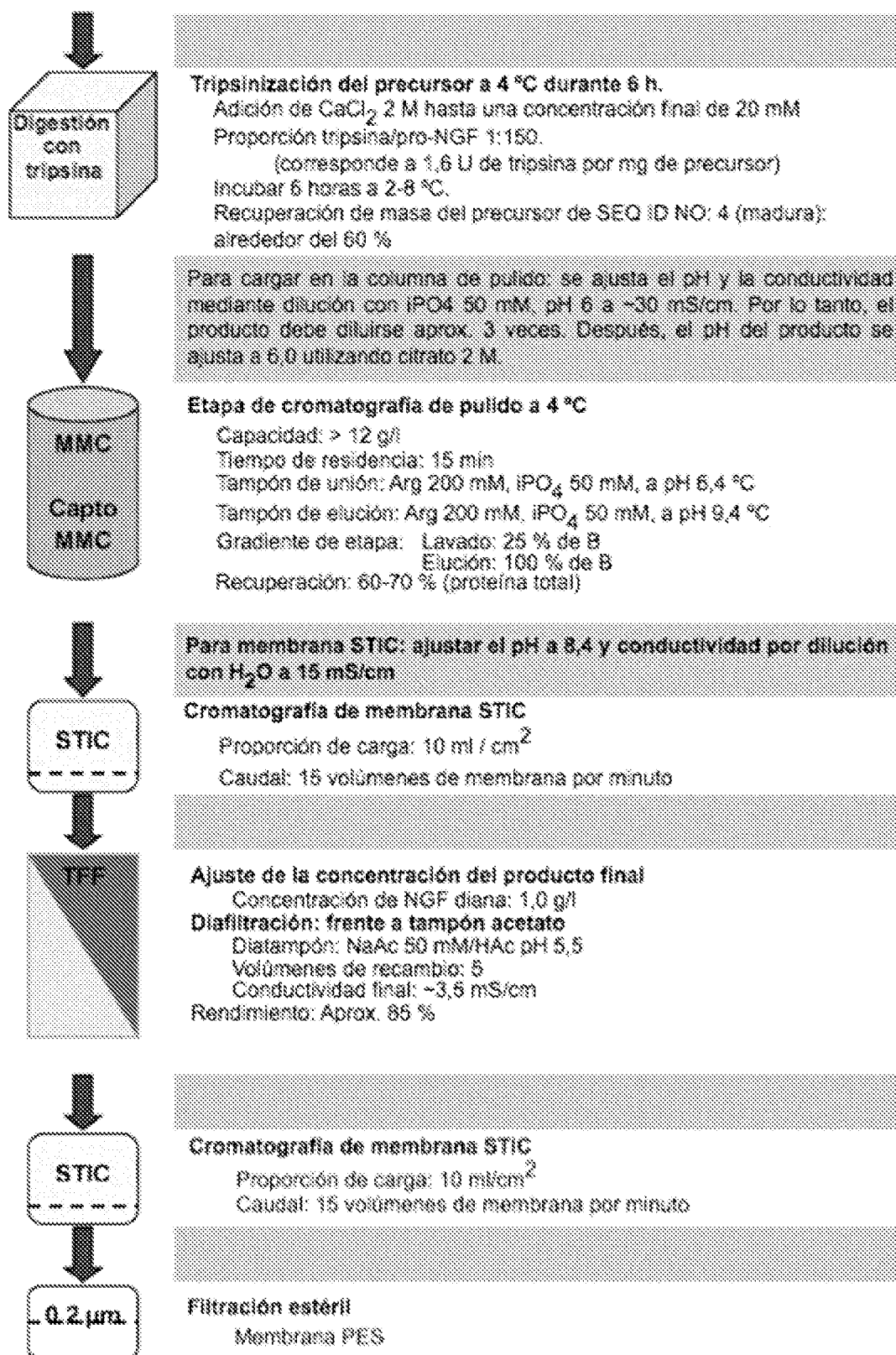
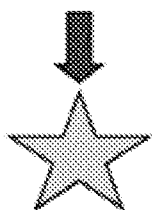


Fig. 1d



El producto se congela a -70°C y debe almacenarse a $< -15^{\circ}\text{C}$

Fig. 2a

A: SEQ ID NO: 1

10	20	30	40	50
MSMLPYTLIT	AFLIGIQAEF	HSESNVPAGH	TIPQANWIKL	ONSLEDTALRR
60	70	80	90	100
ARSAPAAIA	ARVAGQTENI	TVDPRLFKKR	RLESPVLFPS	TQPPREAAAT
110	120	130	140	150
QDLDFEVGGA	AFENRTHRSK	RSSHPFIPNK	GEFSVCDSSVS	VWVGDKTTAT
160	170	180	190	200
DINGKEVMVL	GEVNINNSVF	KQYFFETKCR	DPNFDSSGR	GIDSKHNSY
210	220	230	240	
CTTTHTFVKA	LTMDGKQAAW	RFIRIDTACV	CVLSBKAVRR	A

B

Clave de características	Posición (s)	longitud (aa)
pre péptido	1-18	18
propéptido (que comprende el sitio de escisión de furina RSKR)	19-121	103
beta-NGF (NGF maduro)	122-239	118
Dipéptido C-terminal	240-241	2

Fig. 2b

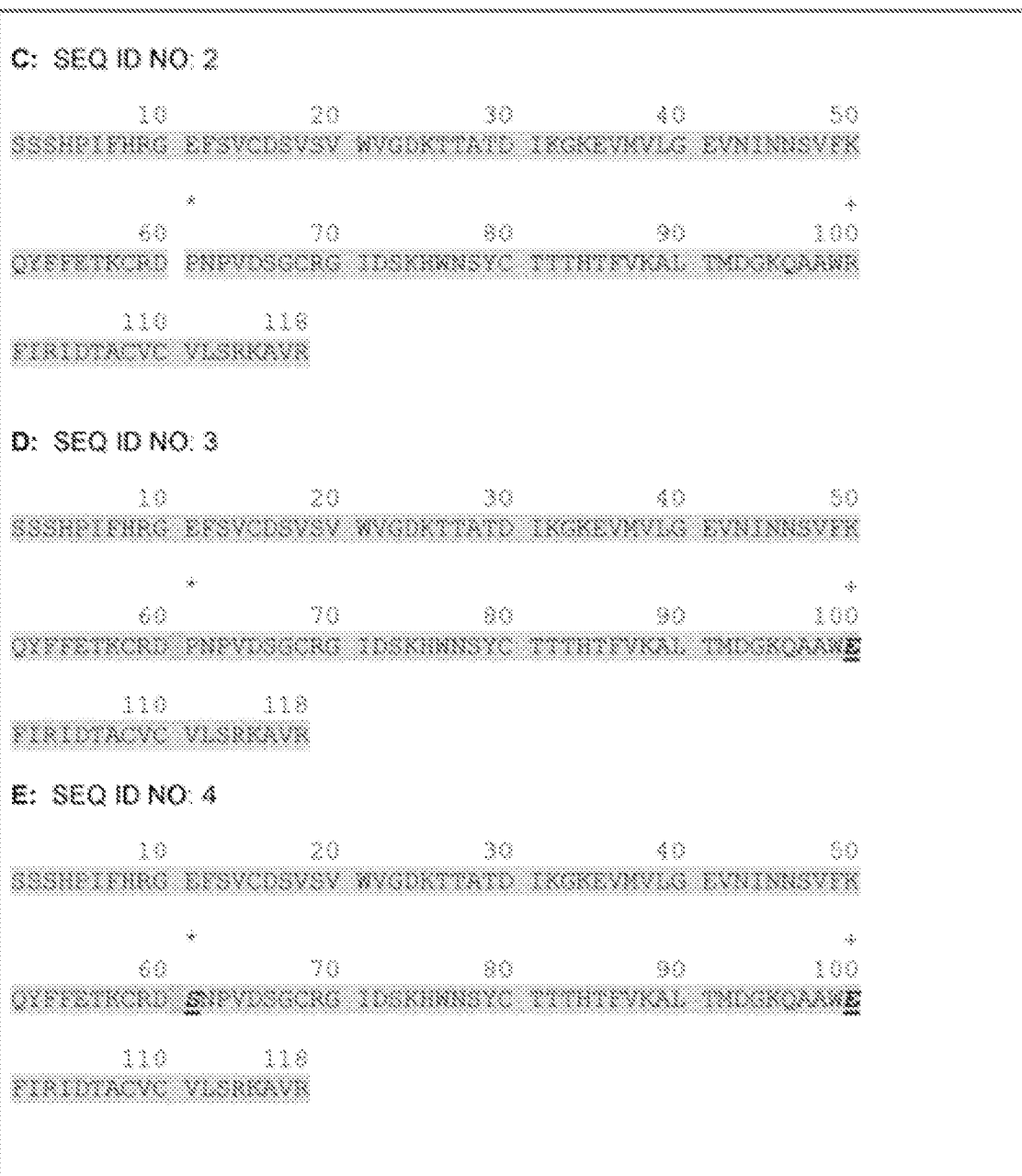


Fig. 3

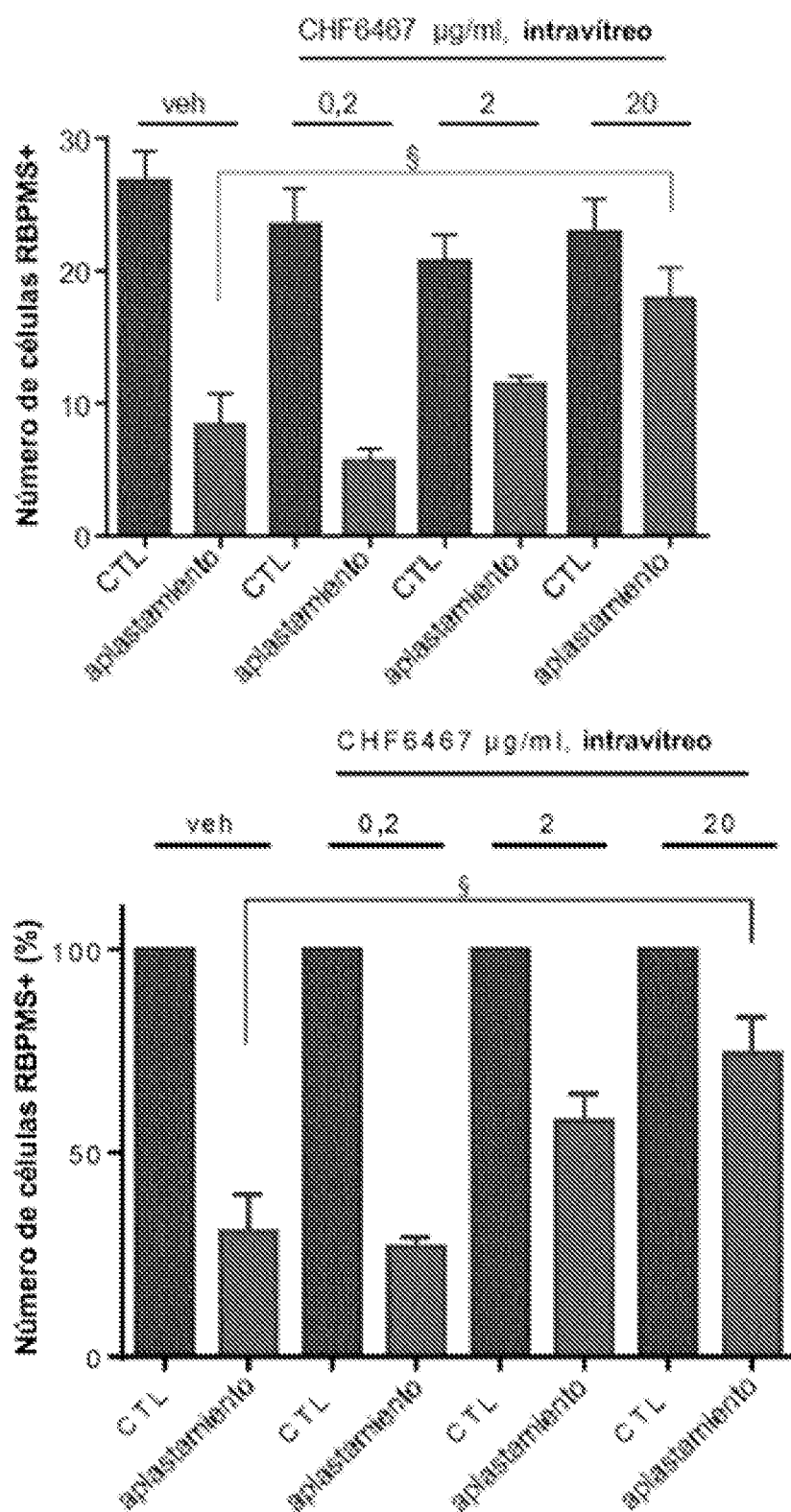


Fig. 4

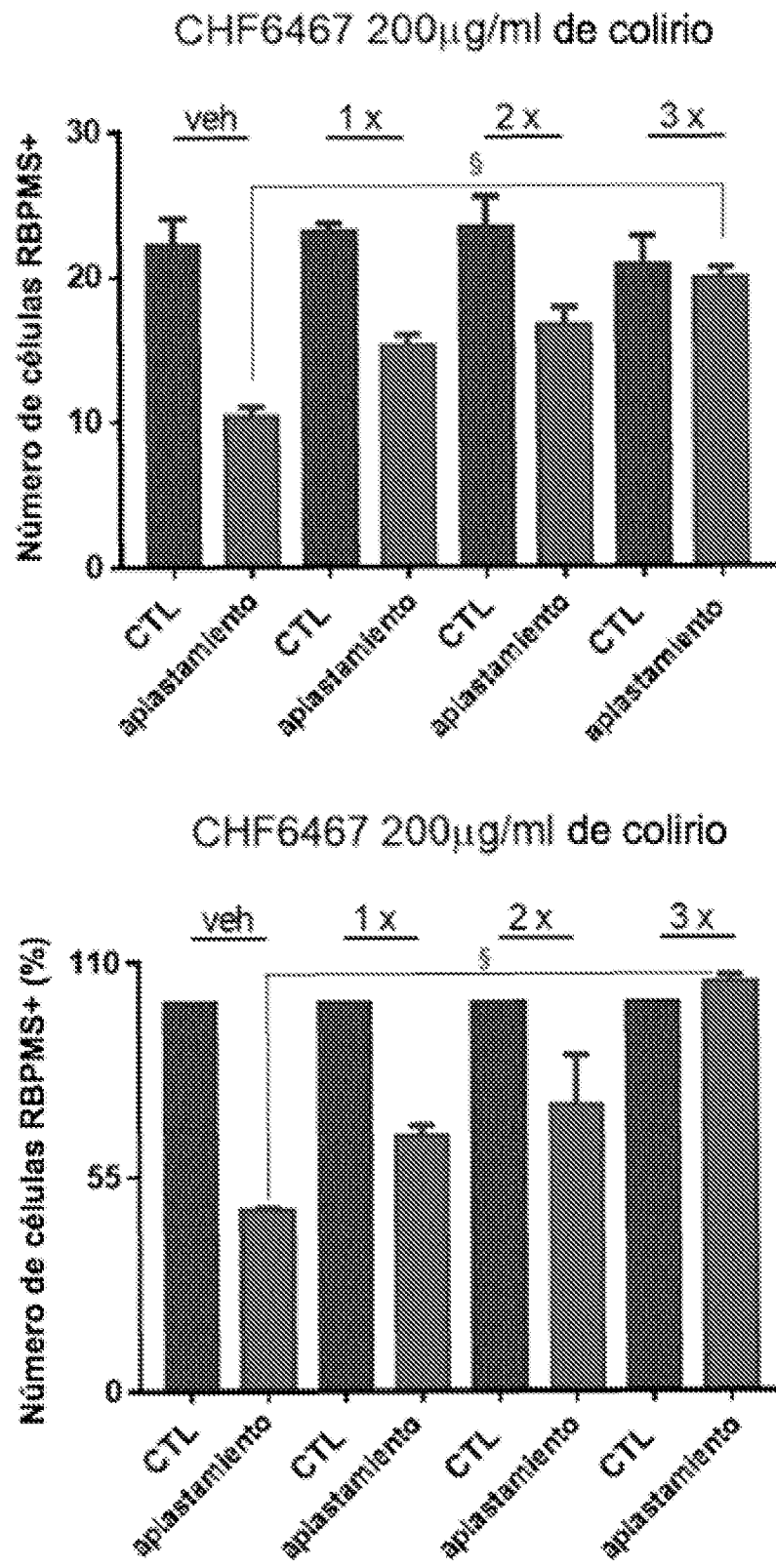


Fig. 5

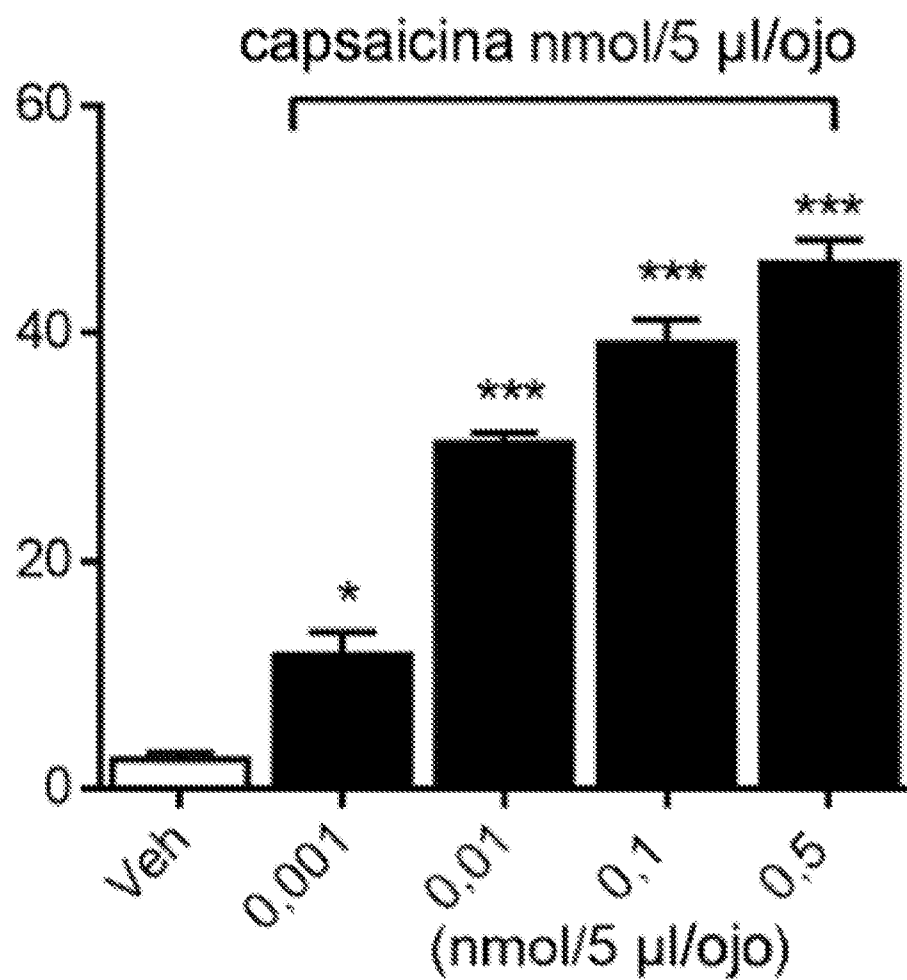


Fig. 6

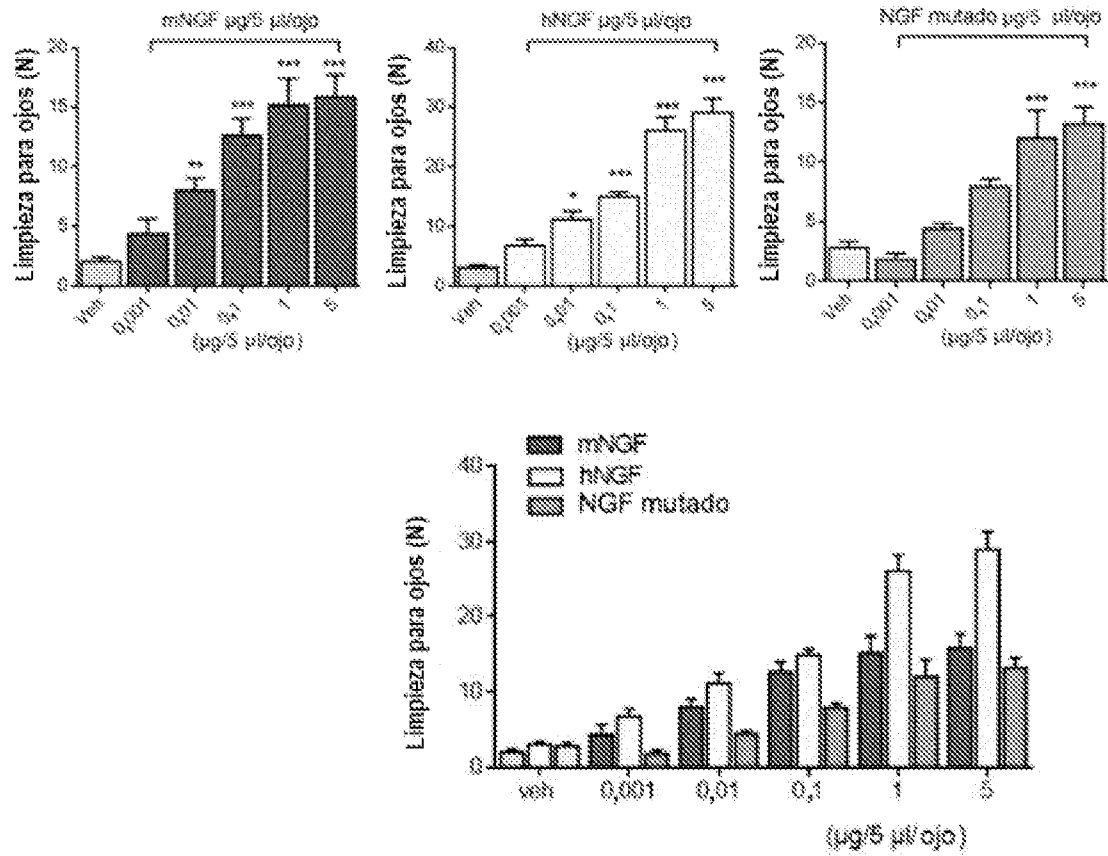


Fig. 7

