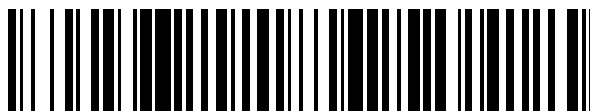


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 354**

51 Int. Cl.:

A61K 31/445 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2003 E 03754653 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1539157**

54 Título: **Rapamicina para usar en la inhibición o prevención de la neovascularización coroidea**

30 Prioridad:

18.09.2002 US 412088 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2013

73 Titular/es:

**TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**LATIES, ALAN;
WEN, RONG y
LOU, ZHIJUN**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 428 354 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

Rapamicina para usar en la inhibición o prevención de la neovascularización coroidea

Campo técnico

- 5 La presente invención se relaciona con composiciones para inhibir la angiogénesis indeseada, que incluye la de los tejidos oculares. Particularmente, se proporcionan composiciones para el tratamiento de la neovascularización coroidea (CNV) en enfermedades oculares. La invención se relaciona con el uso de esas composiciones para la preparación de medicamentos para inhibir o prevenir la neovascularización coroidea.

Antecedentes de la invención

- 10 La retina del ojo contiene los conos y bastones que detectan los colores. En el centro de la retina está la mácula lútea, que es aproximadamente 1/3 a 1/2 cm en diámetro. La mácula proporciona la visión detallada, particularmente en el centro (la fovea), debido a que los conos son superiores en densidad. Los vasos sanguíneos, células ganglionares, células y capa nuclear interior, y las capas plexiformes están desplazadas hacia un lado (en lugar de descansar por encima de los conos), permitiendo de ese modo a la luz una trayectoria más directa hacia los conos.

- 15 Bajo la retina están las coroides, que comprenden una colección de vasos sanguíneos embebidos dentro de un tejido fibroso, y el epitelio profundamente pigmentado, que se superpone a la capa coroide. Los vasos sanguíneos coroides proporcionan nutrición a la retina (particularmente a sus células visuales).

- 20 Existe una diversidad de trastornos de la retina, cuyo tratamiento actual no es óptimo. La retina puede desgarrarse, formar agujeros y separarse de las coroides subyacentes.

- 25 La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es la causa principal de la pérdida visual severa en los Estados Unidos para los individuos mayores de 55 años. La AMD ocurre ya sea en una forma atrópica o (menos comúnmente) en una forma exudativa. En la AMD exudativa, los vasos sanguíneos crecen desde los coriocapilares a través de los defectos en la membrana de Bruch, y en algunos casos al epitelio pigmentario de la retina subyacente (neovascularización coroidea o angiogénesis). La organización de exudados serosos o hemorrágicos que escapan de estos vasos resulta en la cicatrización fibrovascular de la región macular con la degeneración auxiliar de la neurorretina, desprendimiento y desgarro del epitelio pigmentario de la retina, hemorragia del vítreo y pérdida permanente de la visión central. Este proceso es responsable de más del 80% de los casos de pérdida visual significativa en los pacientes con AMD.
- 30

- Varios estudios describieron recientemente el uso de la fotocoagulación con láser en el tratamiento de las lesiones neovasculares iniciales o recurrentes asociadas con AMD (Macular Photocoagulation Study Groups (1991) en Arch. Ophthalmol. 109:1220; Arch. Ophthalmol. 109:1232; Arch Ophthalmol. 109:1242). Desafortunadamente, los pacientes con AMD con lesiones subfoveales sometidos a tratamiento con láser experimentaron una reducción más bien abrupta de la agudeza visual (media de 3 líneas) a los 3 meses de seguimiento. Además, a los dos años tratadas post-tratamiento los ojos tratados sólo marginalmente tuvieron mejor agudeza visual que sus homólogos no tratados (medias de 20/320 y 20/400, respectivamente). Otro inconveniente del procedimiento es que la visión después de la cirugía es inmediatamente peor.
- 35
- 40

- La neovascularización coroidea (CNV) demostró ser recalcitrante a tratamiento en la mayoría de los casos. El tratamiento con láser puede extirpar la CNV y ayudar a preservar la visión en casos seleccionados que no involucran el centro de la retina, pero esto se limita a sólo el 10% de los casos. No existe otro tratamiento disponible para corregir la CNV. Desafortunadamente, aún con éxito la fotocoagulación con láser, repite la neovascularización en aproximadamente 50-70% de los ojos (50% más de 3 años y >60% a los 5 años). (Macular Photocoagulation Study Group, Arch. Ophthalmol. 204: 694-701 (1986)). Adicionalmente, muchos pacientes que desarrollan CNV no son buenos candidatos para la terapia con láser debido a que CNV es demasiado grande para el tratamiento con láser, o la ubicación no puede determinarse de manera que el médico no puede apuntar con exactitud el láser. De este modo, hasta la presente invención, ha existido una necesidad bastante sentida por los métodos que evitarán o inhibirán significativamente la neovascularización coroidea.
- 45
- 50

- Además de la AMD, la neovascularización coroidea es causada por trastornos de la retina tales como: síndrome de presunta histoplasmosis ocular, degeneración miópica, estrías angioides y trauma ocular. El daño angiogénico asociado con la neovascularización de la retina e intravítrea se produce en una amplia variedad de trastornos incluyendo la retinopatía diabética, oclusiones venosas, retinopatía de células falciformes, retinopatía del prematuro, desprendimiento de la retina, isquemia y trauma ocular.
- 55

US2002/0123505 A1 describe un dispositivo médico que contiene un análogo de la rapamicina. El dispositivo médico comprende una estructura de soporte que tiene un revestimiento que contiene una sustancia terapéutica.

- 5 Sloper C Myra L y otros "Tacrolimus (FK506) en el tratamiento de la uveítis posterior refractaria a la ciclosporina" OPTHALMOLOGY, vol. 106, núm. 4, abril 1999 (1999-04), págs. 723-728, ISSN: 0161-6420 discute la eficacia y efectos secundarios del tacrolimus en el tratamiento de la uveítis que amenaza la vista.

Descripción de la invención

10 La presente descripción proporciona composiciones que son eficaces en la inhibición de la angiogénesis no deseada, específicamente la neovascularización coroidea (CNV) que está asociada con las enfermedades oculares tales como la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y el síndrome de la histoplasmosis. Las composiciones de la descripción para inhibir la angiogénesis comprenden agentes activos en la familia de compuestos "limus", que se unen a los miembros de la familia de proteínas celulares inmunofilinas, incluyendo las ciclofilinas y proteínas de unión a FK506 (FKBP), para inhibir la angiogénesis en las membranas coroides. Los miembros específicos de la familia de compuestos "limus" incluyen la sirolimus (rapamicina). La rapamicina se usa de acuerdo con la presente invención.

15 Una cantidad terapéutica del agente activo de la invención puede administrarse a un paciente por una variedad de vías diferentes y se puede dar en dosis que son seguras y proporcionan inhibición angiogénica en los sitios internos. La presente descripción proporciona métodos para tratar enfermedades de mamíferos caracterizadas por la angiogénesis no deseada e incontrolada administrando una composición que comprende uno o más agentes activos de la descripción. En la invención se proporcionan los usos de la rapamicina para inhibir o tratar la neovascularización coroidea (CNV) del ojo, como se define en las reivindicaciones.

20 La presente descripción es especialmente útil para tratar ciertas enfermedades neovasculares oculares tales como la degeneración macular, incluyendo la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). La descripción es particularmente útil en el tratamiento o inhibición de la forma húmeda de AMD en donde los vasos sanguíneos crecen en una posición indeseable a partir de su ubicación normal en las coroides debajo de la retina. El derrame y hemorragia a partir de estos nuevos vasos sanguíneos resulta en la pérdida de visión y posiblemente ceguera. La descripción también proporciona métodos para inhibir la transición de la forma seca de AMD (en donde el epitelio pigmentario de la retina o RPE degenera y conduce a la muerte celular del fotorreceptor y la formación de depósitos amarillos debajo de la retina llamados drusas) a la forma húmeda de AMD. La descripción proporciona así además métodos para el tratamiento de la forma seca de la AMD.

25 Los compuestos que se contemplan para uso en la presente invención se administran al paciente para detener la progresión de la enfermedad y permitir las reducciones en, o la regresión de la neovascularización.

30 Como consecuencia, y en un primer aspecto, la invención proporciona composiciones de rapamicina, para inhibir la neovascularización en la retina de un humano o animal como se define en las reivindicaciones. En un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de rapamicina para la preparación de un medicamento para la inhibición o prevención de la neovascularización coroidea en un sujeto como se define en las reivindicaciones.

35 Las ventajas y características novedosas de la invención se expondrán en parte en la descripción, los ejemplos y figuras que siguen, y se pretenden que sean sólo para fines ilustrativos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una reconstrucción tridimensional de los vasos sanguíneos de la retina. Escala bar: 100 µm.

La Figura 2 muestra la CNV en el tejido de un ojo inyectado con Matrigel. Escala bar: 100 µm.

50 La Figura 3 muestra la inhibición de la formación de CNV por rapamicina. Escala bar: 100 µm.

Descripción detallada de las modalidades preferidas de la invención.

La descripción proporciona una composición para el tratamiento de la neovascularización, incluyendo trastornos oftálmicos, y, en particular, trastornos de la retina que implican la degeneración macular y neovascularización coroidea en la retina o entre la retina y su tejido coroideo subyacente, o que involucra el tejido coroideo, como se describió anteriormente. Las composiciones para usar de acuerdo con la invención comprenden un nuevo uso del

supresor inmunológico, rapamicina, que también se conoce como sirolimus lactona macrocíclica (disponible comercialmente como Rapamune[®], Wyeth-Ayerst) (Ver, Libro de Referencias Médicas, 55ta edición). De acuerdo con el Índice Merck, 12da edición, Rapamune se conoce además como RAPA, RPM, sirolimus, AY22989, y NSC-226080.

Aunque Sirolimus se conoce como un inmunosupresor, se ha informado como un compuesto anti-angiogénico en el contexto de los tumores primarios y metastásicos (Guba y otros, Nature Medicine 18(2):128-135 (Feb. 2002) y Guba y otros, Chir. Forum Exp. Klin. Forsch. Band 30, páginas 37-39 (2001)). En esos estudios, no hay discusión relacionadas con otros tipos de neovascularización, tal como la neovascularización coroidea. En su lugar, hay una discusión de la participación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y los niveles séricos de éste. VEGF es un factor implicado en numerosas indicaciones sin la certeza de que las terapias dirigidas a él sean eficaces en el tratamiento de dichas indicaciones. Por ejemplo, el VEGF se sugirió como implicado en la formación de nuevos vasos patogénicos en AMD, aunque la actividad de VEGF nunca se ha probado en un modelo animal con respecto a AMD. Por lo tanto, la capacidad para tratar la AMD enfocando la actividad de VEGF continúa siendo experimental.

Las composiciones de la invención se pueden usar además en conjunto con otros agentes y terapias para el tratamiento de la neovascularización, particularmente la CNV. Los ejemplos de tales agentes y terapias adicionales incluyen pirrolidina, ditiocarbamato (inhibidor de NFκB); escualamina; análogo de TPN 470 y fumagilina; inhibidores de PKC (proteína quinasa C); inhibidores de la quinasa de Tie-1 y Tie-2; inhibidores de quinasa receptor de VEGF; inhibidores de proteosoma tales como Velcade[™] (bortezomib, para inyección; ranibuzumab (Lucentis[™]) y otros anticuerpos destinados al mismo objetivo; pegaptanib (Macugen[™]); antagonistas del receptor de vitronectina, tales como antagonistas del péptido cíclico de integrinas tipo receptor de vitronectina; antagonistas de la integrina α-v/β-3; antagonistas de la integrina α-v/β-1; tiazolidinaciones tales como rosiglitazona y troglitazona; interferón, incluyendo interferón-γ o interferón destinado a CNV mediante el uso de dextrano y coordinación de metales; factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF); endostatina; angiostatina; acetato anecortave; acetónido; triamcinolona; tetratiomolibdato; silenciamiento de ARN o interferencia de ARN (RNAi) de factores angiogénicos, incluyendo ribozimas que se destinan a la expresión de VEGF; Accutane[™] (ácido 13-cis retinoico); inhibidores de la ACE tales como quinoprilo o perindoprilo; inhibidores de mTOR (objetivo de rapamicina en mamíferos); 3-aminotalidomida; pentoxifilina; 2-metoxiestradiol; colchicina; AMG-1470; inhibidores de la ciclooxigenasa tales como nepafenaco, rofecoxib y diclofenaco; modulador del ARN-t sintetasa; inhibidor de la metaloproteasa 13; inhibidor de la acetilcolinesterasa, bloqueadores de los canales de potasio; endorepelina; análogo de la purina de 6-tioguanina, peróxido cíclico ANO-2; arginina deiminasa (recombinante); epigallocatequina-3-galato; cerivastatina; análogos de suramina; moléculas de captura de VEGF; Visudyne[™] y otros fotosensibilizadores con la terapia fotodinámica (PDT); y fotocoagulación con láser.

La "degeneración macular" se caracteriza por la acumulación excesiva de depósitos fibrovasculares en o debajo de la mácula y la retina y la atrofia y/o desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina (RPE). La administración de rapamicina parece limitar la angiogénesis excesiva, tal como la neovascularización coroidea en la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), que puede ocurrir sin este tratamiento. Como se utiliza en la presente, el término "angiogénesis" significa la generación de nuevos vasos sanguíneos ("neovascularización") en un tejido u órgano. Una "enfermedad o afección mediada por la angiogénesis" del ojo o retina es una en la que los nuevos vasos sanguíneos se generan de una manera patogénica en el ojo o retina, resultando en la pérdida de visión u otro problema, por ejemplo, la neovascularización coroidea asociada con AMD.

Las composiciones de la invención pueden administrarse con o sin otros agentes activos *in vitro* o *in vivo*. Cuando administrada *in vitro*, la composición se usa, por ejemplo, para detectar, o ensayar los efectos de, agentes adicionales candidatos activos en la actividad de controlar o reducir la neovascularización o angiogénesis en el tejido o células de la retina o corioide. Esto puede usarse como un ensayo útil para los agentes adicionales de CNV o anti-angiogénesis. Cuando administrada *in vivo* la composición se usa, por ejemplo, para tratar un paciente que tiene una predisposición a desarrollar la neovascularización coroidea típicamente observada en AMD, o para prevenir o inhibir la neovascularización coroidea en este paciente, o para reducir la neovascularización coroidea en un paciente con AMD. Prevenir, inhibir y reducir dan sus significados ordinarios en relación con el efecto de los agentes activos de la invención en la neovascularización coroidea. Un paciente que tiene una predisposición o está en la necesidad de la prevención puede identificarse por la persona experta mediante procedimientos y criterios establecidos en la materia. La persona experta puede además diagnosticar rápidamente los individuos en necesidad de inhibición o tratamiento basándose en los criterios establecidos en la materia para identificar la angiogénesis no deseada y/o neovascularización.

Una cantidad eficaz del fármaco es aquella cantidad que proporciona el efecto terapéutico buscado, *por ejemplo*, una dosis terapéuticamente eficaz de rapamicina o equivalente del fármaco puede ser la cantidad que reduce la neovascularización coroidea en un paciente AMD, o que inhibe o previene completamente la neovascularización coroidea en un paciente predispuesto a AMD o que, incluso sin predisposición, muestra los primeros signos de AMD. Así, la dosis terapéuticamente eficaz puede no ser la misma en cada paciente tratado con rapamicina. Una cantidad

eficaz se refiere además a la cantidad de fármaco que inhibe la neovascularización en un modelo o ensayo de ello, tal como el descrito por la presente invención.

5 "Paciente" se refiere preferentemente a un sujeto que tiene, o que puede desarrollar, la neovascularización coroidea asociada con AMD exudativa a menos que sea tratada con los usos de la presente invención. Este paciente es preferentemente un mamífero, con mayor preferencia un humano, aunque los presentes usos se aplican además al modelo de animales de experimentación e individuos animales veterinarios.

10 El agente activo de la invención, que es rapamicina, se administra preferentemente por vía oral, intravenosa, en forma tópica, intraocular, intramuscular, localmente o en un dispositivo ocular. Con mayor preferencia el modo de administración se selecciona de los siguientes: inyección intraocular, inyección subretinal, inyección subescleral, inyección intracoroidea, inyección subconjuntival, administración tópica, administración oral y administración parenteral. Con la máxima preferencia el agente activo se administra directamente al área de la retina mediante inyección subretinal, aunque se pueden desarrollar modos de administración menos invasivos que son igual de eficaces. Las formulaciones para liberación controlada o liberación retardada en el tiempo se proporcionan también por la presente invención.

15 La dosificación del agente activo dependerá de la afección a tratar, del agente particular, y otros factores clínicos tales como el peso y el estado del humano o animal y la vía de administración del agente. Se debe entender que la presente invención tiene aplicación tanto para uso humano como veterinario. Para administración a humanos, una dosificación eficaz es una que inhibe la neovascularización coroidea. En el caso de la rapamicina, una cantidad inhibidora puede emplearse en el intervalo generalmente entre aproximadamente 0.1 a 300 mg/kg/día, preferentemente entre aproximadamente 0.5 y 50 mg/kg/día, y con la máxima preferencia entre aproximadamente 1 a 10 mg/kg/día. Las dosificaciones de los diversos agentes de la invención para el tratamiento de diversas afecciones se pueden refinar mediante el uso de ensayos clínicos en la presente invención. Además, los intervalos de dosis para la práctica de la invención incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos 6,376,517 y 5,387,589.

20 El agente activo de la invención, rapamicina, puede someterse a operaciones farmacéuticas convencionales, tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales, tales como conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsificadores, tampones etc. Los agentes pueden formularse además con excipientes farmacéuticamente aceptables de uso clínico para producir una composición farmacéutica. Las formulaciones adecuadas de la presente invención para la administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, pastillas o tabletas, que contienen cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite-en-agua o una emulsión de agua-en-aceite y como un bolo, etc. Dicho de otra manera, los agentes activos de la invención se pueden usar para preparar un medicamento para el tratamiento de cualquiera de las afecciones descritas en la presente.

30 Para la administración, el agente activo de la rapamicina se puede combinar con uno o más adyuvantes apropiados por la vía de administración indicada. El agente activo puede mezclarse con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato magnésico, óxido magnésico, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, acacia, gelatina, alginato sódico, polivinilpirrolidina y/o alcohol polivinílico, y tableteados o encapsulados para la administración convencional. Alternativamente, los compuestos de esta invención pueden disolverse en polietilenglicol, propilenglicol, soluciones de carboximetilcelulosa coloidal, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma tragacanto, y/o varios tampones. Otros adyuvantes y modos de administración son bien conocidos en el arte farmacéutico y pueden usarse en la práctica de la invención. El portador o diluyente puede incluir material de tiempo de retardo tales como monoestearato de glicerilo o distearato de glicerilo solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica.

35 Las formulaciones de la invención incluyen aquellas adecuadas para administración oral, oftálmica, (que incluyen intravítrea o intracámara) nasal, tópica (que incluyen bucal y sublingual), o parenteral (que incluyen subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratraqueal, y epidural). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por técnicas farmacéuticas convencionales. Estas técnicas incluyen la etapa de asociación del ingrediente activo y el portador(es) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan mediante la asociación íntima y uniforme del ingrediente activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, la conformación del producto.

40 En la descripción se proporciona además una composición farmacéutica que comprende: una cantidad terapéuticamente eficaz de la rapamicina, y un portador farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración en el ojo o tejido ocular.

En un aspecto de la descripción, se proporciona un estuche, que comprende al menos un vial que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la rapamicina, y un segundo vial que comprende un portador farmacéuticamente aceptable adecuado para administración en el ojo o tejido ocular. Otros estuches de la descripción comprenden componentes tales como el agente activo de la invención para uso en la práctica descrita en la presente, en donde se incluyen además los contenedores, cada uno con uno o más de los diversos reactivos (típicamente en forma concentrada) utilizados en la invención, que incluyen, por ejemplo, tampones y otros reactivos, como sea necesario. Una descripción de la etiqueta o indicador, o un conjunto de instrucciones para el uso de, los componentes del estuche en un uso de la presente invención, se incluirán típicamente además, donde las instrucciones se pueden asociar con un artículo de empaque y/o el envase del estuche o sus componentes.

Las enfermedades asociadas con la neovascularización de la retina/coroidea que se pueden tratar con una composición de acuerdo con la presente invención incluyen la retinopatía diabética, degeneración macular, retinopatía del prematuro, infecciones que causan una retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, degeneración miópica, estrías angioides, trauma ocular, y AMD. Otros ejemplos de enfermedades y afecciones no deseadas que se pueden tratar con una composición de acuerdo con la presente invención incluyen pseudoxantoma elástico, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva de la carótida, anemia de células falciformes, enfermedad de Eales, miopía, desprendimiento crónico de la retina, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, trauma y complicaciones post-láser. Otras enfermedades incluyen las enfermedades asociadas con la rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso, incluyendo todas las formas de vitreoretinopatía proliferativa, estén o no asociadas con la diabetes.

Además de las composiciones para el tratamiento de las afecciones no deseadas, este documento describe también sólo la información de métodos para la visualización de los vasos sanguíneos en un cuerpo. Estos métodos pueden verse además como métodos para etiquetar de forma detectable los vasos sanguíneos en un cuerpo para la visualización posterior. Formas convencionales de procesar muestras de tejido para la visualización de los vasos sanguíneos son tanto trabajosas como consumidoras de tiempo. Para mejorar la eficacia en la preparación del tejido, una técnica denominada Pintura del Vaso se proporciona por la presente invención. El concepto básico de la Pintura del Vaso es teñir selectivamente el revestimiento interior de los vasos sanguíneos con el colorante fluorescente. Los vasos sanguíneos están revestidos con la membrana celular endotelial, una membrana de bicapa lipídica que se puede teñir directamente con un colorante lipofílico. La clave de esta técnica es una solución especialmente formulada, la pintura del vaso, que contiene un colorante lipofílico. Ejemplos no limitantes, de tales colorantes están disponibles a partir de Molecular Probes, y ellos incluyen DiI, DiO, DiO, DiD, DiA, y DiR, que son colorantes de cadena larga de dialquilcarbocianinas y dialquilaminostirilos usados como trazadores neuronales. Mediante la perfusión intracardiaca de un animal con pintura del vaso seguido de un lavado, opcionalmente en una solución de fijación tal como, pero no limitado a, la solución de paraformaldehído al 4%, los vasos sanguíneos se tiñen instantáneamente. Los tejidos se pueden ver por microscopía de fluorescencia inmediatamente después de la perfusión. La tinción es extraordinariamente brillante con un fondo muy bajo para que se puedan obtener las imágenes de alto contraste usando lentes objetivo de diferentes potencias de magnificación.

Este documento describe además la información sólo, de un modelo animal de la neovascularización ocular. El modelo se discute en detalle más abajo, pero generalmente se basa en la inyección de material en el espacio subretinal de un ojo de animal. Cualquier modelo animal no-humano adecuado para la enfermedad ocular se puede usar, y el material inyectado puede variar desde Matrigel™, un extracto de proteínas de la matriz extracelular (ECM) del tumor murino EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) que es ampliamente usado como membrana basal reconstituida en los experimentos de cultivo celular, hasta una solución simple de colágeno I de cola de rata, colágeno I bovino, y colágeno I humano (tales como aquellos disponibles de BD Biosciences). Ver Gautreau, A. y otros, PNAS, 96: 7300. (1999); Abir R. y otros Hum Reprod, 14:299.(1999); y Abir R. y otros Fertil Steril, 75:141. (2001). Otras fuentes de colágeno se pueden usar, incluyendo los producidos usando el colágeno liofilizado (tal como colágeno de la cola de rata de la Roche) disuelto en 0.1X de DME pH 4.0 (DME en polvo de Life technologies sin NaHCO₃, preparar una solución de 10X, pero con el indicador de color de pH, y usar el HCl para ajustar el pH a 4.0, diluir después esta solución con agua para preparar la solución de 0.1X de DME) y una solución 10% de ácido acético.

Sin estar limitados por la teoría, y ofrecido para mejorar la comprensión del modelo, se cree que la inyección de una solución de colágeno (o proteína) es suficiente para mimetizar los depósitos anormales que se producen en la AMD después de la inyección en el espacio subretinal de las ratas que induce nueva invasión de los vasos sanguíneos. Estos modelos de animales se pueden usar ventajosamente para detectar los agentes candidatos activos de la invención de actividad contra la angiogénesis, neovascularización (tales como CNV), y AMD. Los ejemplos de tales métodos incluyen aquellos que comprenden la administración (por cualquier método descrito en la presente) de un agente candidato a dicho animal y la determinación del efecto (aumento, disminución o ningún cambio) en la angiogénesis o neovascularización en dicho animal.

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a las personas de habilidad ordinaria en la industria una exposición y descripción completas de cómo realizar y usar la presente invención. Se han hecho esfuerzos para

asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero algunos errores experimentales y desviaciones deben tenerse en cuenta. A menos que se indique de cualquier otra forma, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados Celsius, y la presión es o cerca de la atmosférica.

5 Ejemplo 1 (Solamente para información)

Modelo animal basado en Matrigel™

Dentro de esta solicitud, a menos que se declare de cualquier otra forma, las técnicas utilizadas pueden encontrarse en cualquiera de varias referencias bien conocidas, tales como: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook y otros, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); "Guide to Protein Purification" in Methods in Enzymology (M. P. Deutscher, ed., (1990) Academic Press, Inc.); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2da Edición, Liss, Inc., Nueva York, N.Y., (1987).

En la búsqueda de tratamientos eficaces para CNV, se creó un modelo animal simple inyectando de 2-3 µl de Matrigel™ en el espacio subretinal de ratas Sprague-Dawley adultas utilizando una aguja de calibre 33 conectada a una microjeringa Hamilton de 10 µl. Una semana o más después, los animales se sacrificaron por inhalación con CO₂ y perfundieron con pintura del vaso, una nueva técnica de visualización desarrollada recientemente en el laboratorio de los inventores que permite detectar los agentes, incluyendo compuestos químicos y proteínas, por su potencial en la inhibición de CNV (Wen, *Resumen de la invención ARVO*, Marzo 2002). La Pintura del Vaso comprende el uso de una solución que contiene Dil, seguido de solución de paraformaldehído al 4%, y se discute además más abajo.

La porción anterior del ojo, que incluyen la córnea y el cristalino, se eliminó, y el ocular se embebió en 5% de agarosa. Secciones en serie del ojo de espesor (100 µm) se cortaron en un vibratomo y se montaron en portaobjetos de vidrio. Las secciones oculares se examinaron por microscopía de fluorescencia para la neovascularización en el depósito de Matrigel™. Se obtuvieron secciones ópticas en serie usando microscopía confocal. La reconstrucción tridimensional de los vasos sanguíneos recién desarrollados se logró usando Auto Visualiz-3D (Autoquant Imaging, Inc.). La pérdida de proteínas de los nuevos vasos se detectó mediante la evaluación del cambio de color en el depósito de Matrigel™ después de la inyección intravenosa del colorante azul de Evan.

La neovascularización se observó ya en 7 días después de la inyección con Matrigel™, y la CNV extensiva fue evidente 10 días después de la inyección con Matrigel™ en todos los ojos inyectados. Nuevos vasos sanguíneos, originados exclusivamente a partir del coriocapilar, invadieron el depósito de Matrigel™ y formaron extensas redes 14 días después de la inyección con Matrigel™. La reconstrucción tridimensional mostró claramente que los nuevos vasos se originaron a partir de la coroides. El depósito de Matrigel™ convirtió en luz de color azul después de la inyección con azul de Evans, en comparación con el blanco pálido del tejido circundante, indicando la pérdida de barrera. La cicatriz en forma de disco se observó 30 días después de la inyección con Matrigel™.

Así, los depósitos subretinales de Matrigel™ inducen CNV en el espacio subretinal, mimetizando la patología vista en la AMD exudativa o de forma húmeda, y proporcionando así un modelo animal mejorado para la investigación de la patología de CNV y para probar terapias potenciales.

Ejemplo 2

Inhibición de CNV

En la caracterización inicial del modelo, se sospechó que existió una posible participación de una reacción inflamatoria al Matrigel™ en la generación de la neovascularización. Como resultado, dos inmunosupresores conocidos se probaron, ciclosporina y rapamicina.

La administración oral de ciclosporina (15 mg/kg/d, dada 4 días antes de la inyección con Matrigel™ un total de 10 días después de la inyección) no tuvo efecto sobre CNV. Sin embargo, en marcado contraste, la rapamicina oral (Rapamune®, 1.5 mg/kg/d, administrada 4 días antes de la inyección de Matrigel™ un total de 10 días después de la inyección) resultó en la inhibición completa del desarrollo de CNV en los 16 ojos probados. La rapamicina está disponible comercialmente como solución oral, comercializada como solución oral de Rapamune por Wyeth-Ayerst. Así, se examinaron más aún las propiedades anti-CNV de la rapamicina en la administración local.

Dado que la rapamicina no es soluble en agua, se disolvió ya sea en DMSO (probado en 8 ojos) o suspendió en PBS (probado en 6 ojos), mezclándose después con Matrigel™. La rapamicina mezclada que contiene Matrigel™ se

inyecta en el espacio subretinal. A una dosis de 25 µg/µl de rapamicina (o 30 µg/inyección, ya que cada inyección usa 1.2 µl de Matrigel™), no hubo otra vez una inhibición completa de CNV en los ojos tratados con rapamicina.

- 5 En experimentos adicionales, y usando los métodos descritos anteriormente, la cantidad de rapamicina se redujo a 2.5 µg/µl. En esta cantidad (la palabra "concentración" no se usa ya que la rapamicina no es soluble en agua), los cristales de la rapamicina fueron claramente visibles, incluso después de 10 días. En cada caso, no hubo neovascularización detectable en los ojos tratados. Las preocupaciones con la insolubilidad, si es que existen, se pueden tratar con el uso de agentes activos solubles de la invención, tales como, pero sin limitarse a, SDZ-RAD.
- 10 Así la rapamicina tiene el potencial para inhibir o prevenir la CNV en pacientes humanos. Además, la administración local de rapamicina es, evidentemente, un enfoque práctico para tratamiento de CNV, que es particularmente ventajosa dado los posibles efectos perjudiciales de la administración sistémica.

Ejemplo 3 (Solamente para información)

Pintura del Vaso

- 15 La retina de una rata normal Sprague-Dawley de 3 meses de edad, sacrificada con sobredosis de CO₂ se perfundió con Pintura del Vaso (Dil, 0.1 mg/ml), seguido por paraformaldehído al 4%. La retina fue disecada y fijada posteriormente en el mismo fijador durante 1 hora, lavada en solución salina regulada con fosfato (PBS), y montada por extenso en portaobjetos de vidrio. Las microfotografías se tomaron en un microscopio Nikon E800.
- 20 Las microfotografías de la retina montada por extenso mostraron brillantemente la tinción de los vasos con un poco fondo. Los núcleos de las células endoteliales se tiñeron también y fueron fácilmente identificables. La estructura espacial de la vasculatura se conservó bien y los capilares de la retina profundos también fueron visibles.
- 25 La red vascular se aprecia mejor con imágenes que muestran su tri-dimensionalidad. Excelentes imágenes 3-D de la vasculatura se pueden obtener mediante la técnica de moldeo-corrosión y la microscopía electrónica de barrido (SEM), ver Konerding MA (1991) Scanning electron microscopy of corrosion casting in medicine. Scanning Microsc. 5:851-865. Sin embargo, el moldeo por corrosión es técnicamente desafiante y consume mucho tiempo, como lo es la SEM. Alternativamente, las imágenes 3-D se pueden reconstruir a partir de un paquete de secciones ópticas en serie mediante la microscopía confocal. La tinción brillante y una alta relación de señal-ruido por la Pintura del Vaso hace posible obtener las secciones ópticas en serie de las muestras tan gruesas como 100-150 µm con la microscopía confocal de barrido sin deterioro significativo de la señal desde el inferior de la muestra incluso usando lentes de objetivo de baja potencia de magnificación. Imágenes 3-D de alta calidad se pueden reconstruir en diferentes ángulos de visión a partir de un paquete de imágenes digitales 2-D usando el programa comercialmente disponible. La Figura 1 muestra las imágenes 3-D reconstruidas de una retina-montada por extenso, procesada
- 30 como se describe anteriormente. Un paquete de 78 secciones ópticas a lo largo del eje Z (paso-Z = 1 µm) se tomó por microscopía confocal usando una lente de objetivo 20X en un microscopio confocal Bio-Rad MRC-1024. Imágenes tres-D se reconstruyeron para mostrar la vasculatura de la retina en un ángulo de 0° (-) o 180° (Fig. 1B). Ambos representan una arteria en la superficie de la retina con conexiones a los capilares profundos.
- 35

Ejemplo 4

CNV en el área inyectada con Matrigel™

- Matrigel™ es un extracto de proteínas de la matriz extracelular (ECM) del tumor murino EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) y se usa ampliamente como membrana basal reconstituida en experimentos de cultivo celular. Se usa además para evaluar los agentes angiogénicos o antiangiogénicos en un ensayo *in vivo*, el ensayo de tapón de Matrigel™ (Passaniti A, Taylor RM, Pili R, y otros (1992) A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. Lab Invest. 67:519-528). Estudios patológicos indican una asociación entre CNV y los depósitos anormales de la matriz extracelular (ECM) en la ubicación entre el epitelio pigmentario de la retina (RPE) y la membrana de Bruch. Para mimetizar los depósitos anormales que se producen en la AMD, el Matrigel™ se inyectó en el espacio subretinal de las ratas. Nuevos vasos sanguíneos invaden los depósitos de Matrigel™ poco después de la inyección con Matrigel™.
- 45
- 50

- A continuación, el Matrigel™ (1-2µl) se introdujo en el espacio subretinal por inyección en los ojos de las ratas Sprague-Dawley. En un tiempo dado después de la inyección, el animal se sacrificó y perfundió con Pintura del Vaso, seguido por la solución de paraformaldehído al 4%. La porción anterior del ojo se eliminó y el ocular se embebió después en 5% de agarosa. Secciones transversales seriadas (100µm de espesor) se cortaron en un vibratomo.
- 55

5 Nuevos vasos sanguíneos procedentes del coriocapilar se detectaron ya en 4 días después de la inyección con Matrigel™ y se tomaron bien desarrollados en 10 días después de la inyección. Una imagen DIC de una sección transversal de un ojo, de un animal de 2 meses edad, 10 días después de la inyección con Matrigel™, se muestra en la Fig. 2A. La imagen DIC se superpuso con una sección óptica para mostrar CNV junto con la vasculatura corioidea y de la retina (Fig. 2A). Nuevos vasos sanguíneos penetran en la membrana de Bruch en un único sitio (punta de flecha amarilla) y ramifican después en la capa de Matrigel™ entre el RPE y la retina. Un paquete de 42 secciones ópticas se tomaron a partir de esta muestra y se reconstituyó una imagen 3-D (Fig. 2B). La imagen 3-D muestra claramente que los nuevos vasos sanguíneos procedentes del coriocapilar atraviesan un único sitio de penetración (punta de flecha amarilla).

10 La permeabilidad de los vasos sanguíneos recientemente formados se evaluó mediante el ensayo de azul de Evans. El azul de Evans (60mg/kg en PBS) se inyectó por vía intravenosa a una rata Sprague-Dawley, cuyos ojos se habían inyectado con Matrigel™ 10 días antes. Una preparación de corioide-retina se disecó, montó por extenso y observó por microscopía de fluorescencia. La tinción de azul de Evans se observó sólo en el área inyectada con Matrigel™, lo que indica la naturaleza permeable de los nuevos vasos.

Ejemplo 5

Inhibición de CNV por la rapamicina

20 En detecciones iniciales de agentes potenciales anti-angiogénicos usando el modelo de Matrigel™, la rapamicina demostró una notable capacidad para inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos. La rapamicina, usada clínicamente como inmunosupresor (Kahan BD (2001) Sirolimus: a comprehensive review. Expert Opin. Pharmacother. 2:1903-1917), se une a un FKBP (proteína de unión a FK506) para formar un complejo FKBP-rapamicina, que a su vez inhibe la función de mTOR (diana en mamíferos de la rapamicina), un controlador central del crecimiento celular (Schmelzle T, Hall MN (2000) TOR, a central controller of cell growth. Cell 103:253-262). La rapamicina inhibe la proliferación de células endoteliales (Vinals F, Chambard JC, Pouyssegur J (1999) p70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation. J. Biol. Chem. 274:26776-26782) y la respuesta al VEGF (Yu Y, Sato JD (1999) MAP kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and p70 S6 kinase mediate the mitogenic response of human endothelial cells to vascular endothelial growth factor. J. Cell Physiol. 178:235-246) y bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básicos) y PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas). Ver Cao y otros (1995) Effects of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. Inhibition of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor action and antagonism of rapamycin by FK506. Transplantation 59(3):390-5 y Ruygrok y otros (2003) Rapamycin and cardiovascular medicine. Intern. Med. J. 33(3):103-9. Se demostró que bloquea la angiogénesis tumoral (Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, y otros (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. Nat. Med. 8:128-135).

35 Ratas adultas Sprague-Dawley (n = 22) se inyectaron con Matrigel™ en el espacio subretinal. Los animales se alimentaron con la rapamicina una vez al día a una dosis de 3 mg/kg iniciada 4 días antes de la inyección con Matrigel™. Los ojos se recogieron a los 10 días (n = 18) o 20 días (n = 4) después de la inyección con Matrigel™ y se procesaron como se describe en el Ejemplo 4. Las secciones de tejido se examinaron por microscopía de fluorescencia. Ninguno de los ojos recogidos a los 10 días contuvo nuevos vasos sanguíneos invadiendo el espacio subretinal en los animales tratados con rapamicina. En el grupo de 20 días, algunos vasos sanguíneos recién formados comenzaron a invadir el área del Matrigel™. La cantidad de CNV en este grupo fue semicuantificado como (+). En comparación, CNV en animales de control (10 días) se clasificaron como (+++~++++), como se muestra en la Fig. 2.

40 En otro grupo de animales, la rapamicina se mezcló con Matrigel™ (suspensión, 1 µg/µl, n=6; 10 µg/µl, n=11) y co-inyectó en el espacio subretinal con Matrigel™ (suministro en gel). Los ojos se recogieron 10 días después de la inyección y se procesaron como se describe en el Ejemplo 4. No se encontró CNV en ninguno de los ojos tratados con rapamicina mediante el suministro en gel. La Fig. 3 muestra una imagen DIC de una sección de un ojo, inyectado con la mezcla de Matrigel y rapamicina a una dosis alta (10 µg/µl de suspensión) 10 días antes de la recolección del tejido, para mostrar las partículas de rapamicina en el espacio subretinal. Las partículas de rapamicina en el Matrigel™ son claramente visibles en la imagen DIC, que se superpone sobre una imagen confocal de la tinción con Pintura de Vaso para mostrar los vasos sanguíneos corioideos y retinales. No se encontró CNV en ninguno de los ojos inyectados con rapamicina.

50 En todos los experimentos, la rapamicina no tuvo ningún efecto distintivo en la vasculatura normal del ojo. La ciclosporina, un inmunosupresor también, falló para inhibir la formación de CNV ya sea cuando se administró por vía oral (100 mg/kg/d, n=3) o en gel (25 µg/µl, n=3) con el mismo prototipo experimental.

Ejemplo 6 (Solamente para información)

Índice de CNV en los ojos tratados con tacrolimus FK506

5 FK506, que no es soluble en agua, se mezcló con Matrigel™ (como una suspensión) a 10 µg/µl, y 1.2 µl se inyectaron en el espacio subretinal como se describió anteriormente. Los ojos se recogieron 10 días después de la inyección de los vasos y los vasos sanguíneos se tiñeron con la Pintura del Vaso. Los ojos se embebieron en agarosa al 5% y se cortaron secciones seriadas (100 µm de espesor) en un vibratomo. CNV se examinó por microscopía de fluorescencia y se calculó el índice de CNV de cada ojo. Los resultados se muestran más abajo.

FK506	Promedio = 12.67 (n = 6)	SEM = 2.76
Control	Promedio = 32.00 (n = 10)	SEM = 6.41
prueba t de Student	P = 0.042	

10

Por lo tanto, FK506 inhibió CNV en 60%.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de la rapamicina y un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para administración en el ojo o tejido ocular para la preparación de un medicamento para la inhibición o prevención de la neovascularización coroidea en un mamífero, en donde la neovascularización coroidea se produce en trastornos de la retina o subretinales de la degeneración macular relacionada con la edad, síndrome de presunta histoplasmosis ocular, degeneración miópica, estrías angioides o trauma ocular, y el medicamento es para que se administre por un modo de administración seleccionado del grupo que consiste de inyección intraocular, inyección subretinal, inyección subescleral, inyección intracoroidea , e inyección subconjuntival.
- 10 **2.** El uso de la reivindicación 1, en donde dicho mamífero es un humano.
- 3.** El uso de la reivindicación 1, en donde dicho medicamento es adecuado para la administración intravítrea.
- 15 **4.** Una composición de rapamicina para su uso en la inhibición o la prevención de la neovascularización coroidea en un mamífero, dicha composición de rapamicina que comprende una cantidad eficaz de rapamicina y un portador farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración en el ojo o tejido ocular, en donde la neovascularización coroidea se produce en trastornos de la retina o subretinales de la degeneración macular relacionada con la edad, síndrome de presunta histoplasmosis ocular, degeneración miópica, estrías angioides o trauma ocular, y el medicamento es para que se administre por un modo de administración seleccionado del grupo que consiste de inyección intraocular, inyección subretinal, inyección subescleral, inyección intracoroidea, e inyección subconjuntival.
- 20 **5.** La composición de rapamicina para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho mamífero es un humano.
- 25 **6.** La composición de rapamicina para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho medicamento es adecuado para la administración intravítrea.

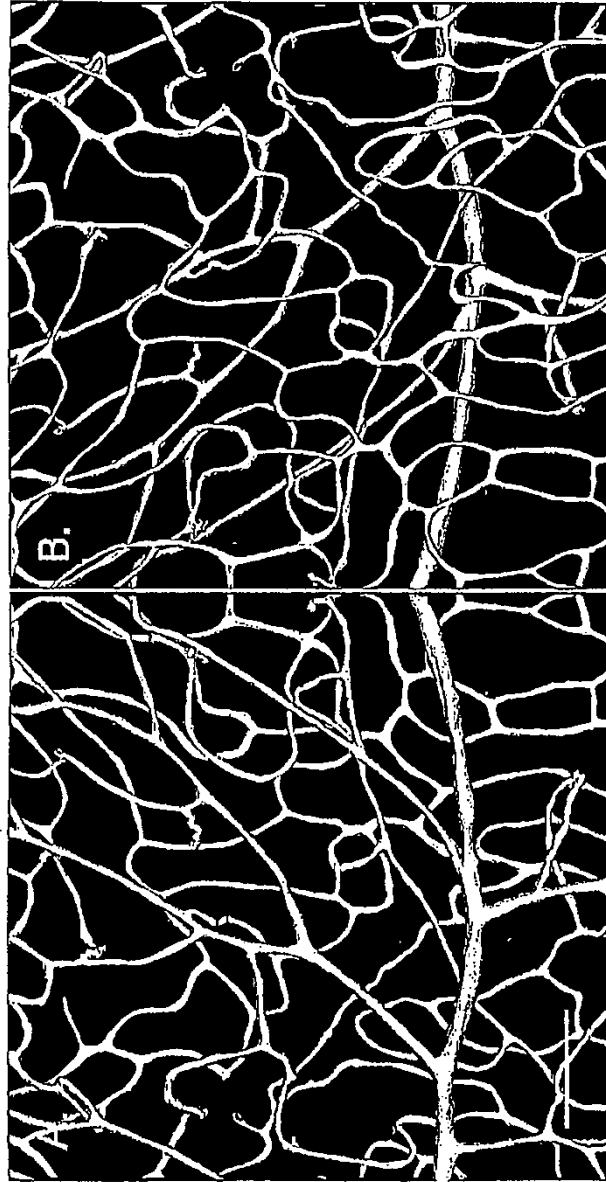


Fig. 1

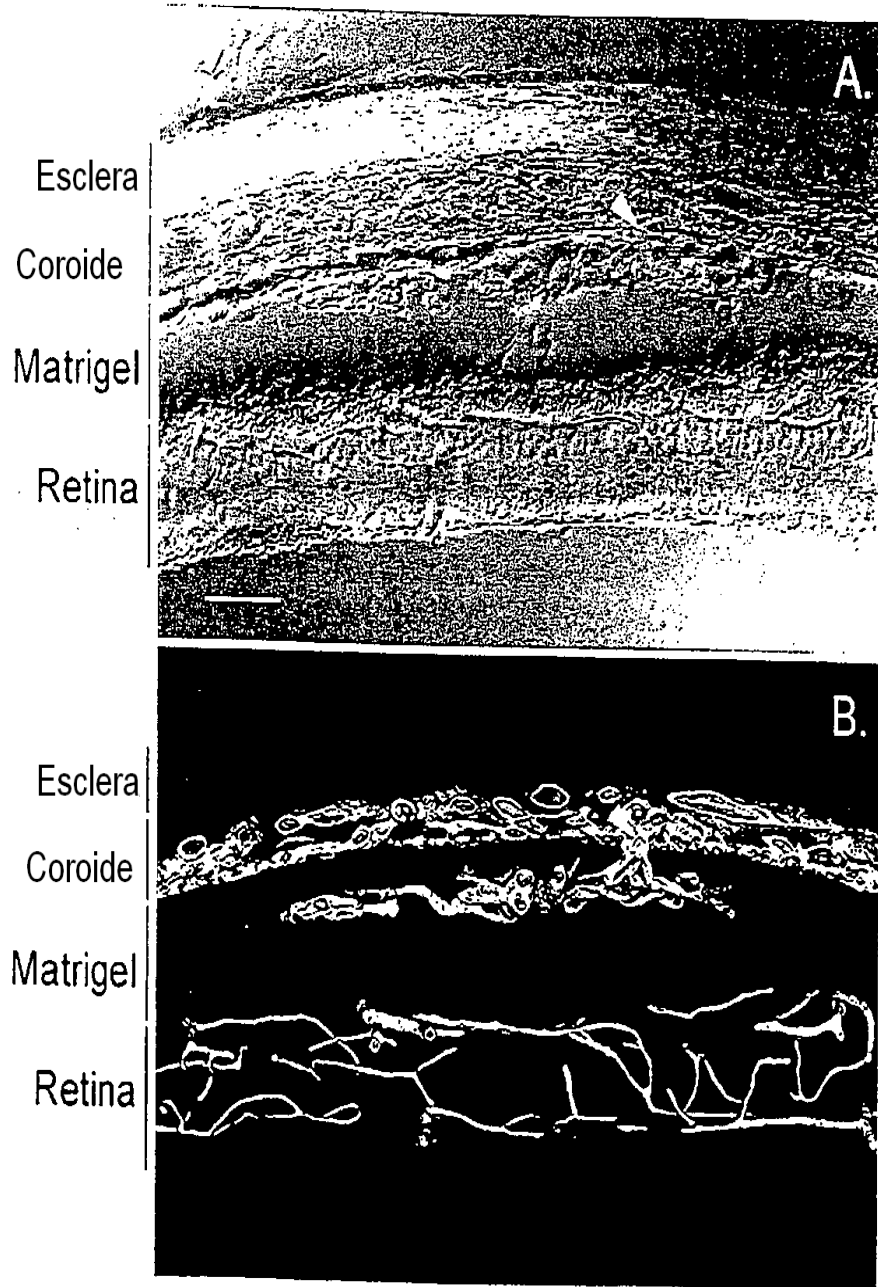


Fig. 2



Fig. 3