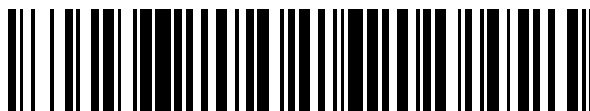


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 292**

51 Int. Cl.:

A61K 31/416 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

A61B 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2013 PCT/CA2013/050335**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13163758**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2013 E 13785144 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2844250**

54 Título: **Métodos de tratamiento y diagnóstico de enfermedades oculares que causan ceguera**

30 Prioridad:

01.05.2012 US 201261640854 P

02.05.2012 US 201261641393 P

24.08.2012 US 201261693226 P

15.03.2013 US 201361792436 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2018

73 Titular/es:

**TRANSLATUM MEDICUS INC. (100.0%)
Unit 2107, 112 George Street
Toronto, ON M5A 3S9, CA**

72 Inventor/es:

BOYD, SHELLEY ROMAYNE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 656 292 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

Métodos de tratamiento y diagnóstico de enfermedades oculares que causan ceguera.

5 PRIORIDAD

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/640.854, depositada el 1 de mayo de 2012, la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/641.393, depositada el 2 de mayo de 2012 y la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/693.226, depositada el 24 de agosto de 2012.

10

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a métodos y composiciones que son útiles para el diagnóstico, el tratamiento o la prevención de una enfermedad ocular que causa ceguera, incluyendo el descubrimiento de fármacos que son eficaces contra estas enfermedades.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las enfermedades oculares que causan ceguera incluyen varios trastornos que afectan a la visión. La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es la causa principal de disfunción ocular, incluyendo ceguera. Una forma de DMAE, la DMAE no exudativa, también conocida como DMAE «seca», se caracteriza habitualmente por la acumulación de drusas en el interior o exterior del epitelio pigmentario retiniano (EPR). En etapas tardías de la DMAE seca, se produce atrofia del EPR y los fotorreceptores, conos y bastones, suprayacentes. Una segunda forma de DMAE, la DMAE exudativa, «húmeda» o «neovascular», se caracteriza por neovascularización coroidea. Frecuentemente, la enfermedad en etapa temprana es DMAE seca, mientras que la etapa más tardía es frecuentemente DMAE húmeda (neovascular) o DMAE seca (atrófica).

Las drusas son manchas o depósitos blanquecinos que se forman en el interior o exterior del EPR. Las drusas son la característica determinante o patognomónica de la DMAE. Por el contrario, los términos «pseudodrusas», «depósitos drusenoides» o «depósitos drusenoides subretinianos», se han usado para describir depósitos discretos o un patrón reticular o curvilíneo amarillento que se sugiere que yace en la zona anterior al EPR, respecto al trayecto de la luz que entra al ojo, en el espacio subretiniano.

Debido a las diferencias en las técnicas de diagnóstico por imágenes, hay una controversia en torno a la prevalencia de pseudodrusas reticulares (RPD, por sus siglas en inglés), y muchos tienen la hipótesis de que esta prevalencia está infravalorada. Al igual que la DMAE, la RPD está asociada a la edad. La RPD también está fuertemente asociada a la pérdida de visión, debido habitualmente a la atrofia geográfica o la neovascularización coroidea. Sin embargo, a diferencia de la DMAE clásica, se caracteriza por un patrón reticular o curvilíneo de entrelazamiento que puede visualizarse en múltiples longitudes de onda de la luz, incluyendo, pero no limitadas a, la luz blanca, azul, la autofluorescencia azul, la luz anérita, el infrarrojo cercano o el infrarrojo. La característica determinante o patognomónica de la RPD no son las drusas sino las «pseudodrusas», los «depósitos drusenoides» o los «depósitos drusenoides subretinianos», que tienen aspecto de depósitos en forma de cúpulas con la base hacia abajo, triángulos, o depósitos lanceolados que yacen en la parte anterior al (sobre) EPR, en el espacio subretiniano, cuando se evalúan la retina externa y el EPR en el plano transversal, tal y como puede ocurrir ópticamente usando, por ejemplo, tomografía de coherencia óptica (OCT) o en muestras post-enucleación usando, por ejemplo, histología con o sin inmunohistoquímica. A diferencia de la DMAE clásica, la RPD puede estar asociada a una mayor muerte cardiovascular. Actualmente, sin querer ceñirnos a la teoría, la RPD se puede considerar una forma totalmente diferenciada de la enfermedad macular asociada a la edad, en lugar de un subtipo de la DMAE. La RPD también se puede considerar un subtipo de «goteo difuso» de la DMAE seca.

El documento WO 2010/129843 desvela el dihidronaftiridinil, un antagonista del receptor CCR2, para uso en el tratamiento de trastornos oftalmológicos.

Actualmente, hay escasez de fármacos para el tratamiento efectivo de enfermedades oculares que causan ceguera, tales como la DMAE o RPD. Por lo tanto, sigue habiendo necesidad de terapias que sean útiles para el tratamiento de estas enfermedades y otras enfermedades oculares que causan ceguera. Además, hay necesidad de un diagnóstico efectivo de estas enfermedades.

RESUMEN DE LA INVENCION

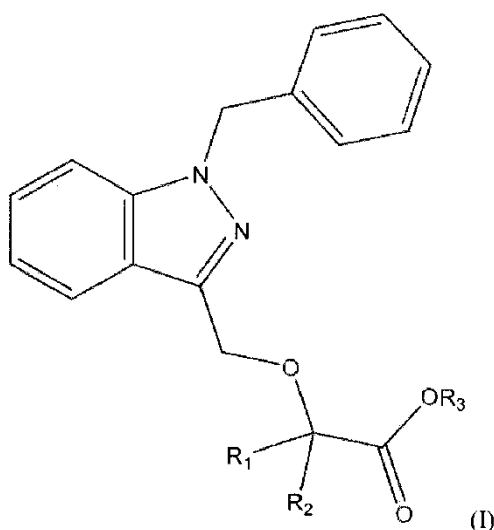
60

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, en un aspecto, se desvela un método para identificar si un compuesto candidato es útil para el

tratamiento de una enfermedad ocular que causa ceguera, que comprende (a) la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de ensayo a un animal cuyo ojo comprende (i) un compuesto fluorescente en una cantidad efectiva para indicar la presencia de una enfermedad ocular que causa ceguera en el animal y (ii) una toxina en una cantidad efectiva para inducir atrofia del tejido ocular; (b) la exposición del ojo a luz de una longitud de onda e intensidad efectivas para provocar que el compuesto fluorescente exhiba fluorescencia; (c) la comparación del patrón de fluorescencia del ojo con un patrón de fluorescencia del ojo de un animal que comprende el compuesto fluorescente y la toxina pero no el compuesto de ensayo; y (d) selección del compuesto de ensayo como un compuesto candidato si el resultado de la comparación de la etapa (c) indica que el compuesto de ensayo es útil para el tratamiento de una enfermedad ocular que causa ceguera.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto para uso en el tratamiento o la prevención de la DMAE seca para administración a un sujeto con necesidad del mismo en una cantidad efectiva, siendo el compuesto de **Fórmula I**:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_1 y R_2 son independientemente H o un alquilo C_1 - C_6 y R_3 es H o un alquilo C_1 - C_6 .

También se desvela un método de tratamiento o prevención de la DMAE seca, que comprende la administración a un sujeto con necesidad de la misma de una cantidad efectiva de metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se desvela un método de tratamiento de la enfermedad RPD, que comprende la administración a un sujeto con necesidad de la misma de una cantidad efectiva de un compuesto de **Fórmula I** (tal y como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_1 y R_2 son independientemente H o un alquilo C_1 - C_6 y R_3 es H o un alquilo C_1 - C_6 .

También se desvela un método de tratamiento de la enfermedad RPD, que comprende la administración a un sujeto con necesidad de la misma de una cantidad efectiva de metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se desvela un método para identificar a un sujeto que padece una enfermedad ocular que causa ceguera y que es probable que responda al tratamiento con un agente que comprende la determinación de si el ojo del sujeto tiene, o ha tenido anteriormente, un aumento (incluyendo un aumento transitorio) de permeabilidad a través de la barrera epitelial entre una coroides y una retina del ojo con respecto a un estado sano; donde el aumento de permeabilidad indica que es más probable que el sujeto responda al tratamiento con el agente; y donde el agente se selecciona de entre metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y/o un compuesto de **Fórmula I** (tal y como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_1 y R_2 son independientemente H o un alquilo C_1 - C_6 y R_3 es H o un alquilo C_1 - C_6 .

También se desvela un método para identificar a un sujeto que padece una enfermedad ocular que causa ceguera y que es más probable que responda al tratamiento con un agente que comprende la determinación de si el ojo del sujeto tiene una presencia (p. ej., una afluencia) de células inmunitarias fagocíticas a lo largo de un EPR con respecto a un estado sano; donde la presencia de células inmunitarias fagocíticas indica que es más probable que el

sujeto responda al tratamiento con el agente; y donde el agente se selecciona de entre metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y/o un compuesto de **Fórmula I** (tal y como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_1 y R_2 son independientemente H o un alquilo C_1-C_6 y R_3 es H o un alquilo C_1-C_6 .

También se describe un método para determinar si una enfermedad ocular que causa ceguera en un sujeto es sensible a tratamiento con un agente que inhibe la función de las células inmunitarias de un sujeto, que comprende la detección de una presencia, la detección de una ausencia o la medición de una cantidad de células inmunitarias en el ojo del sujeto, donde el ojo del sujeto exhibe fluorescencia en respuesta a luz de una longitud de onda de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 900 nm.

Los detalles de la invención se exponen a continuación en la descripción adjunta. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación, se describen métodos y materiales ilustrativos. Otras características, objetivos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y las reivindicaciones. En la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares también incluyen el plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden normalmente los expertos en la materia a los que se dirige la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **FIG. 1** muestra que el diagnóstico por imágenes mediante autofluorescencia del fondo del ojo (FAF) *in vivo* tras inyección de NaIO_3 identifica áreas geográficas de daño que desarrollan un patrón reticular. La angiografía con ICG

identifica permeabilidad coriorretiniana transitoria. La **FIG. 1A** muestra un curso temporal de cambio temprano de FAF alrededor de la cabeza del nervio óptico. Una línea o un borde hiperfluorescente formado 2-3 días después de la inyección de NaIO_3 . El borde puede rodear o no completamente la cabeza del nervio óptico y no es contiguo a ella. Apareció un patrón de fluorescencia reticular o con forma de encaje entre los días 3 y 7, y yació periférico a esta línea. En el día 7, este patrón era inconfundible.

La **FIG. 1B** muestra imágenes compuestas que incluyen la cabeza del nervio óptico y la retina periférica media e ilustran que los bordes hiperfluorescentes definían áreas de futura hiperfluorescencia reticular o con forma de encaje. En este ejemplo, los bordes vistos en el Día 3 post- NaIO_3 definían una isla en la retina inferior. En el día 7, el borde ya no era visible y, en su lugar, emergieron patrones reticulares profundos. Cabe señalar que en la imagen que muestra dos islas totalmente diferenciadas en los Días 3 y 7, estas proceden de diferentes animales y demuestran la consistencia con la que se observan los patrones. Pequeñas islas tales como estas se vieron en aproximadamente el 7 % de los ojos.

La **FIG. 1C** muestra que el patrón de FAD es completamente diferente de los patrones de la retina y la vasculatura coroidea vistos con fluoresceína (imágenes izquierda y media de la retina interna y media, respectivamente) o angiografía con ICG (imagen derecha) de la coroides.

La **FIG. 1D** muestra un aumento transitorio de la permeabilidad transepitelial producido alrededor del Día 2, antes de la progresión del patrón, y es evidente por una descarga significativa durante la angiografía con ICG (790 nm, aproximadamente 6 minutos después de la inyección del colorante). Esta descarga de ICG no se detectó en el Día 1 posterior a la inyección de toxina, apareció brevemente, y se ve raramente en el siguiente momento temporal ensayado sistemáticamente, en el Día 3 o 4.

La **FIG. 2** muestra la maduración del cambio de FAF tras la inyección de NaIO_3 en grandes anillos de 360° .

La **FIG. 2A** muestra imágenes FAF compuestas grandes que abarcan gran parte del polo posterior e identifican un anillo de 360° de daño definido por un borde retiniano, tanto peripapilar como periférico. Las imágenes de FAF tomadas 7 días después del NaIO_3 identificaron múltiples áreas de hiperfluorescencia curvilínea, discretas y contiguas, que forman patrones ovales, redondos, festoneados, en forma de roseta o en forma de huella animal. Habitualmente, estos emergieron entre los días 7 y 14. Se proporcionan detalles en la imagen ampliada superior. Estos complejos patrones de FAF surgen en el interior de los bordes hiperfluorescentes más tempranos y confluyen con el tiempo.

La **FIG. 2B** muestra que en el día 14, la mayoría de animales muestra un patrón de hiperfluorescencia reticular prácticamente contiguo a lo largo de todo el anillo de 360° . Se proporciona un detalle en el cuadro del centro.

La **FIG. 2C** muestra que en el día 28 tras la exposición a NaIO_3 , el patrón tomó un aspecto más granular. Las áreas pequeñas en las que el patrón es menos evidente se ven como áreas grises más oscuras.

La **FIG. 2D** muestra una imagen clínica del patrón de «goteo difuso» de FAF para su comparación. La presente invención, entre otras cosas, recapitula muchas de las características, incluyendo la hipofluorescencia gris reticular, lobular o en forma de óvalos festoneados asociada a la hiperfluorescencia periférica.

La **FIG. 3** muestra que, en las semanas posteriores a la inyección de NaIO_3 , se desarrolla un patrón reticular curvilíneo de deformación de la retina externa.

La **FIG. 3A** muestra que este patrón corresponde a la distribución de células autofluorescentes. Se muestran imágenes bajo luz blanca de baja potencia (1x, columna izquierda; 5x, columna derecha) de preparaciones

completas de retina extirpada tomadas antes de la inyección de NaIO_3 (punto de referencia) y en los días 4 y 7 posteriores a la inyección. Se observa un sutil patrón curvilíneo 3-4 días después, en comparación con el punto de referencia, y es evidente en el día 7.

La **FIG. 3B** muestra que para el día 14 post- NaIO_3 , este patrón reticular es pronunciado y corresponde a la deformación macroscópica de la retina externa. Esta tenía aspecto de muescas o pliegues en las secciones transversales vistas en el punto de las incisiones relajantes (ampliado en el cuadro).

La **FIG. 3C** muestra que la microscopía epifluorescente en el canal de 488 nm, sin tinción celular, mostraba la presencia de células autofluorescentes que yacían en el interior de las ranuras reticulares. Esto resultó evidente tanto usando emisión de luz de banda ancha (columna izquierda) como excitación y emisión de luz de banda estrecha (columna derecha) y corresponde a la longitud de onda usada durante el diagnóstico por imágenes mediante FAF. Los pliegues de la retina se asociaron a la presencia de pequeños puntos fluorescentes en el Día 7. Una ampliación adicional mostró claramente la distribución de pequeñas células fluorescentes, con vacíos para sus núcleos. El tejido de control positivo tras inyección sistémica de fluoresceína-dextrano (como para angiografía) confirmó la capacidad de detectar fluorescencia a 488 nm en retina o copa ocular extirpadas (similar en longitud de onda a la usada para FAF en el diagnóstico por imágenes mediante HRAll) sin procesamiento ni tinción del tejido. El control negativo en el punto de referencia muestra ausencia de células autofluorescentes.

La **FIG. 4** muestra ilustraciones interpretativas que muestran cómo los hallazgos de tejido determinado histológicamente pueden justificar el diagnóstico por imágenes *in vivo* tras la pérdida de EPR inducida por NaIO_3 .

La **FIG. 4A** muestra imágenes clínicas de un paciente con DMAE temprana y muestra pseudodrusas reticulares y lesiones denominadas «diana» en el canal NIR (parte superior). Inmediatamente debajo, hay dos superposiciones esquemáticas que enfatizan las manchas hipofluorescentes (las habitualmente definidas como depósitos drusenoides), primero en negro para destacarlas y, a continuación, con un fondo brillante para destacar la señal brillante implicada. Las dos imágenes de la parte inferior destacan múltiples lesiones diana pequeñas de RPD (en el interior de los círculos), mientras que la más esquemática de la parte inferior ilustra la presencia de un posible halo y una lesión diana formada por pliegues concéntricos de tejido.

La **FIG. 4B** muestra representaciones esquemáticas que indican una relación directa entre la histología de la ONL de la preparación completa tridimensional y las imágenes clínicas de FAF frontales bidimensionales. En el día 14 posterior a la exposición a NaIO_3 , la retina externa muestra complejos pliegues de la ONL media (mostrados con una magnificación relativamente baja [original 40x] y ampliados digitalmente). La magnificación digital muestra anillos concéntricos de pliegues de tejido. Esta misma área ilustrada en blanco y negro muestra cómo esto podría tener el aspecto de una región circular u oval con un vacío central en FAF. La representación en blanco y negro invertida (una imagen «negativa») muestra que esta disposición de la distorsión de la ONL parecería tener una diana brillante central.

La **FIG. 4C** muestra el diagnóstico por imágenes mediante OCT de la retina de rata 14 días después de la inyección de NaIO_3 , que muestra claramente «puntas» brillantes a lo largo de la retina externa. Estas se describen clínicamente. Secciones histológicas similares tomadas a lo largo de la retina externa demuestran pliegues de la ONL con células inflamatorias subyacentes en el espacio subretiniano ampliado que forman estrechas columnas de células. Para poder comparar con las imágenes *in vivo*, estas se representan en blanco y negro. En la imagen en blanco y negro invertida (una imagen pseudonegativa que coincide con las imágenes de OCT), se ve que la ONL desaparece mientras que las densidades subretinianas tienen un aspecto brillante.

La **FIG. 5** muestra que la fluorescencia en el NIR moteada se detecta mediante diagnóstico por imágenes con cSLO a 795/810 nm, pero no se puede detectar sin inyección previa de ICG, es decir, esta fluorescencia solo se puede detectar con los filtros de excitación/emisión colocados, pero no es coincidente con, o en, el periodo de tránsito posterior a la inyección de colorante (es decir, usando el método DNIRA). Las **FIG. 5A-F** muestran imágenes de oftalmoscopia láser de barrido confocal (cSLO) e imágenes angiográficas de ratas SD de tipo salvaje obtenidas usando:

FIG. 5A: luz anerytra.

FIG. 5B: reflectancia infrarroja (830 nm).

FIG. 5C: autofluorescencia a 488/500 nm (FAF).

FIG. 5D: fluorescencia en el NIR a 795/810 nm.

Las **FIG. 5E-F** ilustran la vasculatura retiniana y coroidea normales usando colorante de fluoresceína-dextrano e ICG, respectivamente. Estas y otras imágenes similares sirvieron como control para todos los experimentos. Tal diagnóstico por imágenes se usó para alinear adecuadamente la profundidad de enfoque dentro y entre la retina y las capas de EPR.

La **FIG. 5G** muestra un curso temporal de análisis retardado en el infrarrojo cercano (DNRIA) en un animal representativo que recibió una única inyección de 5 mg/kg de colorante ICG en $t = 0$. No se ve ninguna señal detectable antes de la inyección del colorante (obsérvese la imagen homogéneamente oscura, fila superior). Durante la angiografía (segunda fila), se visualizaron los vasos sanguíneos de la retina y el fondo no fue detectable, teniendo en cuenta que se redujo la ganancia (sensibilidad) de la cSLO para evitar la saturación durante la fase de tránsito. En los días posteriores a la angiografía (filas 3-5), hay un aumento de fluorescencia de fondo moteada o punteada en comparación con el punto de referencia. La fluorescencia retardada en el NIR está bloqueada por los vasos sanguíneos suprayacentes y no se observa en la cabeza del nervio óptico, pero a diferencia de la FAF (**FIG. 5H**) forma un arco o anillo brillante alrededor de la cabeza del nervio. La señal permanece fuerte y distribuida a lo largo

del fondo del ojo más de 28 días después de la inyección con la concentración usada (5 mg/kg). El segmento ligeramente más oscuro de la fila inferior probablemente refleja la presencia de una vena del vórtex coroideo.

Al contrario que el curso temporal del DNIRA, la **FIG. 5H** muestra que la señal de autofluorescencia a 488/500 nm se revierte a la intensidad previa a la inyección (fila superior) cuando se visualiza a los 3, 8 y 28 días después de la angiografía con fluoresceína (filas inferiores). El segmento ligeramente más oscuro de la fila inferior probablemente refleja la presencia de una vena del vórtex coroideo.

La **FIG. 6** muestra que la intensidad de la señal fluorescente en el NIR se correlaciona con la dosificación de ICG usando DNIRA.

La **FIG. 6A** muestra imágenes de cSLO del control que ilustran la ausencia de señal fluorescente en el ciclo a 795/810 cuando no se ha administrado inyección del colorante ICG. Los animales control que no recibieron ICG mantuvieron el mismo nivel de fluorescencia de fondo con una señal poco significativa a lo largo del periodo de 21 días evaluado.

La **FIG. 6B** muestra que, usando la misma ganancia, la fluorescencia retardada en el NIR era fácilmente detectable 48 horas después de la inyección de ICG cuando se administraba a la dosis baja de 0,35 mg/kg. Sin embargo, con el tiempo, el DNIRA muestra un desvanecimiento gradual a partir de las 48 horas y hasta los 21 días después de la inyección.

La **FIG. 6C** muestra que, usando la misma ganancia, la angiografía con 5 mg/kg de ICG derivaba en una fluorescencia retardada en el NIR más brillante (intensidad más alta) a las 48 horas que la dosis más baja (**FIG. 6B**). Esta fluorescencia persistía en gran parte invariable hasta después de 21 días.

La **FIG. 6D** muestra que, por el contrario, el canal de reflectancia en el NIR de 830 nm no muestra un cambio similar.

La **FIG. 7** muestra que el yodato sódico provoca una pérdida irregular de fluorescencia retardada en el NIR, gracias a la que se desarrolla una vista clara de la vasculatura coroidea.

La **FIG. 7A** muestra un análisis DNIRA realizado 3 días después de la inyección de ICG y NaIO₃. Se vio pérdida de fluorescencia moteada en parches o áreas claramente definidos del polo posterior. Estas áreas tenían un aspecto oscuro, o hipofluorescente, con bordes claramente definidos.

La **FIG. 7B** muestra que, dentro de estas áreas, si se aumenta la ganancia (sensibilidad) de la cSLO, los vasos sanguíneos coroideos eran fácilmente evidentes. El cuadro (ampliado) identifica algunos de los vasos coroideos prominentes que viajan en direcciones totalmente diferenciadas de la vasculatura retiniana, que corre radialmente desde el nervio óptico (flechas). La fluorescencia DNIRA moteada ocultaba la vista de la coroides en la parte superior derecha de la imagen.

La **FIG. 8** muestra que el patrón reticular de FAF madura *in vivo* y en retina extirpada, y conserva el área adyacente al nervio óptico.

La **FIG. 8A** muestra que, a pesar de la significativa pérdida de retina externa en el mes 3 posterior a la administración de NaIO₃, la ONL se preservaba en el área inmediatamente adyacente a la cabeza del nervio óptico (ONH). Una magnificación más alta (parte inferior) confirmó que los núcleos de fotorreceptor se preservaban y que la retina externa no se plegaba. El diagnóstico por imágenes mediante FAF de un ojo representativo desde un Día 7 posterior a la inyección de NaIO₃ al animal confirmó que no se ve el patrón reticular. La línea de puntos fina (círculo interior) representa la ubicación de la ONH, mientras que la línea de puntos gruesa (círculo exterior) define la extensión aproximada de FAF normal, no reticular.

La **FIG. 8B** muestra una tinción de hematoxilina-eosina, que demostraba una clara deformación de la retina externa tras la administración de NaIO₃. Antes de la administración de NaIO₃ (BL), la ONL tenía el aspecto de una banda lineal oscura que se extendía desde la ONH hasta la periferia de la retina. A los 7 días, la retina externa se plegaba, pero la ONL permanecía totalmente intacta. Esto se ve en la figura ampliada de la columna derecha. Sin embargo, en el día 14 post-NaIO₃, la ONL mostraba áreas de pérdida inconfundibles, con la retina interna yaciendo directamente contra la membrana de Bruch (BM), la membrana basal especializada del EPR. Esto se ve en la figura ampliada (flecha negra).

La **FIG. 8C** muestra una microscopía confocal a lo largo de la ONL visualizada con la tinción nuclear TO-PRO-3 (tinción de ácido nucleico a base de monómero de carbocianina que solo tiene fluorescencia en el rojo lejano, Invitrogen). En el punto de referencia, esta capa era plana, sin características distinguibles. A medida que aumentaba el tiempo tras la administración de NaIO₃, la ONL se alteraba cada vez más. Se identificaron ranuras lineales, formas curvilíneas, anillos concéntricos y pequeños óvalos o círculos aislados en los días 3, 6 y 14.

La **FIG. 9** muestra que las células Iba1⁺ contribuyen al patrón de FAF reticular en ausencia de EPR en etapas tempranas y tardías de la enfermedad.

La **FIG. 9A** muestra una magnificación inferior (fila superior) y superior (fila inferior), tanto de diagnósticos por imagen *in vivo* como *ex vivo*, que muestran la comparación entre el patrón reticular visto en FAF e IHC en etapas tempranas y tardías de progresión de la enfermedad. El patrón de FAF identificado *in vivo* se repite mediante marcaje inmunohistoquímico fluorescente usando anticuerpos anti-Iba. En comparación con la preparación completa de retina, extirpada inmediatamente después del diagnóstico por imágenes mediante HRAI en el Día 7, se vio el mismo patrón reticular usando anticuerpos contra Iba-1, un marcador de microglía y macrófagos (parte superior). La tinción nuclear con TO-PRO-3 mostró células densamente empaquetadas de la capa nuclear externa (la capa de fotorreceptores) que parecen formar, en dos dimensiones, patrones curvilíneos, ovales o lobulares. La fusión de las dos confirmó que la tinción con Iba-1⁺ se encuentra entrelazada entre la tinción nuclear. La ampliación del patrón reticular en etapa tardía confirmó que las células Iba-1⁺ permanecían en las ranuras situadas entre los núcleos de

fotorreceptor plegados (parte inferior).

La **FIG. 9B** muestra que la señal de FAF se puede detectar incluso en ausencia de EPR. Izquierda: la copa ocular posterior, teñida con EPR65 (verde), muestra pérdida de esta monocapa en la retina central y media (permanece un anillo de EPR periférico). Las imágenes restantes utilizaron dos marcadores del EPR diferentes (MiTF; factor de transcripción microftálmico) y la característica tinción nuclear doble, y confirman la pérdida de la capa de EPR en la

copa ocular media y central, en áreas que se ha visto que tienen un patrón complejo de autofluorescencia del fondo del ojo. Por el contrario, en la periferia de la copa ocular, el EPR permanece normal o casi normal. La **FIG. 9C** muestra una tinción nuclear que indica la desaparición de células del EPR en la parte central de una preparación completa de retina, tal y como evidencia la ausencia de núcleos dobles que denotan las células del EPR. El EPR era todavía visible en el tejido retiniano periférico. Esto es lo contrario de lo que sucedía en el control en el punto de referencia, donde las células del EPR estaban presentes tanto en el tejido retiniano central como en el periférico.

La **FIG. 10** muestra imágenes de microscopía confocal en serie a lo largo de la retina externa, que muestra una deformación tridimensional compleja con la correspondiente distribución de entrelazamiento de células Iba-1⁺ y células fagocíticas CD68⁺.

La **FIG. 10A** muestra cambios morfológicos de la retina externa seccionada ópticamente en cuatro capas que se extienden desde la capa plexiforme interna (IPL) hasta el espacio subretiniano. La ONL se divide en capas internas y externas. Rojo = Iba-1, Verde = CD68, Azul = núcleos. Se vio un aumento del número de células fagocíticas en las capas de la retina en el Día 4 posterior a la administración de NaIO₃ en comparación con el punto de referencia, en cuyo momento las células Iba-1 se encontraban principalmente en la retina interna. Esto fue en ausencia de controles negativos de anticuerpo para ambos marcadores celulares.

La **FIG. 10B** muestra que el día 14 tras la administración de NaIO₃, los patrones circulares y ovales eran evidentes en la ONL y tan internamente como en la OPL (identificada por la presencia de vasos sanguíneos). Este patrón era curvilíneo en la ONL interna y aún más en la ONL externa, donde la capa fuertemente plegada de núcleos es mucho más densa, con áreas más pequeñas de vacíos curvilíneos. En la ONL externa, había un acoplamiento significativo entre pliegues. Estos vacíos nucleares contenían células Iba-1⁺ y CD68⁺.

La **FIG. 10C** muestra una imagen ampliada de la ONL más externa o el espacio subretiniano expandido (que normalmente es un espacio hipotético) que muestra un patrón reticular de células Iba-1⁺ y CD68⁺ entrelazadas entre núcleos de fotorreceptor.

La **FIG. 11** muestra una reconstrucción tridimensional de una preparación completa de retina extirpada que confirmó que las células fagocíticas yacen en el interior de la capa de fotorreceptores deformada formando un patrón reticular.

La **FIG. 11A** muestra que se usaron series Z confocales a lo largo de la retina externa para generar una reconstrucción tridimensional de las células de la ONL y las células Iba1⁺. La tinción nuclear (rojo) de la capa de núcleos de fotorreceptor mostró que está plegada. La fusión con la tinción con Iba-1⁺ (verde) evidenció que las células inflamatorias yacen entre, o dentro de, los pliegues definidos por la deformación de la retina. La reconstrucción de células Iba-1 positivas por sí solas demostró el patrón reticular.

La **FIG. 11B** muestra la reconstrucción de series Z de segmentos de la pila total de imágenes de la retina externa 28 días después de la administración de NaIO₃ e ilustra la complejidad de los pliegues, que son más estrechos en sus picos (interno) y más anchos y más entrelazados en sus bases (medio, externo). Para comparar con las imágenes de secciones transversales, y para representar mejor la naturaleza 3D de estos hallazgos, se muestra también una perspectiva oblicua (paneles medios). La posición de los asteriscos en las imágenes frontales (izquierda) correspondía a la ubicación del asterisco en las imágenes oblicuas. Las ampliaciones digitales (derecha) mostraron una ranura entre la capa de fotorreceptores (roja), que es curvilínea y contigua en la retina externa, pero está rota en al menos tres óvalos más pequeños en la ONL interna. Las células Iba1⁺ (verde) se ubicaban en gran parte en el interior, es decir, en exteriores a, la capa de fotorreceptores. La reconstrucción de la retina externa del control mostró que no había ni células Iba-1 positivas ni deformación de la ONL (fila inferior). Se usó el software Bitplane (Imaris) para generar estas imágenes.

La **FIG. 12** muestra que la deformación progresiva de la retina externa inducida por NaIO₃ se identificó mediante diagnóstico por imágenes con OCT *in vivo* y se comparó con los hallazgos clínicos (abreviaturas: NFL = capa de fibra nerviosa; GCL = capa de célula ganglionar; IPL = capa plexiforme interna; INL = capa nuclear interna; OPL = capa plexiforme externa; ONL = capa nuclear externa; IS+OS capa de segmento interno y segmento externo; EPR = epitelio pigmentario retiniano; BM = membrana de Bruch).

La **FIG. 12A** muestra una OCT *in vivo* e ilustra que se observaron cambios tempranos, que se produjeron en la retina inferior, pero no en la retina superior, en los tres primeros días posteriores a la administración de NaIO₃. La imagen en el punto de referencia indicaba las capas de retina visibles en la OCT. La imagen frontal de la retina en el día 3 ilustraba la posición de dos secciones ópticas, mostrando las porciones superior e inferior. La porción superior permanecía sin cambios con respecto al punto de referencia. Por el contrario, la inferior mostraba pequeñas ondulaciones de los segmentos interno y externo del fotorreceptor, así como pérdida de la fina capa de EPR.

La **FIG. 12B** muestra que en el Día 14 tras la administración de NaIO₃, la retina externa mostraba cambios marcados, incluyendo la formación de múltiples pliegues curvados, triángulos con la base hacia abajo y puntas ocasionales de señal brillante que yacían en el exterior (inferior) de la capa nuclear externa oscura.

La **FIG. 12C** muestra un triángulo con la base hacia abajo bien formado indicado en una imagen de la retina de roedor tomada el día 14.

La **FIG. 12D** muestra una imagen OCT de un paciente con pseudodrusas reticulares que muestra un triángulo con la base hacia abajo similar al visto en el modelo de roedor.

La **FIG. 13** muestra que los cambios subretinianos contribuían a las complejas estructuras 3D en los ejes Z e Y *in vivo*.

La **FIG. 13A** muestra imágenes OCT consecutivas y adyacentes que confirman que los cambios subretinianos contribuyen a las complejas estructuras 3D en el eje Y. Las cúpulas o formas piramidales subretinianas pequeñas son abundantes y, tal y como se muestra en el centro, también tomaban una forma similar a una «Y» al revés o «espoleta». En comparación con la reconstrucción volumétrica de imágenes en serie, esta imagen coincide con las secciones ópticas a lo largo de una estructura que parece circular cuando se ve de frente. Las imágenes que muestran la posición de las secciones de OCT en serie a lo largo de la estructura circular corresponden a las de las secciones transversales ópticas adyacentes. Las dos señales subretinianas principales de estas secciones transversales (flechas) se ven próximas en las extremidades superior e inferior del círculo y muy alejadas en el centro. Se proporcionan las distancias entre puntas. La evaluación de las estructuras situadas inmediatamente a la izquierda del círculo muestra una contribución de estructuras subretinianas similar a las estructuras con forma de bucle más pequeñas.

La **FIG. 13B** muestra reconstrucciones volumétricas de pilas de segmentos de secciones Z en serie a lo largo de la ONL interna, media y externa, que confirman el diferente aspecto frontal de la señal bajo la retina externa deformada. Secciones OCT a lo largo del mismo plano de tejido. (Fila superior) Imágenes reconstruidas volumétricamente formadas en los tres planos unidas por las líneas verdes paralelas mostradas en la fila superior. Tal reconstrucción de segmentos a lo largo de la ONL interna, media y externa, demuestra tres patrones totalmente diferenciados. (C. Fila inferior) Conjunto regular de manchas puntuadas en la ONL interna. (C. inferior izquierda) Patrón más curvilíneo en la ONL media. (C. Media) ONL más exterior, en gran parte en el interior del espacio subretiniano expandido, muestra complejas estructuras curvilíneas, con bucles, con un acoplamiento significativo entre ellas. Estas imágenes se correlacionan con los hallazgos de microscopía confocal reconstruidos en 3D (C. Inferior derecha).

La **FIG. 14** muestra que el gadolinio, que reduce los monocitos circulantes y los macrófagos residentes, altera el patrón de FAF de daño a la retina externa inducido por NaIO_3 .

La **FIG. 14A** muestra cómo, en comparación con la lesión si tratar (panel inferior), la lesión tratada con GAD tiene bordes menos delimitados en el Día 3 (superior, izquierda) y patrones de FAF mucho menos delimitados en la isla representativa de daño en el Día (superior, derecha).

La **FIG. 14B** muestra cómo la reducción de macrófagos lleva a áreas de daño más pequeñas. Izquierda: Imagen de FAF que muestra una media luna pequeña de patrón reticular 7 días después de la administración de NaIO_3 y la reducción simultánea de macrófagos por el GAD. Derecha: Con respecto a la retina completa extirpada, el área de daño es claramente más pequeña que la que se ve habitualmente.

La **FIG. 15** muestra ilustraciones interpretativas, sin querer ceñirnos a la teoría, de cómo los hallazgos de tejido determinados histológicamente pueden justificar el diagnóstico por imágenes *in vivo* posterior a la pérdida de EPR inducida por NaIO_3 .

La **FIG. 15A** muestra imágenes clínicas de un paciente con DMAE temprana que muestra pseudodrusas reticulares y lesiones denominadas «diana» en el canal NIR (parte superior). Inmediatamente debajo, hay dos superposiciones esquemáticas que muestran las manchas hipofluorescentes (las habitualmente definidas como depósitos drusenoides), primero en negro para destacarlas y, a continuación, con un fondo brillante para destacar la señal brillante implicada. Las dos imágenes de la parte inferior destacan múltiples lesiones diana pequeñas de RPD (en el interior de los círculos), mientras que la más esquemática de la parte inferior ilustra la presencia de un posible halo y una lesión diana formada por pliegues concéntricos de tejido.

La **FIG. 15B** muestra representaciones esquemáticas que sugieren una relación directa entre la histología de la ONL de la preparación completa tridimensional y las imágenes clínicas de FAF frontales bidimensionales. En el día 14 después de la administración de NaIO_3 , la retina externa muestra complejos pliegues de la ONL media (mostrados con una magnificación relativamente baja [original 40x] y ampliados digitalmente). La magnificación digital muestra anillos concéntricos de pliegues de tejido. Esta misma área ilustrada en blanco y negro mostró cómo esto podría tener aspecto de una región circular u oval con un vacío central en la FAF. La representación en blanco y negro invertida (es decir, una imagen «negativa») mostró que esta disposición de la distorsión de la ONL parecería tener una diana brillante central.

La **FIG. 15C** muestra que el diagnóstico por imágenes mediante OCT de la retina de rata 14 días después de la administración de NaIO_3 muestra claramente «puntas» brillantes a lo largo de la retina externa. Estas se describen clínicamente. Secciones histológicas similares tomadas a lo largo de la retina externa demuestran pliegues de la ONL con células inflamatorias subyacentes en el espacio subretiniano ampliado que forman estrechas columnas de células. Para poder comparar con las imágenes *in vivo*, estas se representan en blanco y negro. En la imagen en blanco y negro invertida (es decir, una imagen pseudonegativa que coincide con las imágenes de OCT), se ve que la ONL desaparece mientras que las densidades subretinianas tienen un aspecto brillante.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de una modalidad de detección y/o medición y/o

evaluación de una enfermedad ocular que causa ceguera en un sujeto y/o un animal y en el uso de este método en el descubrimiento y/o la evaluación de compuestos candidatos para tratamientos de las enfermedades oculares que causan ceguera mejorados. Concretamente, entre otras cosas, la presente descripción contempla un método analítico titulado análisis retardado en el infrarrojo cercano (DNIRA) y el uso de este método en la generación de modelos para una enfermedad ocular que causa ceguera tal como, por ejemplo, DMAE y/o RPD. Además, la presente invención se refiere a métodos de diagnóstico de formas específicas de una enfermedad ocular que causa ceguera, tales como, por ejemplo, DMAE y/o RPD y métodos de tratamiento de la DMAE y/o RPD.

En un aspecto, se desvela un método para identificar si un compuesto candidato es útil para el tratamiento de una enfermedad ocular que causa ceguera, que comprende (a) la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de ensayo a un animal cuyo ojo comprende (i) un compuesto fluorescente en una cantidad efectiva para indicar la presencia de una enfermedad ocular que causa ceguera en el animal y (ii) una toxina en una cantidad efectiva para inducir atrofia del tejido ocular; (b) la exposición del ojo a luz de una longitud de onda e intensidad efectivas para provocar que el compuesto fluorescente exhiba fluorescencia; (c) la comparación del patrón de fluorescencia del ojo con un patrón de fluorescencia del ojo de un animal que comprende el compuesto fluorescente y la toxina pero no el compuesto de ensayo; y (d) la selección del compuesto de ensayo como un compuesto candidato si el resultado de la comparación de la etapa (c) indica que el compuesto de ensayo es útil para el tratamiento de una enfermedad ocular que causa ceguera.

La enfermedad ocular que causa ceguera puede ser DMAE o RPD.

El animal puede ser un ratón, una rata o un pez cebra.

El compuesto fluorescente puede absorber luz a una longitud de onda de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 900 nm y/o emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 750 nm a aproximadamente 950 nm. El compuesto fluorescente puede ser ICG. La fluorescencia se puede producir en células del EPR.

La toxina puede ser yodato sódico. La atrofia puede comprender necrosis de las células del EPR. La necrosis se puede presentar en forma de parches.

La comparación se puede producir al menos aproximadamente 24 horas, o al menos aproximadamente 7 días, o al menos aproximadamente 30 días, o al menos aproximadamente 60 días, o al menos aproximadamente 90 días después de la administración del compuesto de ensayo.

La exposición del ojo a la luz puede comprender la realización de cSLO, FAF, DNIRA u OCT. La exposición del ojo a la luz puede comprender luz blanca, luz azul, luz anérita, el infrarrojo cercano o el infrarrojo.

La presencia de una enfermedad ocular que causa ceguera se puede manifestar por patrones de FAF con parches de daño o pérdida de EPR o pérdida de retina externa. La presencia de una enfermedad ocular que causa ceguera se puede manifestar por patrones de FAF que se producen en el interior de, o adyacentes a, o cerca de, o lejos de, o en ausencia de parches de daño o pérdida de EPR o pérdida de retina externa. Los patrones pueden ser uno o más de entre lesiones curvilíneas, acordonadas, reticulares, ovales, circulares, festoneadas, halos y lesiones similares a las diana. La presencia de una enfermedad ocular que causa ceguera se puede manifestar por patrones de FAF en el interior de un borde de parches de daño o pérdida de EPR o pérdida de retina externa. Los patrones pueden ser uno o más de entre lesiones curvilíneas, acordonadas, reticulares, ovales, circulares, festoneadas, halos y lesiones similares a las diana. La presencia de una enfermedad ocular que causa ceguera se puede manifestar por patrones de FAF que se producen lejos de, o en ausencia de, parches de daño o pérdida de EPR o pérdida de retina externa. Los patrones pueden ser uno o más de entre lesiones curvilíneas, acordonadas, reticulares, ovales, circulares, festoneadas, halos y lesiones similares a las diana.

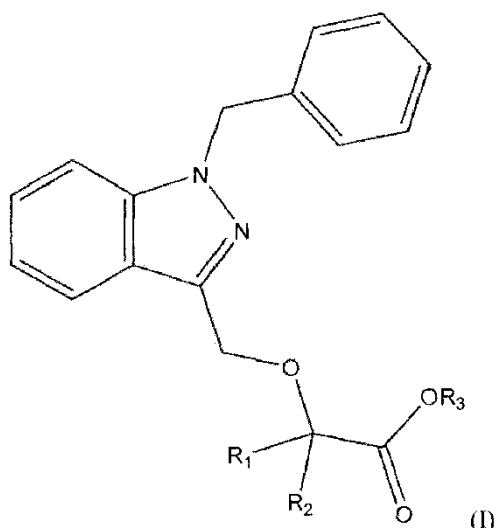
La presencia de una enfermedad ocular que causa ceguera se puede manifestar por patrones transversales o patrones transversos. Los patrones que se pueden observar con OCT. pueden ser los patrones pueden ser EPR y/o pérdidas o montículos de retina externa, triángulos, picos o puntas encontrados en el espacio subretiniano. pueden ser los métodos pueden además comprender la etapa de observación del ojo antes de la administración del compuesto de ensayo. Puede ser su observación puede establecer una o más características del ojo previas a la administración.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la administración del compuesto fluorescente antes de la administración del compuesto de ensayo. Los métodos descritos en el presente documento podrían no comprender la administración de (i) una cantidad adicional de un compuesto fluorescente al animal o (ii) un segundo compuesto fluorescente al animal. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la administración de la toxina antes de la administración del compuesto de ensayo y/o la administración de la toxina antes de la administración del compuesto fluorescente.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la administración de (i) una cantidad adicional de la toxina al animal o (ii) una segunda toxina al animal. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la administración de (i) una cantidad adicional de la toxina al animal, (ii) una segunda toxina al animal, o (iii) un compuesto que se cree que influye en el mecanismo de acción de la toxina. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además la observación de una reducción de la velocidad de formación, crecimiento o expansión de parches de atrofia de tejido ocular o parches de pérdida de tejido.

El compuesto candidato puede ser útil para el tratamiento, la prevención o la reducción de la velocidad de patogénesis de una enfermedad ocular que causa ceguera. Se puede identificar una pluralidad de compuestos candidatos. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además la comparación de la utilidad de la pluralidad de compuestos candidatos en el tratamiento de una enfermedad ocular que causa ceguera y la selección de un compuesto principal en base a la comparación.

En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto para uso en el tratamiento o la prevención de la DMAE seca para administración a un sujeto con necesidad del mismo en una cantidad efectiva, siendo el compuesto de **Fórmula I**:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_1 y R_2 son independientemente H o un alquilo C_1 - C_6 y R_3 es H o un alquilo C_1 - C_6 . En una forma de realización, el compuesto de **Fórmula I** es bindarit.

También se desvela un método de tratamiento o prevención de la DMAE seca, que comprende la administración a un sujeto con necesidad de la misma de una cantidad efectiva de metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas formas de realización, se puede administrar un agente terapéutico adicional. En varias formas de realización, el agente terapéutico adicional es uno o más de entre un agente de factor de crecimiento endotelial antivasculador (VEGF), un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), un agonista o agonista parcial del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR)-gamma o un agonista combinado del PPAR-alfa/gamma, un inhibidor de renina, un esteroide y un agente que modula la autofagia.

En algunas formas de realización, la DMAE seca es identificable por la presencia de áreas de FAF hiperfluorescentes en un ojo del sujeto y/o por la presencia de una o más áreas de FAF anómalamente fluorescentes en un ojo del sujeto y/o por cambios en uno o más de entre los diagnósticos por imágenes del fondo del ojo en el espectro azul, los diagnósticos por imágenes del fondo del ojo con luz blanca, los diagnósticos por imágenes del fondo del ojo con luz anetrtra y la OCT en un ojo del sujeto y/o por un aumento (incluyendo un aumento transitorio) de la permeabilidad a través de la barrera epitelial del sujeto entre una coroides y una retina con respecto a un estado sano y/o por deformación de la retina externa y/o deformación de la vasculatura de la retina media a lo largo de la barrera epitelial del sujeto entre una coroides y una retina con respecto a un estado sano y/o por la presencia de células inmunitarias fagocíticas a lo largo del EPR del sujeto con respecto a un estado sano.

En algunas formas de realización, la DMAE seca es DMAE en etapa temprana o DMAE seca atrófica.

En otras formas de realización, el sujeto es un humano. En otras formas de realización más, la administración se efectúa oralmente, o intravascularmente, o intraocularmente, o periocularmente, o a la superficie ocular.

5 También se desvela un método de tratamiento de la enfermedad RPD, que comprende la administración a un sujeto con necesidad de la misma de una cantidad efectiva de un compuesto de **Fórmula I** (tal y como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_1 y R_2 son independientemente H o un alquilo C_1-C_6 y R_3 es H o un alquilo C_1-C_6 . En una forma de realización, el compuesto de **Fórmula I** es bindarit.

10 También se desvela un método de tratamiento de la enfermedad RPD, que comprende la administración a un sujeto con necesidad de la misma de una cantidad efectiva de metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la reducción de la cantidad de pseudodrusas en el sujeto y/o la reducción de la cantidad de pseudodrusas en el área foveal, el área perifoveal, el área yuxtafoveal o el área extrafoveal del ojo del sujeto. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la reducción de las velocidades de progresión a enfermedad tardía, donde la enfermedad tardía es neovascularización coroidea o atrofia geográfica. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la reducción de las velocidades de expansión de la atrofia geográfica.

20 Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la administración de un agente terapéutico adicional. El agente terapéutico adicional puede ser uno o más de entre un agente anti-VEGF, un inhibidor de ACE, un agonista o agonista parcial del PPAR gamma o un agonista combinado de PPAR alfa/gamma, un inhibidor de renina, un esteroide y un agente que modula la autofagia.

25 La enfermedad RPD puede ser identificable por la presencia de una o más áreas de patrones inconfundibles en el diagnóstico por imágenes de la retina del ojo de un sujeto, donde el diagnóstico por imágenes de la retina es uno o más de entre luz blanca, luz anérita, luz azul, FAF, infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo (IR), angiografía y DNIRA y/o la presencia de una o más áreas de FAF anómalamente fluorescentes en el ojo de un sujeto y/o un aumento (incluyendo un aumento transitorio) de la permeabilidad a través de la membrana epitelial del sujeto entre una coroides y una retina con respecto a un estado sano y/o una presencia de células inmunitarias fagocíticas a lo largo del EPR del sujeto con respecto a un estado sano.

30 El sujeto puede ser un humano. La administración se puede efectuar oralmente, o intravascularmente, o intraocularmente, o periocularmente, o a la superficie ocular.

35 También se desvela el uso de compuestos de **Fórmula I**, metotrexato o sus sales farmacéuticamente aceptables, por sí solos o en combinación con un terapéutico adicional, en la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento o la prevención de una o más enfermedades oculares que causan ceguera.

40 También se desvela un método para identificar a un sujeto que padece una enfermedad ocular que causa ceguera y que es más probable que responda al tratamiento con un agente que comprende la determinación de si el ojo del sujeto tiene, o ha tenido anteriormente, un aumento (incluyendo un aumento transitorio) de permeabilidad a través de la barrera epitelial entre una coroides y una retina del ojo con respecto a un estado sano; donde el aumento de permeabilidad indica que es más probable que el sujeto responda al tratamiento con el agente; y donde el agente se selecciona de entre metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y/o un compuesto de **Fórmula I** (tal y como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_1 y R_2 son independientemente H o un alquilo C_1-C_6 y R_3 es H o un alquilo C_1-C_6 .

45 El compuesto de **Fórmula I** puede ser bindarit. La enfermedad ocular que causa ceguera puede ser una o más de entre DMAE seca y RPD.

50 También se desvela un método para identificar a un sujeto que padece una enfermedad ocular que causa ceguera y que es más probable que responda al tratamiento con un agente que comprende la determinación de si el ojo del sujeto tiene una presencia de células inmunitarias fagocíticas (procedentes, opcionalmente, del interior de la retina o del EPR) a lo largo del EPR con respecto a un estado sano; donde la presencia de células inmunitarias fagocíticas indica que es más probable que el sujeto responda al tratamiento con el agente; y donde el agente se selecciona de entre metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y/o un compuesto de **Fórmula I** (tal y como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_1 y R_2 son independientemente H o un alquilo C_1-C_6 y R_3 es H o un alquilo C_1-C_6 .

55 El compuesto de **Fórmula I** puede ser bindarit. La enfermedad ocular que causa ceguera puede ser una o más de entre DMAE seca y RPD. La presencia de células inmunitarias fagocíticas se puede medir mediante DNIRA.

También se describe un método para determinar si una enfermedad ocular que causa ceguera en un sujeto es sensible a tratamiento con un agente que inhibe la función de las células inmunitarias de un sujeto, que comprende la detección de una presencia, la detección de una ausencia o la medición de una cantidad de células inmunitarias en el ojo del sujeto, donde el ojo del sujeto exhibe fluorescencia en respuesta a luz de una longitud de onda de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 900 nm. En algunas formas de realización, la luz tiene una longitud de onda de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 900 nm.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un compuesto fluorescente, donde la detección o medición se produce al menos un día después de la administración del compuesto fluorescente. La detección o medición se pueden producir al menos un día después de la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un compuesto fluorescente.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además la etapa de detección o medición mediante FAF en el ojo del sujeto. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además la etapa de correlación de un patrón de FAF con la presencia, ausencia o cantidad de células inmunitarias en el ojo del sujeto.

La enfermedad ocular que causa ceguera puede ser DMAE, retinopatía serosa central (CSR) o RPD. El sujeto puede ser un humano.

El ojo del sujeto puede exhibir fluorescencia con luz de longitud de onda de aproximadamente 750 nm a aproximadamente 950 nm. El compuesto fluorescente puede ser ICG.

La detección o medición se puede producir aproximadamente un día, o aproximadamente siete días, o aproximadamente treinta días después de la administración del compuesto fluorescente.

Los métodos descritos en el presente documento podrían no comprender la administración adicional de (a) una cantidad adicional del compuesto fluorescente o (b) un segundo compuesto fluorescente.

La detección o medición puede comprender la realización de cSLO, FAF, DNIRA u OCT.

Las células inmunitarias pueden ser células del sistema inmunitario innato del sujeto y/o macrófagos y/o células de la microglía.

Definiciones

Las siguientes definiciones se usan en relación con la invención descrita en el presente documento. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden normalmente los expertos en la materia a los que se dirige la presente invención.

Una «cantidad efectiva», cuando se usa en relación con un compuesto de ensayo y/o compuesto candidato, es una cantidad que es efectiva para proporcionar un tratamiento, una prevención, o una reducción de la velocidad de patogénesis de una enfermedad ocular que causa ceguera tal como, por ejemplo, DMAE y/o RPD mensurables.

Una «cantidad efectiva», cuando se usa en relación con un compuesto fluorescente, es una cantidad que permite su detección óptica.

Una «cantidad efectiva», cuando se usa en relación con un compuesto de **Formula I**, metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, es una cantidad que es efectiva para el tratamiento o la prevención de DMAE seca y/o RPD (p. ej., que proporciona un tratamiento, una prevención, o una reducción de la velocidad de patogénesis mensurables).

Una «cantidad efectiva», cuando se usa en relación con otro agente terapéutico, es una cantidad que es efectiva para el tratamiento o la prevención de DMAE seca y/o RPD (p. ej., que proporciona un tratamiento, una prevención, o una reducción de la velocidad de patogénesis mensurables) por sí sola o en combinación con un compuesto de **Fórmula I**, metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. «En combinación con» incluye la administración en la misma composición y a través de composiciones individuales; en el último caso, el otro agente terapéutico es efectivo para el tratamiento o la prevención de una afección durante un tiempo en el que el agente un compuesto de **Fórmula I**, metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, ejerce su efecto profiláctico o terapéutico, o viceversa.

Una «cantidad efectiva», cuando se usa en relación con una toxina, por ejemplo, yodato sódico, es una cantidad que es efectiva para inducir atrofia del tejido ocular, tal y como se ha descrito en el presente documento, mensurable.

Un agente es «útil para el tratamiento de una enfermedad que causa ceguera» si el agente proporciona un tratamiento, una prevención, o una reducción de la velocidad de patogénesis de una enfermedad ocular que causa ceguera mensurables.

El término «enfermedad ocular que causa ceguera» se refiere a una de varias enfermedades oftálmicas e incluye las enfermedades del ojo y de los anexos oculares. El término «enfermedad que causa ceguera» incluye, por ejemplo, trastornos descritos en el presente documento (por ejemplo, a modo de ejemplo no limitante, DMAE y RPD).

El término «neovascularización» se refiere a la formación de nuevos vasos sanguíneos en tejido anómalo o en posiciones anómalas.

El término «VEGF» se refiere a un factor de crecimiento endotelial vascular que induce angiogénesis o un proceso angiogénico, incluyendo, pero sin limitarse a, aumento de permeabilidad. Tal y como se usa en el presente documento, el término «VEGF» incluye los diversos subtipos de VEGF (también conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF) y VEGF-A) que surgen de, p. ej., el corte y empalme alternativo del gen VEGF-A/VPF, incluyendo VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ y VEGF₁₈₉. Además, tal y como se usa en el presente documento, el término «VEGF» incluye factores angiogénicos relacionados con el VEGF, tales como el PIGF (factor de crecimiento placentario), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E, que actúan a través de un receptor del VEGF (es decir, VEGFR) análogo para inducir angiogénesis o un proceso angiogénico. El término «VEGF» incluye cualquier miembro de la clase de los factores del crecimiento que se unen a un receptor del VEGF tal como el VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), o VEGFR-3 (FLT-4). El término «VEGF» se puede usar para referirse a un polipéptido de «VEGF» o a un gen o ácido nucleico que codifica «VEGF».

El término «agente anti-VEGF» se refiere a un agente que reduce o inhibe, parcial o totalmente, la actividad o producción de un VEGF. Un agente anti-VEGF puede reducir o inhibir, directamente o indirectamente, la actividad o producción de un VEGF específico tal como el VEGF₁₆₅. Asimismo, «agentes anti-VEGF» incluye agentes que actúan sobre un ligando de VEGF o su sobre su receptor análogo para reducir o inhibir una señal del receptor asociado al VEGF. Los ejemplos no limitantes de «agentes anti-VEGF» incluyen moléculas antisentido, ribozimas o ARN interferente que se dirige a un ácido nucleico de VEGF; aptámeros anti-VEGF, anticuerpos anti-VEGF contra el mismo VEGF o su receptor, o señuelos del receptor soluble de VEGF que evitan la unión de un VEGF a su receptor análogo; moléculas antisentido, ribozimas o ARN interferente que se dirige a un ácido nucleico del receptor análogo del VEGF (VEGFR); aptámeros anti-VEGFR o anticuerpos anti-VEGFR que se unen a un receptor análogo del VEGF; e inhibidores de tirosina quinasa VEGFR.

El término «agente anti-RAS» o «agente anti-sistema renina-angiotensina» se refiere a un agente que reduce o inhibe, parcial o totalmente, la actividad o producción de una molécula del sistema renina-angiotensina (RAS). Los ejemplos no limitantes de moléculas «anti-RAS» o «anti-sistema renina-angiotensina» son uno o más de entre un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), un bloqueador del receptor de angiotensina y un inhibidor de renina.

El término «esteroide» se refiere a compuestos que pertenecen, o están relacionados con, las siguientes familias de compuestos ilustrativas: corticosteroides, mineralcosteroides y esteroides sexuales (incluyendo, por ejemplo, moléculas potencialmente androgénicas o estrogénicas o antiandrogénicas y antiestrogénicas). Incluidos entre estos están, por ejemplo, la prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, fluocinolona, aldosterona, espironolactona, el danazol (también conocido como OPTINA) y otros.

Los términos «agente receptor activado por proliferador de peroxisomas-gamma», «agente PPAR-γ», «agente PPARG» o «agente PPAR-gamma» se refieren a agentes que actúan directamente o indirectamente sobre el receptor activado por proliferador de peroxisomas. Este agente también puede influir en la actividad del PPAR-alfa, «PPARA».

El término «un agente que modula la autofagia» se refiere a un modulador de la supervivencia celular, muerte celular, supervivencia, autofagia, proliferación, regeneración y similares.

El término «proteína quimiotáctica de monocitos-1» o «MCP-1» se refiere a un miembro de la familia del gen inducible pequeño (SIG) que juega un papel en el reclutamiento de monocitos en sitios de lesión e infección.

El término «alquilo», tal y como se usa en el presente documento y a menos que se defina lo contrario, se refiere a un grupo saturado lineal o ramificado derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un alcano. Los grupos alquilo de cadena lineal representativos incluyen, pero no se limitan a, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo y n-hexilo. Los grupos alquilo ramificados representativos incluyen, pero no se limitan a, isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, -neopentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo y 1,2-

dimetilpropilo.

Tal y como se usan en el presente documento, «un/una» y «el/la» pueden significar uno o más de uno. Además, el término «aproximadamente», cuando se usa en relación con una indicación numérica mencionada, significa la indicación numérica mencionada más/menos hasta un 10 % de esa indicación numérica mencionada. Por ejemplo, la expresión «aproximadamente 50» cubre el intervalo de 45 a 55.

Tal y como se contemplan en el presente documento, todos los porcentajes de composiciones son en peso de la composición total, a menos que se especifique lo contrario. Tal y como se usa en el presente documento, la palabra «incluir» y todas sus variantes, no pretende ser limitante, de tal forma que la mención de elementos en una lista no excluye otros elementos similares que también pueden ser útiles en los materiales, las composiciones, los dispositivos y los métodos de esta tecnología. De forma similar, el término «puede» y sus variantes no pretende ser limitante, de tal forma que la mención a que una forma de realización puede comprender ciertos elementos o ciertas características no excluye otras formas de realización de la presente tecnología que no contienen esos elementos o esas características.

Aunque el término abierto «comprende», como sinónimo de términos tales como incluye, contiene, o tiene, se usa en el presente documento para describir y reivindicar la invención, la presente invención, o las formas de realización de la misma, pueden describirse alternativamente usando términos alternativos tales como «consiste en» o «consiste esencialmente en».

DNIRA

En varias formas de realización, la presente invención implica el diagnóstico por imágenes ópticas usando varias técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, cSLO, FAF, angiografía y OCT, incluyendo reconstrucciones tridimensionales de las mismas. En varias formas de realización de la invención, la exposición de un ojo a la luz comprende la realización de cSLO, FAF, angiografía u OCT. En varias formas de realización, el diagnóstico por imágenes es DNIRA. En varias formas de realización, se pueden usar combinaciones de cualquiera de las técnicas anteriores.

Para el DNIRA, cuando se administra a dosis no tóxicas un compuesto adecuado para su detección por fluorescencia que incluye un colorante que emite en el infrarrojo cercano (NIR), tal como ICG, este puede marcar el EPR y, por lo tanto, hacerlo visible cuando se visualiza con filtros de excitación/emisión de ICG en los días o las semanas posteriores. Es importante que esta visualización en los días y las semanas posteriores pueda hacerse sin readministración de colorante. Por consiguiente, en algunos aspectos, un componente principal de la técnica DNIRA es su programación. Esto es totalmente distinto del uso actual de ICG u otros colorantes angiográficos que se visualizan inmediatamente después de la inyección, durante la fase de tránsito, o en los siguientes minutos a horas posteriores a la inyección, para determinar la localización intravascular del colorante y su extravasación inmediata.

En una forma de realización, el DNIRA puede implicar la administración de un compuesto adecuado para su detección por fluorescencia, a modo de ejemplo no limitante, ICG (y, opcionalmente, por angiografía) aproximadamente uno o más días antes de la administración de una toxina u otro agente que provoque expansión de la atrofia geográfica (p. ej., NaIO_3) seguida de, aproximadamente tras 1 o más días (o aproximadamente una semana, o aproximadamente un mes, o aproximadamente tres meses), una cantidad adicional de NaIO_3 u otro agente que provoque expansión de la atrofia geográfica. Por ejemplo, la otra amenaza que provoca expansión de la atrofia geográfica (p. ej., como una administración inicial, o segunda, o tercera, o cuarta) puede ser un modulador de la supervivencia celular, muerte celular, supervivencia, autofagia, proliferación, regeneración y similares.

La expansión de la atrofia geográfica es un resultado primario homologado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) para el diseño de ensayos clínicos y, por consiguiente, esta invención posibilita la observación de atrofia geográfica, en concreto, expansión de la atrofia geográfica, en un modelo animal, permitiendo así una correlación entre los modelos preclínicos de enfermedad y el diseño del ensayo clínico. La incapacidad de identificar con claridad la atrofia geográfica, o la expansión de la atrofia geográfica, en un ojo de un animal antes de la presente invención ha impedido la correlación directa entre los estudios preclínicos y la observación clínica.

En algunas formas de realización, el compuesto adecuado para su detección por fluorescencia es adecuado para el diagnóstico por imágenes con varias longitudes de onda de fluorescencia. En algunas formas de realización, estas longitudes de onda varían desde la luz visible hasta el infrarrojo, p. ej., desde 390 nm hasta 1 mm, incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz blanca y el infrarrojo cercano. En algunas formas de realización, el colorante es un colorante que emite en el infrarrojo cercano. En algunas formas de realización, el colorante es ICG.

En algunas formas de realización, el DNIRA se realiza (y/o se observa fluorescencia retardada en el infrarrojo

cercano (DNIRF)) aproximadamente 1 día, o aproximadamente 2 días, o aproximadamente 3 días, o aproximadamente 4 días, o aproximadamente 5 días, o aproximadamente 6 días, o aproximadamente 7 días, o aproximadamente 10 días, o aproximadamente 14 días, o aproximadamente 21 días después de la administración. En algunas formas de realización, el DNIRA se realiza aproximadamente 1 día después de la administración, o al menos 2 días, o al menos 3 días, o al menos 4 días, o al menos 5 días, o al menos 6 días, o al menos 7 días, o al menos 10 días, o al menos 14 días, o al menos 21 días después de la administración. En otras formas de realización, el DNIRA se realiza al menos aproximadamente 24 horas, o al menos aproximadamente 7 días, o al menos aproximadamente 30 días, o al menos aproximadamente 60 días, o al menos aproximadamente 90 días después de la administración. En otras formas de realización, el DNIRA se realiza al menos aproximadamente 2 meses, o aproximadamente 3 meses, o aproximadamente 4 meses, o aproximadamente 5 meses, o como máximo aproximadamente 6 meses después de la administración. En algunas formas de realización, el DNIRA no se realiza durante la etapa de tránsito (es decir, el primer paso de colorante a medida que fluye a través de los vasos sanguíneos oculares y al interior del tejido ocular) o minutos después.

En algunas formas de realización, la visualización se efectúa usando cSLO. En algunas formas de realización, la visualización se efectúa usando luz blanca y filtros apropiados. En algunas formas de realización, los filtros de excitación/emisión de ICG son filtros de 795 nm (excitación)/810 nm (emisión). En algunas formas de realización, los filtros de excitación/emisión de ICG son filtros de aproximadamente 795 nm (excitación)/aproximadamente 810 nm (emisión).

El EPR es una monocapa epitelial crítica que cumple una función de «célula enfermera» para los fotorreceptores especializados del ojo, los conos y los bastones. Las enfermedades oculares que causan ceguera, tales como, por ejemplo, la DMAE y RPD, están, sin querer ceñirnos a la teoría, ligadas causalmente en parte a anomalías del EPR.

El DNIRA posibilita identificar con claridad la capa de EPR *in vivo* en un ojo de un animal. Además, la técnica líder usada para detectar el EPR en el ojo humano, FAF, no es efectiva o es poco efectiva, posiblemente debido a una escasez relativa de fluoróforos tales como la lipofusina. El diagnóstico por imágenes mediante FAF en el ojo humano se realiza usando el espectro azul de luz no coherente en presencia de filtros de estimulación/emisión, o luz azul coherente, y puede identificar áreas de ausencia de EPR (p. ej., señal hipofluorescente) o de EPR anómalo (p. ej., señal hiperfluorescente). La incapacidad de identificar con claridad el EPR en un ojo de un animal, en ausencia, ha impedido la correlación directa entre los estudios preclínicos y la observación clínica.

Por consiguiente, en varios aspectos de la presente invención, se proporcionan métodos para hacer visible la capa de EPR, tal como, por ejemplo, DNIRA, en un ojo de un animal para la investigación preclínica de enfermedades oculares que causan ceguera.

Además, tal y como se describe en el presente documento, el DNIRA, o variaciones del mismo, permiten la visualización de células inmunitarias fluorescentes en los ojos de un animal. En algunas formas de realización, el DNIRA puede, opcionalmente, no comprender la administración de toxina.

Además, tal y como se describe en el presente documento, el DNIRA, o variaciones del mismo, permiten la visualización de células inmunitarias fluorescentes en los ojos de un sujeto humano. En algunas formas de realización con un sujeto humano, el DNIRA puede no comprender la administración de toxina.

Enfermedades que causan ceguera

Una enfermedad que causa ceguera se refiere a una de varias enfermedades oftálmicas e incluye enfermedades del ojo y los anexos oculares.

Una enfermedad ocular que causa ceguera se puede evaluar y/o identificar usando DNIRA o una técnica conocida en la técnica. Las técnicas ilustrativas incluyen: cSLO, FAF, OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional y frontal), SD-OCT (con visualización de secciones transversales, tridimensional y frontal), angiografía u otras modalidades de diagnóstico por imágenes que incluyen otras longitudes de onda de fluorescencia. Estas longitudes de onda pueden variar desde el azul al infrarrojo, p. ej., de 390 nm a 1 mm, incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz blanca, la luz aneítrita, el infrarrojo cercano y el infrarrojo.

Una enfermedad ocular que causa ceguera se puede evaluar y/o identificar mediante patrones de FAF en parches de daño o pérdida de EPR o pérdida de retina externa. Los patrones pueden ser uno o más de entre lesiones curvilíneas, acordonadas, reticulares, ovales, circulares, festoneadas, halos y lesiones similares a las diana.

Una enfermedad ocular que causa ceguera se puede evaluar y/o identificar mediante patrones de FAF en un borde de parches de daño o pérdida de EPR o pérdida de retina externa. Los patrones pueden ser uno o más de entre lesiones curvilíneas, acordonadas, reticulares, ovales, circulares, festoneadas, halos y lesiones similares a las diana.

Una enfermedad ocular que causa ceguera se puede evaluar y/o identificar mediante patrones transversales o patrones transversos. Los patrones se pueden observar con OCT. Los patrones pueden ser pérdidas de EPR y/o retina externa o montículos, triángulos, picos o puntas encontrados en el espacio subretiniano.

Una enfermedad ocular que causa ceguera se puede evaluar y/o identificar por la presencia de áreas de FAF hiperfluorescentes en un ojo del sujeto y/o la presencia de una o más áreas de FAF anómalamente fluorescentes en un ojo del sujeto y/o por cambios en uno o más de los diagnósticos por imágenes del fondo del ojo en el espectro azul, los diagnósticos por imágenes del fondo del ojo con luz blanca, los diagnósticos por imágenes del fondo del ojo con luz aneritra y la OCT en un ojo del sujeto y/o por un aumento (p. ej., un aumento transitorio) de la permeabilidad a través de la barrera epitelial del sujeto entre una coroides y una retina con respecto a un estado sano y/o por una deformación de la retina externa y/o deformación de la vasculatura de la retina media a lo largo de la barrera epitelial del sujeto entre una coroides y una retina con respecto a un estado sano y/o por la presencia de células inmunitarias fagocíticas a lo largo del EPR del sujeto con respecto a un estado sano. Los cambios ilustrativos incluyen diferencias de un patrón de diagnóstico por imágenes en el mismo o diferentes sujetos y/o animales en dos momentos y/o condiciones experimentales o clínicas distintos. Por ejemplo, los cambios pueden abarcar cambios de los datos de diagnóstico por imágenes entre dos evaluaciones del mismo sujeto y/o animal y/o cambios de los datos de diagnóstico por imágenes entre un primer sujeto y/o animal y los datos de diagnóstico por imágenes de un segundo sujeto y/o animal.

Una enfermedad ocular que causa ceguera se puede evaluar y/o identificar por la presencia de una o más áreas de patrones totalmente distintos del diagnóstico por imágenes de la retina del ojo de un sujeto, donde el diagnóstico por imágenes de la retina es uno o más de entre luz blanca, luz aneritra, luz azul, FAF, infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo (IR), angiografía y DNIRA y/o por la presencia de una o más áreas de FAF anómalamente fluorescentes en el ojo de un sujeto y/o por un aumento (p. ej., un aumento transitorio) de la permeabilidad a través de la membrana epitelial del sujeto entre una coroides y una retina con respecto a un estado sano y/o por una presencia de células inmunitarias fagocíticas a lo largo del EPR del sujeto con respecto a un estado sano.

La enfermedad ocular que causa ceguera puede ser DMAE. La DMAE es la causa principal de ceguera en el mundo desarrollado. La DMAE se caracteriza por la acumulación de drusas, el sello distintivo de la enfermedad, mientras que la atrofia geográfica (GA) y la neovascularización coroidea (CNVM) son las complicaciones que causan ceguera de la enfermedad tardía no exudativa (denominada «seca» o atrófica) y exudativa (denominada «húmeda» o neovascular). Una terapia con anti-VEGF ha revolucionado el tratamiento de la DMAE húmeda, pero representa solo un 12-15 % de todos los casos de DMAE. Aunque la suplementación con vitaminas puede ralentizar las velocidades de progresión, no existe tratamiento para la DMAE seca.

La enfermedad ocular que causa ceguera puede ser DMAE temprana no exudativa o «seca». La DMAE temprana no exudativa o «seca» se puede caracterizar por la acumulación de drusas y características asociadas tales como cambios de pigmentación o desprendimiento del EPR. La DMAE tardía o avanzada se puede caracterizar por parches de atrofia del EPR y los fotorreceptores suprayacentes. Estos parches se visualizan clínicamente como «defectos ventana» y se conocen como áreas de «atrofia geográfica».

La enfermedad ocular que causa ceguera puede ser DMAE húmeda. La DMAE húmeda se caracteriza por el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos debajo de la retina o el EPR, que pueden sangrar o perder fluido, que derivan en una rápida y con frecuencia grave pérdida de visión central en la mayoría de los casos. Esta pérdida de visión central afecta adversamente a la vida diaria, dañando la capacidad de leer, conducir y reconocer rostros. En algunos casos, la degeneración macular progresa de la forma seca a la forma húmeda.

La enfermedad ocular que causa ceguera puede ser DMAE exudativa o húmeda. La enfermedad ocular que causa ceguera puede estar asociada a neovascularización coroidea (CNVM).

La DMAE se puede detectar o evaluar usando FAF, un método de diagnóstico por imágenes *in vivo* para el mapeo espacial (p. ej., bidimensional, frontal y similares) de fluoróforos endógenos. o presentes de forma natural o patológica, del fondo del ojo. Sin querer ceñirnos a la teoría, el diagnóstico por imágenes mediante FAF puede permitir la visualización del EPR *in vivo* y puede ayudar a comprender mejor sus alteraciones metabólicas en la patogénesis de trastornos coroideos y epitelopatías pigmentarias retinianas. La FAF se conoce bien en la técnica (véase, p. ej., Bellman y col. Br J Ophthalmol 2003 87: 1381-1386).

La DMAE y/o el daño o la pérdida de EPR también se pueden visualizar a otras longitudes de onda de la luz, incluyendo la luz blanca, la luz azul, el infrarrojo cercano y el infrarrojo, y pueden ser visibles como un «defecto ventana» a través del que se puede visualizar la coroides. La DMAE y/o el daño o la pérdida de EPR también se pueden visualizar mediante cSLO, FAF, OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal), SD-OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal)

u otras modalidades de diagnóstico por imágenes que incluyen otras longitudes de onda de fluorescencia (p. ej., longitudes de onda que varían del azul al infrarrojo, p. ej., de 390 nm a 1 mm), incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz blanca, la luz anérita, el infrarrojo cercano o el infrarrojo.

- 5 En la DMAE seca tardía, se pueden visualizar claramente las áreas de atrofia geográfica como áreas de FAF hipofluorescentes u oscuras. Estas pueden representar áreas donde se ha perdido EPR.

La DMAE se puede identificar por la presencia de áreas de FAF hiperfluorescentes en un ojo del sujeto. La DMAE seca se puede identificar por la presencia de áreas de FAF hiperfluorescentes en la DMAE seca temprana o tardía
10 en progreso. La FAF hiperfluorescente puede referirse a un aumento de fluorescencia que puede ser provocado por una visualización mejorada de una densidad normal de lipofusina o materiales similares a la lipofusina o por un aumento del contenido de lipofusina en los tejidos. La lipofusina comprende una mezcla de proteínas, con o sin lípido, cuyos componentes exhiben fluorescencia bajo iluminación con luz azul de longitudes de onda apropiadas. La fluorescencia similar a la lipofusina también se puede producir en este espectro y podría ser debida a moléculas
15 distintas de la lipofusina y sus constituyentes.

La fluorescencia similar a la lipofusina se puede producir en células del EPR y en células distintas de las células del EPR tales como, por ejemplo, células del sistema inmunitario (p. ej., células inmunitarias fagocíticas).

20 La DMAE también se puede identificar por la presencia de patrones anómalos de FAF en un ojo del sujeto. La FAF anómalamente fluorescente se puede referir a una desviación del patrón de fluorescencia FAF normal observado en el ojo de un sujeto. En la FAF normal, usando cSLO o cámaras de fondo de ojo modificadas, la cabeza del nervio óptico es oscura (negra) debido a la ausencia de EPR (y, por tanto, de lipofusina) y los vasos sanguíneos también son oscuros, porque bloquean la fluorescencia procedente de la monocapa de EPR subyacente. En el área macular
25 central, la señal de FAF se reduce por la absorción de luz azul por el pigmento luteínico. Estas características de la FAF con luz azul normal se pueden considerar cuando se evalúa la presencia de fluorescencia anómala.

La FAF hiperfluorescente asociada a DMAE y otras enfermedades que causan ceguera puede mostrar patrones espaciales bidimensionales que pueden ser complejos. En algunos estudios, estos patrones de FAF
30 hiperfluorescente se correlacionan con velocidades de progresión de la enfermedad de enfermedad temprana a tardía (tanto neovascular como atrófica). Estos patrones se entienden en la técnica (véase, p. ej., Schmitz-Valckenberg y col. Survey of Ophthalmology. 2009 Jan-Feb; 54(1):96-117; Bindewald y col. British Journal of Ophthalmology. 2005 Jul; 89(7):874-8; Holz y col. Am. J Ophthalmology. 2007 Mar; 143(3):463-72).

35 La DMAE seca puede ser DMAE en etapa temprana o DMAE seca atrófica.

La DMAE seca puede estar en su etapa tardía y se puede caracterizar por la presencia de áreas de FAF hiperfluorescentes o anómalamente fluorescentes en áreas que bordean y/o son adyacentes a (en la denominada zona de unión) la atrofia geográfica preexistente.
40

La DMAE puede estar en su etapa tardía y se puede caracterizar por la presencia de áreas de FAF hiperfluorescentes o anómalamente fluorescentes en ausencia de atrofia geográfica preexistente. En estos casos, sin querer ceñirnos a la teoría, puede predecir una futura pérdida de EPR.

45 La DMAE, tanto en etapa temprana como tardía, se puede caracterizar por la presencia de células inmunitarias (p. ej., células inmunitarias fagocíticas). La presencia de células inmunitarias se puede sospechar a partir de muestras oculares postnucleación o post mortem. Tal y como se describe en el presente documento, la presencia de células inmunitarias se puede evaluar usando DNIRA.

50 Se pueden evaluar, tratar o prevenir patrones tales como el «goteo difuso» usando métodos desvelados en el presente documento. Estos patrones de goteo difuso se conocen en la técnica (véase, p. ej., Schmitz-Valckenberg y col. Survey of Ophthalmology. 2009 Jan-Feb; 54(1):96-117; Bindewald y col. British Journal of Ophthalmology. 2005 Jul; 89(7):874-8; Holz y col. Am. J Ophthalmology. 2007 Mar; 143(3):463-72).

55 La DMAE seca se puede identificar por un aumento (p. ej., un aumento transitorio) de la permeabilidad a través de la barrera epitelial del sujeto entre una coroides y una retina con respecto a un estado sano. Esto es totalmente distinto de la permeabilidad vascular (endotelial). Por ejemplo, esto se puede ver usando angiografía.

La toxicidad del RPE, la pérdida de EPR y la DMAE seca se pueden identificar usando DNIRA, p. ej., con yodato sódico (NaIO₃). Se pueden detectar áreas análogas a la atrofia geográfica mediante, por ejemplo, análisis de tejidos (por ejemplo, mediante observación de la pérdida de un marcador celular del EPR tal como el EPR65 y/o la pérdida de tinción celular binuclear) y/o *in vivo*, usando DNIRA en ojos tratados con NaIO₃. La toxicidad del EPR, la pérdida de EPR y la DMAE se pueden identificar usando FAF que muestra una señal de FAF hiperfluorescente, que puede
60

ser compleja, en el área de pérdida de tejido inmediatamente próxima y/o sus márgenes. Esta señal de FAF hiperfluorescente compleja se desarrolla, en los días o las semanas posteriores al tratamiento con NaIO_3 , para convertirse en un patrón de FAF que puede ser complejo y puede incluir, pero no se limita a, hiperfluorescencia acordonada, curvilínea, pisciforme, festoneada, entrelazada, ramificada o reticular. Tales patrones imitan a los que se encuentran en la DMAE seca clínica. Tal FAF también puede ser hipofluorescente.

Además, usando únicamente angiografía, o como parte del DNIRA, la angiografía realizada inmediatamente antes de, o al mismo tiempo que, la aparición de las áreas de FAF alteradas puede demostrar un aumento (incluyendo un aumento transitorio) de permeabilidad a través de la barrera epitelial entre coroides y retina (tal como, por ejemplo, la observada por pérdida de colorantes que se pueden inyectar antes del diagnóstico por imágenes, incluyendo tales colorantes ICG). Esta barrera normalmente incluye la coroides interna, la membrana de Bruch, las células del EPR y, posiblemente, la configuración de los fotorreceptores externos junto con el EPR y la membrana limitante externa. Sin querer ceñirnos a la teoría, una ruptura transitoria de esta barrera epitelial especializada puede subyacer a una secuencia de eventos posteriores, incluyendo el plegado, la ondulación o la deformación de la retina, la capa de fotorreceptores y/o el movimiento/la migración de células inflamatorias de la coroides al espacio subretiniano. Sin embargo, esta fase puede ser transitoria y resolverse, o subclínica en toda su extensión.

La DMAE seca se puede identificar por una presencia (p. ej., una afluencia) de células inmunitarias (p. ej., células inmunitarias fagocíticas o células inmunitarias innatas) a lo largo del epitelio pigmentario retiniano (EPR) con respecto a un estado sano. Cuando hay movimiento/migración de células inflamatorias de la coroides al espacio subretiniano, o de la retina interna a la retina externa o el espacio subretiniano, tales células se pueden identificar en ojos enucleados o tejido extirpado mediante métodos de tinción conocidos en la técnica. En el modelo de NaIO_3 , se puede usar tinción de Ibal para detectar células del sistema inmunitario activadas. Además, la presencia de estas células se puede confirmar mediante comparación con, por ejemplo, preparaciones de NaIO_3 en las que se ha producido reducción de monocitos/macrófagos. Tal reducción se conoce en la técnica y se puede conseguir mediante tratamiento con, por ejemplo, cloruro o clodronato de gadolinio (GAD). La presencia (p. ej., una afluencia) de células inmunitarias se puede medir y/o determinar, *in vivo*, mediante el uso de DNIRA. Antes de la presente invención, tal visualización, *in vivo* no era posible en el entorno clínico.

Además, los macrófagos, un ejemplo de célula inmunitaria que se puede identificar en las células de un sujeto, se pueden clasificar por conjuntos: macrófagos activados clásicamente (M1) o de forma alternativa (M2) (véase, p. ej., Laskin, Chem Res Toxicol. 2009 August 17; 22(8): 1376-1385). Sin querer ceñirnos a la teoría, los macrófagos M1 se activan mediante mecanismos estándar, tales como IFN γ , LPS y TNF α , mientras que los macrófagos M2 se activan mediante mecanismos alternativos, tales como IL-4, IL-13, IL-10 y TGF β . Sin querer ceñirnos a la teoría, los macrófagos M1 exhiben un fenotipo proinflamatorio citotóxico, mientras que los macrófagos M2 suprimen algunos aspectos de las respuestas inmunitaria e inflamatoria y participan en la reparación de heridas y la angiogénesis. También se desvela la inhibición, modulación o polarización de uno o más de los macrófagos M1 y M2.

La DMAE seca se puede identificar por los cambios en uno o más los diagnósticos por imágenes del fondo del ojo en el espectro azul, los diagnósticos por imágenes del fondo del ojo con luz blanca, los diagnósticos por imágenes del fondo del ojo con luz anérita y la OCT en un ojo del sujeto. La DMAE seca se puede identificar por los cambios en uno o más de entre cSLO, FAF, OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal), SD-OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal) u otras modalidades de diagnóstico por imágenes que incluyen otras longitudes de onda de fluorescencia (p. ej., longitudes de onda que varían del azul al infrarrojo, p. ej., de 390 nm a 1 mm, incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz blanca, la luz anérita, el infrarrojo cercano o el infrarrojo). Los cambios ilustrativos incluyen diferencias de un patrón de diagnóstico por imágenes en el mismo o diferentes sujetos y/o animales en dos momentos y/o condiciones experimentales o clínicas distintos. Por ejemplo, los cambios pueden abarcar cambios de los datos de diagnóstico por imágenes entre dos evaluaciones del mismo sujeto y/o animal y/o cambios de los datos de diagnóstico por imágenes entre un primer sujeto y/o animal y los datos de diagnóstico por imágenes de un segundo sujeto y/o animal.

La DMAE se puede identificar mediante OCT. Las imágenes de secciones transversales pueden mostrar la presencia de montículos bajos, o señales piramidales o de forma lanceolada, en el espacio subretiniano. El diagnóstico por imágenes tridimensional o frontal revela señales acordonadas o curvilíneas, ovales, circulares, en forma de halo o similares a las diana. Se pueden observar los patrones transversales o patrones transversos y los patrones transversales o patrones transversos comprenden pérdida de EPR y/o retina externa (atrofia) o montículos, triángulos, picos o puntas encontrados en el espacio subretiniano. Estas características pueden ser indicativas de DMAE.

Además, la invención proporciona métodos de tratamiento o prevención de la enfermedad RPD, también conocida como, pero no limitada a, las siguientes: «enfermedad drusenoide reticular», «drusas pseudoreticulares» y «enfermedad macular drusenoide» o «enfermedad caracterizada por la presencia de depósitos drusenoides

subretinianos».

La enfermedad RPD puede ser aquella en la que el material pseudodrusenoide se reduce o erradica o en la que la acumulación y/o expansión se ralentizan tras su tratamiento. Se desvela un método de tratamiento de la enfermedad RPD en el que las pseudodrusas se reducen o erradican tras tratamiento en el área foveal y/o el área perifoveal y/o el área juxtafoveal de un ojo del sujeto.

Se desvelan métodos de tratamiento o prevención de la enfermedad RPD en los que se reducen las velocidades de progresión de enfermedad temprana a tardía. La enfermedad tardía puede incluir, por ejemplo, neovascularización coroidea o atrofia geográfica.

También se desvelan métodos de tratamiento o prevención de la enfermedad RPD en los que se reducen las velocidades de expansión de la atrofia geográfica.

La enfermedad RPD se puede identificar mediante FAF u otras modalidades de diagnóstico por imágenes que incluyen otras longitudes de onda de fluorescencia. Estas longitudes de onda pueden variar desde el azul al infrarrojo, p. ej., de 390 nm a 1 mm, incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz blanca, el infrarrojo cercano y el infrarrojo.

La enfermedad RPD se puede identificar por la presencia de áreas de FAF hiperfluorescentes o de fluorescencia anómala u otras modalidades de diagnóstico por imágenes que incluyen otras longitudes de onda de fluorescencia. Estas longitudes de onda pueden variar desde el azul al infrarrojo, p. ej., de 390 nm a 1 mm, incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz blanca, el infrarrojo cercano y el infrarrojo. La enfermedad RPD se puede identificar mediante el uso de DNIRA.

La enfermedad RPD se puede identificar usando al menos una de, o al menos dos de, o al menos tres de, o al menos cuatro de entre luz blanca, luz azul, FAF, infrarrojo cercano e infrarrojo. La enfermedad RPD se puede identificar mediante luz azul.

La enfermedad RPD se puede identificar mediante OCT. Las imágenes de secciones transversales pueden mostrar la presencia de montículos bajos, o señales piramidales o de forma lanceolada, en el espacio subretiniano. El diagnóstico por imágenes mediante OCT tridimensional o frontal revela señales acordonadas o curvilíneas, ovales, circulares, en forma de halo o similares a las diana.

La RPD se puede identificar por un aumento (p. ej., un aumento transitorio) de la permeabilidad a través de la barrera epitelial del sujeto entre una coroides y una retina con respecto a un estado sano. Esto es totalmente distinto de la permeabilidad vascular (endotelial). Por ejemplo, usando DNIRA, que comprende, por ejemplo, un modelo de yodato sódico (NaIO_3) de toxicidad del EPR, se pueden formar áreas geográficas de daño o pérdida de EPR que se pueden detectar mediante, por ejemplo, análisis de tejidos (por ejemplo, mediante observación de la pérdida de un marcador celular del EPR tal como el EPR65 y/o la pérdida de tinción celular binuclear). Además, el diagnóstico por imágenes mediante FAF de EPR tratado con NaIO_3 muestra una señal de FAF hiperfluorescente, que puede ser compleja, en el área de pérdida de tejido inmediatamente próxima y/o en sus márgenes. Esta señal de FAF hiperfluorescente se desarrolla, en los días o las semanas posteriores al tratamiento con NaIO_3 , para convertirse en un patrón de FAF que puede ser complejo e incluye, pero no se limita a, hiperfluorescencia acordonada, curvilínea, pisciforme, festoneada, entrelazada, ramificada o reticular. Tales patrones imitan a los que se encuentran en la RPD clínica.

Además, en el DNIRA, la angiografía realizada inmediatamente antes de, o al mismo tiempo que, la aparición de las áreas de FAF alteradas demuestra un aumento (incluyendo un aumento transitorio) de permeabilidad a través de la barrera epitelial entre coroides y retina (tal como la observada por pérdida de colorantes que se pueden inyectar antes del diagnóstico por imágenes, incluyendo tales colorantes ICG). Esta barrera normalmente incluye la coroides interna, la membrana de Bruch, las células del EPR y, posiblemente, la configuración de los fotorreceptores externos junto con el EPR y la membrana limitante externa. Sin querer ceñirnos a la teoría, una ruptura transitoria de esta barrera epitelial especializada puede ser permisiva para la secuencia de eventos posteriores, incluyendo el plegado, la ondulación o la deformación de la capa de fotorreceptores. Sin embargo, esta fase puede ser transitoria y resolverse, o subclínica en toda su extensión.

La RPD se puede identificar por una presencia (p. ej., una afluencia) de células inmunitarias (p. ej., células inmunitarias fagocíticas) a lo largo del epitelio pigmentario retiniano (EPR) del sujeto con respecto a un estado sano. La presencia (p. ej., una afluencia) de células inmunitarias se puede detectar y/o medir con DNIRA. Cuando hay movimiento/migración de células inflamatorias de la coroides al espacio subretiniano, o de la retina interna a la retina externa o el espacio subretiniano, tales células se pueden identificar mediante tinción, tal como se sabe en la técnica. Por ejemplo, usando un modelo de NaIO_3 , se puede usar tinción de Iba1 para detectar células del sistema

inmunitario activadas. Además, la presencia de estas células se puede confirmar mediante comparación con preparaciones de NaIO_3 en las que se ha producido reducción de monocitos/macrófagos. Tal reducción se conoce en la técnica y se puede conseguir mediante tratamiento con, por ejemplo, cloruro o clodronato de gadolinio (GAD). Además, los macrófagos, un ejemplo de una célula inmunitaria, que se identifican en las células de un sujeto, se pueden clasificar por conjuntos: macrófagos activados clásicamente (M1) o de forma alternativa (M2) (véase, p. ej., Laskin, Chem Res Toxicol. 2009 August 17; 22(8): 1376-1385). Sin querer ceñirnos a la teoría, los macrófagos M1 se activan mediante mecanismos estándar, tales como IFN γ , LPS y TNF α , mientras que los macrófagos M2 se activan mediante mecanismos alternativos, tales como IL-4, IL-13, IL-10 y TGF β . Sin querer ceñirnos a la teoría, los macrófagos M1 exhiben un fenotipo proinflamatorio citotóxico, mientras que los macrófagos M2 suprimen algunos aspectos de las respuestas inmunitaria e inflamatoria y participan en la reparación de heridas y la angiogénesis. Por ejemplo, se desvela la inhibición, modulación o polarización de uno o más macrófagos M1 y M2.

La enfermedad RPD se puede identificar por los cambios en uno o más de entre los diagnósticos por imágenes del fondo del ojo en el espectro azul, los diagnósticos por imágenes del fondo del ojo con luz blanca, los diagnósticos por imágenes del fondo del ojo con luz anérita y la OCT en un ojo del sujeto. La enfermedad RPD se puede identificar por los cambios en uno o más de entre cSLO, FAF, OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal), SD-OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal) u otras modalidades de diagnóstico por imágenes que incluyen otras longitudes de onda de fluorescencia (p. ej., longitudes de onda que varían del azul al infrarrojo, p. ej., de 390 nm a 1 mm, incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz blanca, la luz anérita, el infrarrojo cercano o el infrarrojo). Los cambios ilustrativos incluyen diferencias de un patrón de diagnóstico por imágenes en el mismo o diferentes sujetos y/o animales en dos momentos y/o condiciones experimentales o clínicas distintos. Por ejemplo, los cambios pueden abarcar cambios de los datos de diagnóstico por imágenes entre dos evaluaciones del mismo sujeto y/o animal y/o cambios de los datos de diagnóstico por imágenes entre un primer sujeto y/o animal y los datos de diagnóstico por imágenes de un segundo sujeto y/o animal.

La enfermedad ocular que causa ceguera también puede ser LORDs (degeneración retiniana de aparición tardía), degeneración retiniana asociada a la deficiencia de c1qTNF5 o su correspondiente mutación génica, u otra maculopatía, incluyendo, pero sin limitarse a, la enfermedad de Stargart, distrofia en patrón, así como retinitis pigmentaria (RP) y enfermedades relacionadas. La maculopatía puede ser heredada.

La enfermedad ocular que causa ceguera también puede ser un trastorno idiopático que puede, sin querer ceñirnos a la teoría, estar caracterizado por inflamación de la retina, acompañada o no de degeneración macular, incluyendo, pero sin limitarse a, los síndromes de puntos blancos (p. ej., coriorretinopatía serpiginosa, retinopatía serpiginosa, epitelopatía pigmentaria placoide posterior multifocal aguda (APMPPE), síndrome de múltiples puntos blancos evanescentes (MEWDS), retinopatía aguda zonal oculta externa (AZOOR), coroidopatía interna punteada (PIC) y fibrosis subretiniana difusa (DSF)).

La enfermedad ocular que causa ceguera también puede ser retinopatía serosa central (CSR). La CSR es un desprendimiento fluido de capas de mácula de su tejido de soporte. Con frecuencia, la CSR se puede caracterizar por la pérdida y acumulación de fluido en el espacio subretiniano o sub-EPR. Sin querer ceñirnos a la teoría, la pérdida y acumulación de fluido se puede producir debido a pequeñas roturas en el EPR.

Una o más de las enfermedades oculares que causan ceguera se pueden identificar por la presencia de áreas de FAF hiperfluorescentes y/o de fluorescencia anómala, o a otras longitudes de onda de la luz de 350 nm a 1000 nm. Una o más de las enfermedades oculares que causan ceguera se pueden identificar usando DNIRA.

Una o más de las enfermedades oculares que causan ceguera se pueden identificar mediante, por ejemplo, cSLO, FAF, OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal), SD-OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal) u otras modalidades de diagnóstico por imágenes que incluyen otras longitudes de onda de fluorescencia (p. ej., longitudes de onda que varían del azul al infrarrojo, p. ej., de 390 nm a 1 mm, incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz blanca, la luz anérita, el infrarrojo cercano o el infrarrojo).

La enfermedad ocular que causa ceguera puede estar en una cierta etapa o progresión. La enfermedad ocular que causa ceguera puede ser incipiente, emergente, quiescente, en progreso o activa.

Además de tratar enfermedades oculares que causan ceguera preexistentes, la presente invención comprende métodos profilácticos con el fin de evitar o ralentizar la aparición de estos trastornos. En aplicaciones profilácticas, se puede administrar un agente a un sujeto susceptible de o, dicho de otra forma, con riesgo de padecer una enfermedad ocular que causa ceguera concreta. Tal susceptibilidad se puede determinar mediante, por ejemplo, predisposición familiar, pruebas genéticas, análisis de factores de riesgo, sangre u otros niveles de citoquinas o biomarcadores y examen ocular, que puede incluir análisis multimodales tales como FAF, luz azul, luz blanca, luz

aneritra, infrarrojo cercano, infrarrojo, DNIRA, etc. Tal susceptibilidad también se puede determinar mediante, por ejemplo, detección mediante OCT, con visualización de secciones transversales, tridimensional y frontal.

Además de tratar enfermedades oculares que causan ceguera conocidas y definidas, la presente invención comprende patrones concretos de diagnósticos por imágenes *in vivo* usando luz de longitudes de onda que varían de 300 a 1000 nm, incluyendo luz blanca, luz azul, FAF, infrarrojo, infrarrojo cercano, DNIRA o mediante OCT, con visualización de secciones transversales, tridimensional y frontal. En aplicaciones contra patrones concretos de diagnóstico por imágenes *in vivo*, se puede administrar un agente a un sujeto con, susceptible de o, dicho de otra forma, con riesgo de padecer una enfermedad que causa ceguera concreta. Tal diagnóstico o susceptibilidad se pueden determinar mediante, por ejemplo, examen oftálmico, predisposición familiar, pruebas genéticas, análisis de factores de riesgo y sangre u otros niveles de citoquinas o biomarcadores, que puede incluir análisis multimodales tales como FAF, luz azul, luz blanca, luz aneritra, infrarrojo cercano, infrarrojo, DNIRA, etc. Tal susceptibilidad también se puede determinar mediante, por ejemplo, detección mediante OCT, con visualización de secciones transversales, tridimensional y frontal.

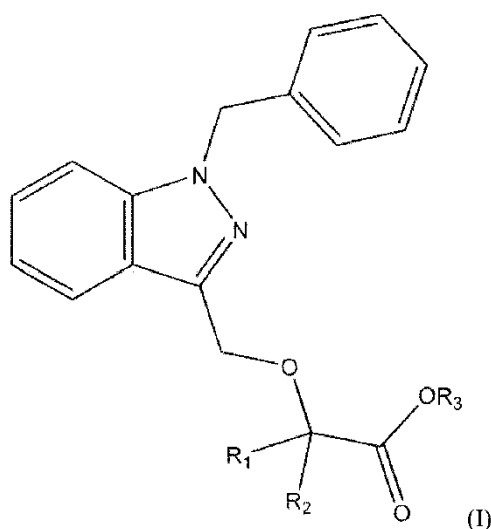
Agentes de la invención

En varios aspectos, se desvela la identificación y el uso de un compuesto candidato y/o compuesto de ensayo. Para la identificación y el uso de un compuesto candidato y/o compuesto de ensayo, el compuesto candidato y/o compuesto de ensayo puede ser una sustancia química, una molécula, un compuesto, una sustancia biológica (p. ej., un anticuerpo o un péptido), un fármaco, un profármaco, una terapia celular, un compuesto sintético de bajo peso molecular o un fármaco de molécula pequeña. El compuesto candidato y/o compuesto de ensayo se pueden seleccionar de una biblioteca de compuestos conocidos en la técnica. El compuesto candidato puede ser útil para el tratamiento de una enfermedad ocular que causa ceguera, la prevención de una enfermedad ocular que causa ceguera o la reducción de la velocidad de patogénesis de una enfermedad ocular que causa ceguera.

En varios aspectos, la presente invención contempla un compuesto para uso en el tratamiento o la prevención de DMAE seca. En algunas formas de realización, un compuesto de **Fórmula I**, metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos también es para administración con un agente terapéutico adicional, incluyendo, por ejemplo, uno o más de entre un agente anti-VEGF, un inhibidor de ACE, un agonista o agonista parcial de PPAR-gamma, un inhibidor de renina, un esteroide y un agente que modula la autofagia, así como un semapimod, un inhibidor de MIF, un inhibidor de CCR2, CKR-2B, un 2-tioimidazol, CAS 445479-97-0, CCX140, clodronato, una preparación de clodronato liposomal o cloruro de gadolinio.

En varios aspectos, la presente divulgación contempla la identificación de un sujeto con enfermedad ocular que causa ceguera que es más probable que responda al tratamiento con un agente (un «agente de la invención») y/o la determinación de si una enfermedad ocular que causa ceguera en un sujeto es sensible al tratamiento con un agente.

En algunas formas de realización, un agente de la invención es un compuesto de **Fórmula I**:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_1 y R_2 son independientemente H o un alquilo C_1-C_6 y R_3 es H o un alquilo C_1-C_6 .

En varias formas de realización, R_1 y R_2 son independientemente hidrógeno, metilo o etilo.

En algunas formas de realización, R_1 y R_2 son independientemente metilo o etilo.

5

En algunas formas de realización, R_1 y R_2 son metilo.

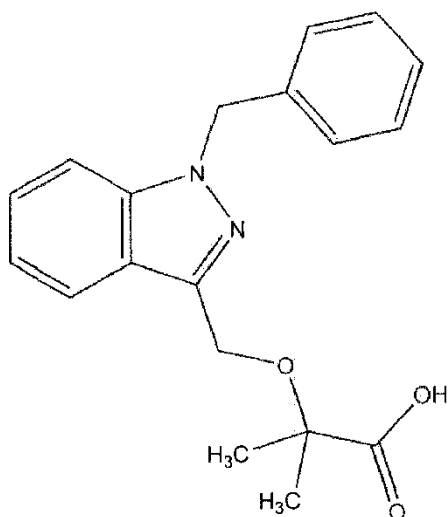
En algunas formas de realización, R_3 es hidrógeno, metilo o etilo.

10

En algunas formas de realización, R_3 es hidrógeno.

En algunas formas de realización, concretamente donde R_3 es hidrógeno, los compuestos de **Fórmula I** están en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

15 En algunas formas de realización, R_1 y R_2 son metilo y R_3 es hidrógeno. En tales formas de realización, el compuesto de **Fórmula I** es ácido 2-((1-bencilindazol-3-il)metoxi)-2-metilpropiónico, también conocido como ácido 2-metil-2-[[1-(fenilmetil)-1H-indazol-3-il]metoxi]propanoico. Tal compuesto se conoce habitualmente como bindarit y tiene la estructura siguiente:

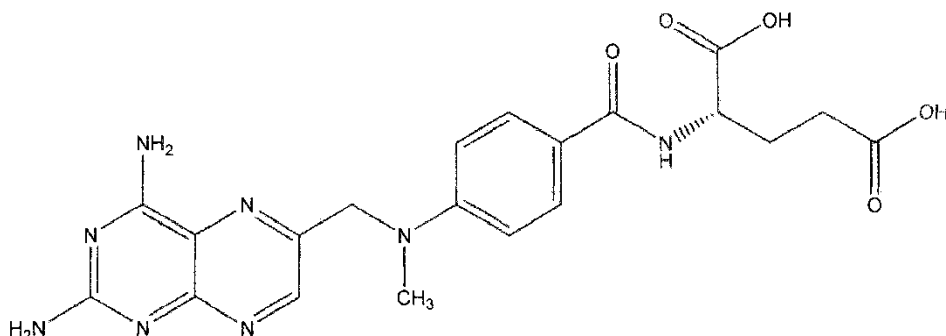


20

La síntesis de bindarit se describe en detalle en la patente US4999367.

25 El bindarit es un inhibidor de la producción de MCP-1 *in vitro* e *in vivo* y, sin querer ceñirnos a la teoría, sus efectos beneficiosos en modelos animales de inflamación pueden estar relacionados con esta actividad anti-MCP-1 (véase Mirolo, y col. Eur Cytokine Netw 2008;19:119-122). Bindarit también ha mostrado inhibir selectivamente la producción de MCP-2 y MCP-3 (véase Mirolo, y col. Eur Cytokine Netw 2008;19:119-122).

30 En algunas formas de realización, un agente de la invención es metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El metotrexato tiene la estructura:



El metotrexato también se conoce por su nombre IUPAC, ácido (2S)-2-[(4-[(2,4-diaminopteridin-6-

il)metil](metil)amino}benzoil)amino]pentanodioico; por "MTX" y por "ametofterina". El metotrexato sódico está disponible bajo prescripción médica en los Estados Unidos. La síntesis de metotrexato se ha descrito en la patente US4080325.

- 5 En otra forma de realización más, un agente de la invención es un modulador de la polarización de macrófagos. Los moduladores de la polarización de macrófagos ilustrativos incluyen moduladores del receptor activado por proliferador de peroxisomas-gamma (PPAR-g), incluyendo, por ejemplo, agonistas, agonistas parciales o agonistas combinados de PPAR-gamma/alfa.
- 10 En algunas formas de realización, el modulador del PPAR gamma es un agonista total o un agonista parcial. En algunas formas de realización, el modulador del PPAR gamma es un miembro de la clase de fármacos de las tiazolidinadionas (TZD o glitazonas). A modo de ejemplo no limitante, el modulador del PPAR gamma puede ser uno o más de entre rosiglitazona (AVANDIA), pioglitazona (ACTOS), troglitazona (REZULIN), netoglitazona, rivoglitazona, ciglitazona y rodanina. En algunas formas de realización, el modulador del PPAR gamma es uno o más de entre irbesartán y telmesartán. En algunas formas de realización, el modulador del PPAR gamma es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE, tal como, por ejemplo, ibuprofeno) e indoles. Entre los inhibidores conocidos se incluye el agente experimental GW-9662. Ejemplos adicionales de moduladores del PPAR gamma se describen en las publicaciones de la WIPO n.º WO/1999/063983, WO/2001/000579, Nat Rev Immunol. 2011 Oct 25;11(11):750-61, o agentes identificados usando los métodos del documento WO/2002/068386.
- 15 En algunas formas de realización, el modulador del PPAR gamma es un modulador del PPAR «dual», o «equilibrado» o «pan». En algunas formas de realización, el modulador del PPAR gamma es un glitazar, que une dos o más isoformas del PPAR, p. ej., muraglitazar (Pargluva), tesaglitazar (Galida) y aleglitazar.
- 20 En otra forma de realización, un agente de la invención es semapimod, (CNI-1493) tal y como se describe en Bianchi, y col. (Mar 1995). Molecular Medicine (Cambridge, Mass.) 1 (3): 254-266.
- 25 En otra forma de realización más, un agente de la invención es un inhibidor del factor inhibitorio de la migración (MIF). Los inhibidores del MIF ilustrativos se describen en las publicaciones de la WIPO n.º WO 2003/104203, WO 2007/070961, WO 2009/117706 y en las patentes US7732146, US7632505, US7294753 y US7294753. En algunas formas de realización, el inhibidor del MIF es el éster metílico del ácido (S,R)-3-(4-hidroxifenil)-4,5-dihidro-5-isoxazolacético (ISO-1), isoxazolina, p425 (J. Biol. Chem., 287, 30653-30663), epoxiazadiradiona o vitamina E.
- 30 En otra forma de realización más, un agente de la invención es un inhibidor del receptor de quimiocinas 2 (CCR2) tal y como se describe en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos y patentes de n.º de publicación: US7799824, US8067415, US 2007/0197590, US 2006/0069123, US 2006/0058289 y US 2007/0037794. En algunas formas de realización, el inhibidor del CCR2 es maraviroc, cenicriviroc, CD192, CCX872, CCX140, 2-((isopropilaminocarbonil)amino)-N-(2-((cis-2-((4-(metiltio)benzoil)amino)ciclohexil)amino)-2-oxoetil)-5-(trifluorometil)-benzamida, vicriviroc, SCH351125, TAK779, Teijin, RS-504393, el compuesto 2, compuesto 14 o compuesto 19 (PloS ONE 7(3): e32864).
- 35 En varias formas de realización, un agente de la invención es uno o más de entre CKR-2B, un 2-tioimidazol, un antagonista del CCR2 (CAS 445479-97-0) y CCX140.
- 40 En otra forma de realización más, un agente de la invención es un clodronato. En otra forma de realización más, el agente es una preparación de clodronato liposomal tal y como se describe en Barrera y col. Arthritis and Rheumatism, 2000, 43, pp. 1951-1959.
- 45 En otra forma de realización más, un agente de la invención es una forma quelada o no quelada de gadolinio, por ejemplo, cloruro de gadolinio (GAD).
- 50 En varias formas de realización, un agente de la invención es un agente anti-VEGF. Los ejemplos no limitantes de agentes anti-VEGF útiles en los presentes métodos incluyen ranibizumab, bevacizumab, aflibercept, la proteína de fusión receptor del VEGF-Fc KH902, el anticuerpo 2C3, ORA102, pegaptanib, bevasiranib, SIRNA-027, decursin, decursinol, picropodofilina, guggulsterona, PLG101, el eicosanoide LXA4, PTK787, pazopanib, axitinib, CDDO-Me, CDDO-Imm, shikonina, beta-hidroxiisovalerilshikonina, el gangliósido GM3, el anticuerpo DC101, el anticuerpo Mab25, el anticuerpo Mab73, el anticuerpo 4A5, el anticuerpo 4E10, el anticuerpo 5F12, el anticuerpo VA01, el anticuerpo BL2, la proteína relacionada con el VEGF, sFLT01, sFLT02, el péptido B3, TG100801, sorafenib, el anticuerpo G6-31, un anticuerpo de fusión y un anticuerpo que se une a un epítipo de VEGF. Los ejemplos no limitantes adicionales de agentes anti-VEGF útiles en los presentes métodos incluyen una sustancia que se une específicamente a uno o más de entre un factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A) humano, un factor de crecimiento endotelial vascular-B (VEGF-B) humano, un factor de crecimiento endotelial vascular-C (VEGF-C) humano, un factor de crecimiento endotelial vascular-D (VEGF-D) humano, un factor de crecimiento endotelial
- 55
- 60

vascular-E (VEGF-E) humano y un anticuerpo que se une a un epítipo del VEGF.

En una forma de realización, el agente anti-VEGF es el anticuerpo ranizumab o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El ranibizumab está disponible en el mercado bajo la marca registrada LUCENTIS. En otra forma de realización, el agente anti-VEGF es el anticuerpo bevacizumab o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El bevacizumab está disponible en el mercado bajo la marca registrada AVASTIN. En otra forma de realización, el agente anti-VEGF es aflibercept o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El aflibercept está disponible en el mercado bajo la marca registrada EYLEA. En una forma de realización, el agente anti-VEGF es pegaptanib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El pegaptanib está disponible en el mercado bajo la marca registrada EYLEA. En otra forma de realización el agente anti-VEGF es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a un epítipo del VEGF, tal como un epítipo del VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, o VEGF-E. En algunas formas de realización, el antagonista del VEGF se une a un epítipo del VEGF de tal forma que la unión del VEGF y el VEGFR está inhibida. En una forma de realización, el epítipo abarca un componente de la estructura tridimensional del VEGF que se visualiza, de tal forma que el epítipo está expuesto en la superficie de la molécula de VEGF plegada. En una forma de realización, el epítipo es una secuencia lineal de aminoácidos del VEGF.

En varias formas de realización, un agente de la invención es un inhibidor del sistema renina-angiotensina (RAS). En algunas formas de realización, el inhibidor del sistema renina-angiotensina (RAS) es uno o más de entre un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), un bloqueador del receptor de angiotensina y un inhibidor de renina.

Los ejemplos no limitantes de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) que son útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a: alacepril, alatriopril, sal cálcica de altiopril, ancovenina, benazepril, clorhidrato de benazepril, benazeprilat, benzazepril, benzoilcaptopril, captopril, captoprilcisteína, captoprilglutatin, ceranapril, ceranopril, ceronapril, cilazapril, cilazaprilat, converstatina, delapril, delapril diácido, enalapril, enalaprilat, enalquireno, enapril, epicaptopril, foroximitina, fosfenopril, fosenopril, sal sódica de fosenopril, fosinopril, sal sódica de fosinopril, fosinoprilat, ácido fosinoprílico, glicopril, hemorfin-4, idapril, imidapril, indolapril, indolaprilat, libenzapril, lisinopril, liciumina A, liciumina B, mixanpril, moexipril, moexiprilato, moveltipril, muraceína A, muraceína B, muraceína C, pentopril, perindopril, perindoprilato, pivalopril, pivopril, quinapril, clorhidrato de quinapril, quinaprilato, ramipril, ramiprilato, espirapril, clorhidrato de espirapril, espiraprilato, espiopril, clorhidrato de espirapril, temocapril, clorhidrato de temocapril, teprotide, trandolapril, trandolaprilato, utibapril, zabicipril, zabiciprilato, zofenopril, zofenoprilato, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y mezclas de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de bloqueadores del receptor de angiotensina que son útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a: irbesartán (patente US5270317), candesartán (patente US5196444y US5705517), valsartán (patente US5399578) e iosartán (patente US5138069).

Los ejemplos no limitantes de inhibidores de renina que son útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a: aliskiren, ditekiren, enalkiren, remikiren, terlakiren, ciprokiren y zankiren, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y sales de los mismos.

En varias formas de realización, un agente de la invención es un esteroide. En algunas formas de realización, un esteroide es un compuesto que pertenece a, o está relacionado con, las siguientes familias de compuestos ilustrativas: corticosteroides, mineralicoesteroides y esteroides sexuales (incluyendo, por ejemplo, moléculas potencialmente androgénicas o estrogénicas o antiandrogénicas y antiestrogénicas). Incluidos entre estos están, a modo de ejemplo no limitante, la prednisona, prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona, flucinolona, aldosterona, espironolactona, el danazol (también conocido como OPTINA) y otros.

En varias formas de realización, un agente de la invención es un agente que modula la autofagia, microautofagia, mitofagia u otras formas de autofagia. En algunas formas de realización, el fármaco y/o compuesto candidato es uno o más de entre sirolimus, tacrolimis, rapamicina, everolimus, bafilomicina, cloroquina, hidroxiclороquina, spautin-1, metformina, perifosina, resveratrol, tricostatin, ácido valproico, Z-VAD-FMK u otros conocidos por los expertos en la materia. Sin querer ceñirnos a la teoría, un agente que modula la autofagia, microautofagia, mitofagia u otras formas de autofagia puede alterar el reciclaje de componentes intracelulares, por ejemplo, pero sin limitarse a, orgánulos celulares, mitocondria, retículo endoplasmático, lípidos u otros. Sin querer ceñirnos más a la teoría, este agente puede o no actuar a través de la cadena ligera 3 (LC3) de la proteína 1A/1B asociada a microtúbulos.

Compuestos fluorescentes

En algunas formas de realización, el compuesto fluorescente es adecuado para el diagnóstico por imágenes con varias longitudes de onda de fluorescencia. En algunas formas de realización, estas longitudes de onda varían desde el visible hasta el infrarrojo, p. ej., desde 390 nm hasta 1 mm, incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz

blanca y el infrarrojo cercano. En algunas formas de realización, el colorante es un colorante que emite en el infrarrojo cercano. En algunas formas de realización, el colorante es ICG.

En algunas formas de realización, el compuesto fluorescente es adecuado para el diagnóstico por imágenes con varias longitudes de onda de fluorescencia. En algunas formas de realización, estas longitudes de onda varían desde el visible hasta el infrarrojo, p. ej., desde aproximadamente 390 nm hasta aproximadamente 1 mm, incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz blanca y el infrarrojo cercano. En algunas formas de realización, la absorción es desde aproximadamente 390 nm hasta aproximadamente 1 mm. En algunas formas de realización, la emisión es desde aproximadamente 390 nm hasta aproximadamente 1 mm.

En algunas formas de realización, el compuesto fluorescente absorbe luz a una longitud de onda de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 900 nm y/o emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 750 nm a aproximadamente 950 nm.

En algunas formas de realización, el colorante es un colorante que emite en el infrarrojo cercano. En algunas formas de realización, el colorante es ICG. En algunas formas de realización, los filtros de excitación/emisión de ICG son de 795 nm (excitación)/810 nm (emisión).

En algunas formas de realización, la dosis del compuesto fluorescente, p.ej., un colorante (ICG incluida), es una cantidad efectiva del compuesto fluorescente. En varias formas de realización, la dosis de ICG es desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 mg/kg de un animal. En algunas formas de realización, la dosis es aproximadamente 0,1; o aproximadamente 0,3; o aproximadamente 0,5; o aproximadamente 1,0; o aproximadamente 2,0; o aproximadamente 3,0; o aproximadamente 4,0; o aproximadamente 5,0; o aproximadamente 6,0; o aproximadamente 7,0; o aproximadamente 8,0; o aproximadamente 9,0; o aproximadamente 10,0 mg/kg de un animal.

En varias formas de realización, los compuestos fluorescentes, o metabolitos de los mismos, provocan fluorescencia que se produce en las células del EPR y/o las células inmunitarias.

En otras formas de realización, los métodos descritos en el presente documento no comprenden la administración de (i) una cantidad adicional de compuesto fluorescente al animal o (ii) un segundo compuesto fluorescente al animal.

Toxinas

En algunas formas de realización, se proporciona una toxina que se sabe que afecta al tejido ocular, incluyendo, pero sin limitarse a, el EPR o la retina.

En algunas formas de realización, la toxina es una o más de entre aluminio, aminofenoxialcanos (un ejemplo no limitante incluye, pero no se limita a, 1,4-bis(4-aminofenoxi)-2-fenilbenceno para ratas), fármacos anfófilos catiónicos/antidepresivos tricíclicos (los ejemplos no limitantes incluyen, pero no se limitan a, amiodarona, cloroamitriptilina, clorfentermina, clomipramina, imipramina, iprindol, varios aminoglucósidos y otros compuestos anfófilos catiónicos), desferrioxamina, clorhidrato de dl-(p-trifluorometilfenil)isopropilamina, fluoruro (p. ej., fluoruro sódico), yodato (los ejemplos no limitantes incluyen, pero no se limitan a, yodato sódico o potásico), yodoacetato, plomo, metanol y ácido fórmico, 4,4'-methilenedianilina, N-metil-N-nitrosurea, naftaleno, naftol, nitroanilina (N-3-piridilmetil-N'-p-nitrofenilurea/nitroanilina/piriminil), organofosfatos (los ejemplos no limitantes incluyen, pero no se limitan a, etiltiometón, fentión y fenitrotión), oxalato (un ejemplo no limitante incluye, pero no se limita a, oxalato de dibutilo), fenotiacinas (los ejemplos no limitantes incluyen, pero no se limitan a, piperidilclorofenotiacina, tioridacina y clorpromacina), quinolinas (un ejemplo no limitante incluye, pero no se limita a, cloroquina e hidroxiclороquina), estreptozotocina, deficiencia de taurina, uretano, deficiencia de zinc causada por quelantes metálicos y derivados y variantes de los mismos.

En algunas formas de realización, la toxina es un yodato. En algunas formas de realización, la toxina es yodato sódico o potásico.

En algunas formas de realización, la toxina induce atrofia del tejido ocular. En varias formas de realización, la atrofia comprende necrosis y/o apoptosis. En algunas formas de realización, la toxina reduce o modifica la autofagia. En algunas formas de realización, la toxina induce atrofia geográfica y/o expansión de la atrofia geográfica. En algunas formas de realización, la toxina induce uno o más de los efectos antes mencionados.

En algunas formas de realización, la toxina se administra una vez, o dos veces, o tres veces. En algunas formas de realización, la toxina se administra una vez, o dos veces, o tres veces, o cuatro veces, o cinco veces. En algunas

formas de realización, se realiza una segunda, o tercera, o cuarta, o quinta administración en un plazo de aproximadamente un día, o 1 semana, o 1 mes después de la primera.

En algunas formas de realización, la toxina administrada puede ser uno o más de los agentes descritos en el presente documento. En varias formas de realización, el segundo, o tercer, o cuarto, o quinto pulso es un modulador de la autofagia, supervivencia celular, muerte celular, proliferación, regeneración y similares, tal y como se ha descrito en el presente documento y se sabe en la técnica.

En otra forma de realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden la administración de (i) una cantidad adicional de una primera toxina al animal y/o (ii) una segunda toxina al animal. En algunas formas de realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden además la observación de una reducción de la velocidad de formación, crecimiento o expansión de parches de atrofia de tejido ocular o parches de pérdida de tejido.

En varias formas de realización, los expertos en la materia conocen las dosis de las toxinas. Por ejemplo, una dosis adecuada puede estar en un intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto, por ejemplo, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 1,6 mg/kg, aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 1,8 mg/kg, aproximadamente 1,9 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 11 mg/kg, aproximadamente 12 mg/kg, aproximadamente 13 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, aproximadamente 95 mg/kg, o aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores e intervalos entre estos.

En una forma de realización, la toxina es NaIO_3 y la dosis es aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. En una forma de realización, la toxina es NaIO_3 y la dosis es aproximadamente 45 mg/kg de peso corporal. En una forma de realización, la toxina es NaIO_3 y la dosis es aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal.

Sales y excipientes farmacéuticamente aceptables

Cualquier agente descrito en el presente documento puede poseer un grupo funcional lo suficientemente básico, que puede reaccionar con un ácido orgánico o inorgánico, o un grupo carboxilo, que puede reaccionar con una base orgánica o inorgánica, para formar una sal farmacéuticamente aceptable. Una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable se forma a partir de un ácido farmacéuticamente aceptable, tal y como se sabe bien en la técnica. Tales sales incluyen las sales farmacéuticamente aceptables enumeradas en Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19 (1977) y The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use. P. H. Stahl and C. G. Wermuth (eds.), Verlag, Zurich (Suiza) 2002.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo de ejemplo no limitante, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, camforsulfonato, pamoato, fenilacetato, trifluoroacetato, acrilato, clorobenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, metilbenzoato, o-acetoxibenzoato, naftaleno-2-benzoato, isobutirato, fenilbutirato, α -hidroxibutirato, butino-1,4-dicarboxilato, hexino-1,4-dicarboxilato, caprato, caprilato, cinamato, glicolato, heptanoato, hipurato, malato, hidroximaleato, malonato, mandelato, mesilato, nicotinato, ftalato, teraftalato, propiolato, propionato, fenilpropionato, sebacato, suberato, p-bromobencenosulfonato, clorobencenosulfonato, etilsulfonato, 2-hidroxietilsulfonato, metilsulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, naftaleno-1,5-sulfonato, xilenosulfonato y tartrato.

El término «sal farmacéuticamente aceptable» también se refiere a una sal de los compuestos de la presente invención que tiene un grupo funcional ácido, tal como un grupo funcional ácido carboxílico, y una base. Las bases adecuadas incluyen, pero no se limitan a, hidróxidos de metales alcalinos tales como sodio, potasio y litio; hidróxidos de metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio; hidróxidos de otros metales tales como aluminio y zinc; amoniaco y aminas orgánicas, tales como mono-, di- o tri-alquilaminas sin sustituir o hidroxi sustituidas, dicitohexilamina; tributilamina; piridina; N-metilo, N-etilamina; dietilamina; trietilamina; mono-, bis-, o tri-(2-OH-

alquilaminas inferiores), tales como mono-; bis- o tris-(2-hidroxietil)amina, 2-hidroxi-terc-butilamina o tris-(hidroximetil)metilamina, N,N-di-alquilo inferior-N-(hidroxil-alquilo inferior)aminas, tales como N,N-dimetil-N-(2-hidroxietil)amina o tri-(2-hidroxietil)amina; N-metil-D-glucamina y aminoácidos tales como arginina, lisina y similares.

- 5 En algunas formas de realización, un agente de la invención está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal sódica. En algunas formas de realización, concretamente donde el R₃ de los compuestos de **Fórmula I** es hidrógeno, los compuestos de **Fórmula I** están en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el compuesto de **Fórmula I** es una sal farmacéuticamente aceptable de bindarit. En algunas formas de realización, el metotrexato
10 está en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la sal farmacéuticamente aceptable de metotrexato es sal sódica de metotrexato.

- Además, cualquier agente descrito en el presente documento se puede administrar a un sujeto como un componente de una composición que comprende un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, tales
15 composiciones pueden comprender una cantidad adecuada de un excipiente farmacéuticamente aceptable con el fin de darle la forma necesaria para una administración adecuada.

- Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, animales, vegetales o los de origen sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser salinos, goma acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, se pueden usar
20 agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En una forma de realización, los excipientes farmacéuticamente aceptables son estériles cuando se administran a un sujeto. Cuando se administra intravenosamente cualquier agente descrito en el presente documento, el agua es un excipiente útil. También se
25 pueden emplear como excipientes líquidos, concretamente para soluciones inyectables, soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol. Los excipientes farmacéuticamente aceptables también incluyen almidón, glucosa, lactosa, sucrosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Cualquier agente descrito en el presente documento puede también comprender cantidades menores de agentes humectantes
30 y emulsionantes o agentes amortiguadores del pH.

Formulaciones, administración y dosificación

- Cualquier agente descrito en el presente documento puede tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, inyección intraocular, inyección intravítrea, gotas oftálmicas tópicas, inyección suconjuntival, inyección sub-Tenon, formulaciones transesclerales comprimidos, píldoras, pellets, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, atomizadores, suspensiones o cualquier
35 otra forma adecuada para su uso. En una forma de realización, la composición es adecuada para una inyección subvítrea (véase, p. ej., ILUVIEN o formas similares) o implantación (véase, p. ej., RETISERT o formas similares).
40 En una forma de realización, la composición está en forma de cápsula (véase, p. ej., la patente US5698155). Otros ejemplos de excipientes farmacéuticos aceptables se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 1447-1676 (Alfonso R. Gennaro eds., 19th ed. 1995).

- En una forma de realización, cualquier agente descrito en el presente documento se formula para administración oftálmica, incluyendo, por ejemplo, administración intravítrea o intraocular y/o administración intravenosa. Habitualmente, las composiciones para administración comprenden un tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Además, los agentes se pueden suministrar con un vehículo o dispositivo de liberación adecuados conocidos en la técnica. Las terapias combinadas
45 descritas en rasgos generales en el presente documento también se pueden coentregar en un único vehículo de liberación o dispositivo de liberación. Opcionalmente, las composiciones para administración pueden incluir un anestésico local tal como lignocaina para disminuir el dolor en el sitio de la inyección.
50

- En una forma de realización, cualquier agente descrito en el presente documento se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición adaptada para administración intraocular.
55

- En una forma de realización, cualquier agente descrito en el presente documento se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición adaptada para administración oral a seres humanos. Las composiciones para liberación oral pueden estar, por ejemplo, en forma de comprimidos, pastillas, suspensiones acuosas o aceitosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires. Las composiciones administradas
60 oralmente pueden comprender uno o más agentes, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartamo o sacarina; agentes saborizantes tales como menta, aceite de gaulteria o cereza; agentes colorantes y agentes conservantes, para producir una composición farmacéuticamente grata al paladar. Asimismo, cuando están en forma de comprimido o píldora, las composiciones se pueden recubrir para retardar su desintegración y absorción

en el tracto gastrointestinal, proporcionando así una acción sostenida durante un periodo de tiempo prolongado. Las membranas selectivamente permeables que rodean un vehículo osmóticamente activo que transporta cualquier agente descrito en el presente documento también son adecuadas para composiciones administradas oralmente. En estas últimas plataformas, el fluido procedente del ambiente que rodea a la cápsula es impregnado por el compuesto transportador, que se hincha para desplazar el agente o la composición del agente a través de una apertura. Estas plataformas de entrega pueden proporcionar un perfil de entrega de orden esencialmente cero, al contrario que los perfiles en punta de las formulaciones de liberación inmediata. Un material retardador, tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol, también puede ser útil. Las composiciones orales pueden incluir excipientes estándar tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. En una forma de realización, los excipientes son de grado farmacéutico.

Los ingredientes se pueden suministrar de forma separada o mezclados en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como una solución premezclada, polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua, en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla, una jeringa previamente llena o un sobre, indicando la cantidad de agente activo. Cuando se va a administrar cualquier agente descrito en el presente documento mediante liberación intravítrea o intraocular, se puede dispensar, por ejemplo, con una jeringa o un inyector previamente llenos o en una ampolla para su posterior llenado en una jeringa adecuada. Cuando se va a administrar cualquier agente descrito en el presente documento mediante infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando cualquier agente descrito en el presente documento se va a administrar mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua o solución salina estériles para inyección, de tal forma que los ingredientes se puedan mezclar antes de su administración.

Cualquier agente descrito en el presente documento se puede administrar con medios de liberación controlada o liberación sostenida o mediante dispositivos de liberación que son bien conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes US3845770; US3916899; US3536809; US3598123; US4008719; US5674533; US5059595; US5591767; US5120548; US5073543; US5639476; US5354556 y US5733556. Tales formas de dosificación pueden ser útiles para proporcionar la liberación controlada o sostenida de uno o más ingredientes activos usando, por ejemplo, hidropropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos multicapa, micropartículas, liposomas, microesferas o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Las formulaciones de liberación controlada o sostenida adecuadas conocidas por los expertos en la materia, incluyendo las descritas en el presente documento, se pueden seleccionar fácilmente para su uso con los ingredientes activos de los agentes descritos en el presente documento. Por tanto, la invención proporciona formas de dosificación unitaria únicas adecuadas para administración oral tales como, pero no limitadas a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina y comprimidos oblongos que están adaptadas para su liberación controlada o sostenida.

La liberación controlada o sostenida de un ingrediente activo se puede estimular mediante varias condiciones, que incluyen, pero no se limitan a, cambios de pH, cambios de temperatura, estimulación mediante una longitud de onda adecuada de la luz, concentración o disponibilidad de enzimas, concentración o disponibilidad de agua, otras condiciones fisiológicas u otros compuestos.

Las composiciones se pueden preparar de acuerdo con métodos convencionales de mezcla, granulación, recubrimiento o polimerización, respectivamente, y las presentes composiciones pueden comprender, en una forma de realización, desde aproximadamente el 0,1 % hasta aproximadamente el 99 %, y en otra forma de realización desde aproximadamente el 1 % hasta aproximadamente el 70 % en peso o en volumen de cualquier agente descrito en el presente documento.

En otra forma de realización, cualquier agente descrito en el presente documento actúa sinérgicamente cuando se coadministra con otro agente y se administra a dosis inferiores a las dosis habitualmente empleadas cuando tales agentes se usan como monoterapia.

Por ejemplo, la dosificación de cualquier agente descrito en el presente documento, así como el programa de dosificación, puede depender de varios parámetros, que incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad ocular que causa ceguera que se está tratando, la salud general del sujeto y el criterio del médico que lo administra. Cualquier agente descrito en el presente documento se puede administrar antes de (p. ej., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), simultáneamente a, o después de (p. ej., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes) la administración de un agente terapéutico adicional a un sujeto con necesidad del mismo. En varias formas de realización, cualquier agente descrito en el presente documento se administra con un lapso de tiempo de 1 minuto, 10 minutos, 30 minutos, menos de 1 hora, 1 hora, de 1 hora a 2 horas, de 2 horas a 3

horas, de 3 horas a 4 horas, de 4 horas a 5 horas, de 5 horas a 6 horas, de 6 horas a 7 horas, de 7 horas a 8 horas, de 8 horas a 9 horas, de 9 horas a 10 horas, de 10 horas a 11 horas, de 11 horas a 12 horas, no más de 24 horas o no más de 48 horas. En una forma de realización, se administra un agente de la invención, incluyendo los compuestos de **Fórmula I**, metotrexato o sus sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más agentes terapéuticos adicionales en un plazo máximo de 3 horas. En otra forma de realización, se administra un agente de la invención, incluyendo los compuestos de **Fórmula I**, metotrexato o sus sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más agentes terapéuticos adicionales en un plazo de 1 minuto a 24 horas.

La cantidad de cualquier agente descrito en el presente documento que se mezcla con los materiales vehículo para producir una dosificación única puede variar dependiendo del sujeto que se está tratando y del modo de administración concreto. Se pueden emplear ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos.

En general, las dosis útiles son conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, las dosis se pueden determinar con respecto a Physicians' Desk Reference, 66th Edition, PDR Network; 2012 Edition (December 27, 2011).

La dosificación de cualquier agente descrito en el presente documento puede depender de diversos factores, incluyendo la severidad de la afección, si la afección se va a tratar o prevenir y la edad, el peso y la salud del sujeto que se va a tratar. Adicionalmente, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo sobre la farmacocinética, la farmacodinámica o el perfil de eficacia de un terapéutico) sobre un sujeto concreto puede afectar a la dosificación usada. Asimismo, las dosificaciones individuales exactas se pueden ajustar algo dependiendo de una variedad de factores, entre los que se incluyen la combinación específica de los agentes administrados, el tiempo de administración, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la velocidad de excreción, la enfermedad ocular que causa ceguera concreta que se está tratando, la gravedad del trastorno y la localización anatómica del trastorno. Se pueden esperar algunas variaciones en la dosificación.

En algunas formas de realización, la administración se efectúa oralmente, o intravascularmente, o intraocularmente, o periocularmente, o a la superficie ocular.

Cuando se administra oftálmicamente a un humano, por ejemplo, de forma intravítrea, la dosificación de un agente de la invención, que incluye, por ejemplo, **Fórmula I**, metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y/o un agente terapéutico activo, es normalmente de 0,003 mg a 5,0 mg por ojo y administración, o de 0,03 mg a 3,0 mg por ojo y administración, o de 0,1 mg a 1,0 mg por ojo y administración. En una forma de realización, la dosificación es 0,03 mg; 0,3 mg; 1,5 mg o 3,0 mg por ojo. En otra forma de realización, la dosificación es 0,5 mg por ojo. La dosificación puede variar de 0,01 mL a 0,2 mL administrados por ojo, o de 0,03 mL a 0,15 mL administrados por ojo, o de 0,05 mL a 0,10 mL administrados por ojo. En una forma de realización, la administración es de 400 µg de compuesto mensualmente durante al menos tres meses.

Generalmente, cuando se administra oralmente a un mamífero, la dosificación de cualquier agente descrito en el presente documento puede ser de 0,001 mg/kg/día a 100 mg/kg/día, de 0,01 mg/kg/día a 50 mg/kg/día, o de 0,1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día. Cuando se administra oralmente a un humano, la dosificación de cualquier agente descrito en el presente documento es normalmente de 0,001 mg a 1000 mg al día, de 1 mg a 600 mg al día, o de 5 mg a 30 mg al día. En una forma de realización, la dosificación oral es 600 mg al día. En una forma de realización, la dosificación oral es de dos dosis de 300 mg al día. En otra forma de realización, la dosificación oral es de 7,5 mg a la semana a 15 mg a la semana.

Para administración de cualquier agente descrito en el presente documento mediante inyección parenteral, la dosificación es normalmente de 0,1 mg a 250 mg al día, de 1 mg a 20 mg al día, o de 3 mg a 5 mg al día. Las inyecciones se pueden poner hasta cuatro veces diarias. Generalmente, cuando se administra oralmente o parenteralmente, la dosificación de cualquier agente descrito en el presente documento es normalmente de 0,1 mg a 1500 mg al día, de 0,5 mg a 10 mg al día, o de 0,5 mg a 5 mg al día. Se puede administrar una dosificación de hasta 3000 mg al día.

En algunas formas de realización puede ser deseable administrar al ojo uno o más de cualquiera de los agentes descritos en el presente documento. La administración puede ser, a modo de ejemplo no limitante, intraocular, intravítrea (que incluye, pero no se limita a, gotas y ungüento), subconjuntival, sub-Tenon, transescleral supracoroidea, subretiniana y mediante iontoforesis.

También se pueden usar otras vías de administración, tales como, por ejemplo: intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, rectal, mediante inhalación, o por vía tópica, concretamente a los oídos, la nariz, los ojos o la piel.

El modo de administración se puede dejar al criterio del facultativo y depende en parte del lugar de la afección médica. En algunos casos, la administración conlleva la liberación de cualquier agente descrito en el presente documento al torrente sanguíneo.

Cualquier agente descrito en el presente documento se puede administrar oralmente. Tales agentes también se pueden administrar mediante otra vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión intravenosa o inyección en bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., la mucosa oral, rectal e intestinal, etc.) y se puede administrar de forma conjunta con otro agente biológicamente activo. La administración puede ser sistémica o local. Se conocen varios sistemas de entrega, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., que se pueden usar para la administración.

Los métodos adicionales de administración incluyen, pero no se limitan a, intraocular, intravítrea, ocular tópica (que incluye, pero no se limita a, gotas, ungüentos e insertos), subconjuntival, sub-Tenon, supracoroidea, transescleral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, rectal, mediante inhalación, o por vía tópica, concretamente a los oídos, la nariz, los ojos o la piel. En algunas formas de realización, se administra al ojo más de uno de cualquiera de los agentes descritos en el presente documento. La administración puede ser, a modo de ejemplo no limitante, intraocular, intravítrea (que incluye, pero no se limita a, gotas y ungüento), subconjuntival, sub-Tenon, transescleral supracoroidea e iontoforesis. El modo de administración se puede dejar al criterio del facultativo y depende en parte del lugar de la afección médica. En la mayoría de los casos, la administración conlleva la liberación al torrente sanguíneo.

En formas de realización específicas, puede ser deseable administrar localmente al área que necesita tratamiento.

En otra forma de realización, la entrega se puede hacer en una vesícula, en concreto un liposoma (véase Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat y col., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989). En otra forma de realización más, la entrega se puede hacer en un sistema de liberación controlada. En una forma de realización, se puede usar un dispositivo intraocular de liberación lenta. En algunas formas de realización, este dispositivo consiste en un líquido, gel, polímero, etc., erosionable o no erosionable de entrega local.

En otra forma de realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véase también Levy y col., 1985, Science 228:190; During y col., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard y col., 1989, J. Neurosurg. 71:105). En otra forma de realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada en las proximidades del área diana que se va a tratar, p. ej., la retina, requiriéndose así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, p. ej., Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Se pueden usar otros sistemas de liberación controlada comentados en la revista Science 249:1527-1533 (1990) de Langer).

La administración de cualquier agente descrito en el presente documento puede ser, independientemente, de una a cuatro veces diarias o de una a cuatro veces al mes o de una a cuatro veces al año o una vez cada dos, tres, cuatro o cinco años. La administración se puede hacer durante una duración de un día o un mes, dos meses, tres meses, seis meses, un año, dos años, tres años e incluso durante toda la vida del sujeto. La administración crónica a largo plazo estará indicada en muchos casos. La dosificación se puede administrar como dosis única o dividida en múltiples dosis. En general, la dosificación deseada se debería administrar a intervalos establecidos durante un periodo prolongado, normalmente al menos a lo largo de varias semanas o varios meses, aunque pueden ser necesarios periodos de administración más largos, de varios meses o años o más.

El régimen de dosificación utilizando un agente descrito en el presente documento se puede seleccionar de acuerdo con una variedad de factores que incluyen el tipo, la especie, la edad, el peso, el sexo y el estado médico del sujeto; la severidad de la afección que se va a tratar; la vía de administración; la función renal o hepática del sujeto; la constitución farmacogenómica del individuo y el compuesto de la invención específico empleado. Cualquier agente descrito en el presente documento se puede administrar en una dosificación diaria única, o se puede administrar la dosificación diaria total en dosis divididas de dos, tres, o cuatro veces al día. Asimismo, cualquier agente descrito en el presente documento se puede administrar de forma continua, en lugar de intermitentemente, durante todo el régimen de dosificación.

Métodos de tratamiento

En varios aspectos, la presente invención contempla un método de tratamiento o prevención de la DMAE seca y/o RPD. En estos aspectos, el «agente de la invención» comprende compuestos útiles tanto para monoterapia como

para terapia combinada (p. ej., como un agente terapéutico adicional). En general, la monoterapia comprende el uso de compuestos de **Fórmula I**, metotrexato, o sus sales farmacéuticamente aceptables; mientras que la terapia combinada comprende compuestos de **Fórmula I**, metotrexato, o sus sales farmacéuticamente aceptables en combinación con un agente terapéutico adicional, incluyendo uno o más de entre un agente anti-VEGF, un inhibidor de ACE, un agonista de PPAR-gamma, un inhibidor de renina, un esteroide, un agente que modula la autofagia, un modulador de PPAR gamma, semapimod, un inhibidor de MIF, un inhibidor de CCR2, CKR-2B, un 2-tioimidazol, CAS 445479-97-0, CCX140, clodronato, una preparación de clodronato liposomal o cloruro de gadolinio.

Una evaluación de cualquiera de los tratamientos descritos en el presente documento puede comprender el diagnóstico por imágenes, incluyendo, a modo de ejemplo no limitante, cSLO, FAF, OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal), SD-OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal) u otras modalidades de diagnóstico por imágenes que incluyen otras longitudes de onda de fluorescencia (p. ej., longitudes de onda que varían del azul al infrarrojo, p. ej., de 390 nm a 1 mm, incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz blanca, la luz anérita, el infrarrojo cercano o el infrarrojo).

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la reducción de la cantidad de pseudodrusas en el sujeto y/o la reducción de la cantidad de pseudodrusas en el área foveal, el área perifoveal, el área yuxtafoveal o el área extrafoveal del ojo del sujeto. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la reducción de las velocidades de progresión a enfermedad tardía, donde la enfermedad tardía es neovascularización coroidea o atrofia geográfica. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la reducción de las velocidades de expansión de la atrofia geográfica.

Los métodos de tratamiento descritos en el presente documento pueden comprender el tratamiento, la prevención, o la reducción de la velocidad de patogénesis de la DMAE seca y/o RPD.

Métodos de evaluación de compuestos

En algunos aspectos, se desvela un método para identificar si un compuesto candidato es útil para el tratamiento de una enfermedad ocular que causa ceguera, que comprende (a) la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de ensayo a un animal cuyo ojo comprende (i) un compuesto fluorescente en una cantidad efectiva para indicar la presencia de una enfermedad ocular que causa ceguera en el animal y (ii) una toxina en una cantidad efectiva para inducir atrofia de tejido ocular; (b) la exposición del ojo a luz de una longitud de onda e intensidad efectivas para provocar que el compuesto fluorescente exhiba fluorescencia; (c) la comparación del patrón de fluorescencia ocular con un patrón de fluorescencia del ojo de un animal que comprende el compuesto fluorescente y la toxina pero no el compuesto de ensayo; y (d) selección del compuesto de ensayo como un compuesto candidato si el resultado de la comparación de la etapa (c) indica que el compuesto de ensayo es útil para el tratamiento de una enfermedad ocular que causa ceguera. La etapa (b) comprende la exposición del ojo a luz de longitud de onda e intensidad efectivas para provocar que el compuesto fluorescente exhiba fluorescencia, tanto si se realiza a la vez que la administración del compuesto fluorescente como si es posterior a la administración del compuesto fluorescente.

La comparación se puede producir al menos aproximadamente 24 horas, o al menos aproximadamente 7 días, o al menos aproximadamente 30 días, o al menos aproximadamente 60 días, o al menos aproximadamente 90 días después de la administración del compuesto de ensayo. La comparación se puede producir al menos aproximadamente 2 meses, o aproximadamente 3 meses, o aproximadamente 4 meses, o aproximadamente 5 meses, o como máximo aproximadamente 6 meses. La comparación puede comprender la observación del ojo del mismo animal antes y después de la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de ensayo. La comparación puede comprender la observación del ojo de diferentes animales en diferentes condiciones (p. ej., con o sin administración de una cantidad efectiva de un compuesto de ensayo).

Los métodos pueden comprender además la etapa de observación del ojo antes de la administración del compuesto de ensayo. Esta observación puede determinar una o más características del ojo pre-administración.

La comparación y/o la observación pueden comprender la evaluación del diagnóstico por imágenes, incluyendo, a modo de ejemplo no limitante, cSLO, FAF, OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal), SD-OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal) u otras modalidades de diagnóstico por imágenes que incluyen otras longitudes de onda de fluorescencia (p. ej., longitudes de onda que varían del azul al infrarrojo, p. ej., de 390 nm a 1 mm, incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz blanca, la luz anérita, el infrarrojo cercano o el infrarrojo), entre dos condiciones diferentes (p. ej., con o sin administración de una cantidad efectiva de un compuesto de ensayo).

Un agente puede ser útil para el tratamiento de una enfermedad ocular que causa ceguera si proporciona tratamiento, prevención o reducción de la velocidad de patogénesis de una enfermedad ocular que causa ceguera.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la administración del compuesto fluorescente antes de la administración del compuesto de ensayo. Los métodos descritos en el presente documento podrían no comprender la administración de (i) una cantidad adicional de compuesto fluorescente al animal o (ii) un segundo compuesto fluorescente al animal.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender la administración de la toxina antes de la administración del compuesto de ensayo y/o la administración de la toxina antes de la administración del compuesto fluorescente.

Se puede identificar una pluralidad de compuestos candidatos. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además la comparación de la utilidad de la pluralidad de compuestos candidatos en el tratamiento de una enfermedad ocular que causa ceguera y la selección de un compuesto principal en base a la comparación. Un compuesto principal puede ser un compuesto preferido entre una pluralidad de compuestos candidatos.

La comparación puede comprender la evaluación del diagnóstico por imágenes ópticas, incluyendo, a modo de ejemplo no limitante, cSLO, FAF, OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal), SD-OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal) u otras modalidades de diagnóstico por imágenes que incluyen otras longitudes de onda de fluorescencia (p. ej., longitudes de onda que varían del azul al infrarrojo, p. ej., de 390 nm a 1 mm, incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz blanca, la luz anérita, el infrarrojo cercano o el infrarrojo), entre dos condiciones diferentes (p. ej., con un primer compuesto candidato frente a un segundo compuesto candidato). Se pueden comparar más de dos compuestos candidato.

Métodos diagnósticos y predictivos

En algunos aspectos, la invención proporciona un método para identificar a un sujeto que padece una enfermedad ocular que causa ceguera y que es más probable que responda al tratamiento con un agente que comprende la determinación de si el ojo del sujeto tiene, o ha tenido anteriormente, un aumento (incluyendo un aumento transitorio) de permeabilidad a través de la barrera epitelial entre una coroides y una retina del ojo con respecto a un estado sano; donde el aumento de permeabilidad indica que es más probable que el sujeto responda al tratamiento con el agente; y donde el agente se selecciona de entre metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y/o un compuesto de **Fórmula I** (tal y como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_1 y R_2 son independientemente H o un alquilo C_1-C_6 y R_3 es H o un alquilo C_1-C_6 .

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar a un sujeto que padece una enfermedad ocular que causa ceguera y que es más probable que responda al tratamiento con un agente, que comprende la determinación de si el ojo del sujeto tiene una presencia (p. ej., una afluencia) de células inmunitarias fagocíticas a lo largo de un EPR (y/o desde la retina interna) con respecto a un estado sano; donde la presencia de células inmunitarias fagocíticas indica que es más probable que el sujeto responda al tratamiento con el agente; y donde el agente se selecciona de entre metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y/o un compuesto de **Fórmula I** (tal y como se describe en el presente documento) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R_1 y R_2 son independientemente H o un alquilo C_1-C_6 y R_3 es H o un alquilo C_1-C_6 .

En otro aspecto, se desvela un método para determinar si una enfermedad ocular que causa ceguera en un sujeto es sensible al tratamiento con un agente que inhibe la función de las células inmunitarias de un sujeto, que comprende la detección de una presencia, la detección de una ausencia o la medición de una cantidad de células inmunitarias en el ojo del sujeto, donde el ojo del sujeto exhibe fluorescencia en respuesta a luz de una longitud de onda de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 900 nm, o de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 1600 nm.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un compuesto fluorescente, donde la detección o medición se produce al menos un día después de la administración del compuesto fluorescente. La detección o medición se pueden producir al menos un día después de la administración al sujeto de una cantidad efectiva de un compuesto fluorescente.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender DNIRA para determinar si una enfermedad ocular que causa ceguera en un sujeto es sensible al tratamiento con un agente que inhibe la función de las células inmunitarias de un sujeto.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además la etapa de detección o medición mediante FAF en el ojo del sujeto. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además la

etapa de correlación de un patrón de FAF con la presencia, ausencia o cantidad de células inmunitarias en el ojo del sujeto. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender una correlación entre los datos de FAF y DNIRA. La correlación puede ser de los patrones espaciales observados en FAF y la fluorescencia del ojo del sujeto en respuesta a luz de una longitud de onda de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 900 nm, o de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 900 nm, o de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 1600 nm.

Las áreas de FAF hiperfluorescentes o los patrones de FAF anómalos pueden coincidir espacialmente con áreas de DNIRA anómalas, que pueden ser hipofluorescentes o hiperfluorescentes. Puesto que la FAF anómala o FAF hiperfluorescente coincide con áreas de actividad de la enfermedad y puede predecir áreas de atrofia, sin querer ceñirnos a la teoría, cuando el DNIRA marca el EPR y coincide espacialmente con la FAF hiperfluorescente o FAF anómala, las células fagocíticas del EPR que ingieren colorante (por ejemplo, ICG) tienen cantidades anómalas de lipofusina o material similar a la lipofusina. Además, sin querer ceñirnos a la teoría, cuando el DNIRA marca células inmunitarias (p. ej., células inmunitarias fagocíticas o células del sistema inmunitario innato) y coincide espacialmente con la FAF hiperfluorescente o FAF anómala, las células inmunitarias fagocíticas que ingieren un colorante (por ejemplo, ICG) tienen cantidades anómalas de lipofusina o material similar a la lipofusina y/o coinciden con células que tienen cantidades anómalas de lipofusina o material similar a la lipofusina. Por lo tanto, la colocalización de FAF anómala y DNIRA anómala puede identificar dianas celulares para terapia. Tal colocalización puede proporcionar, tanto en modelos animales como en pacientes, la capacidad de direccionamiento del sistema inmunitario para reducir, ralentizar o prevenir la progresión de la enfermedad.

La detección o medición se puede producir aproximadamente un día, o aproximadamente siete días, o aproximadamente treinta días después de la administración del compuesto fluorescente. La comparación también se puede producir al menos aproximadamente 2 meses, o aproximadamente 3 meses, o aproximadamente 4 meses, o aproximadamente 5 meses, o como máximo aproximadamente 6 meses. La comparación puede comprender la observación del ojo del mismo animal antes y después de la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de ensayo. La comparación puede comprender la observación del ojo de diferentes animales en diferentes condiciones (p. ej., con o sin administración de una cantidad efectiva de un compuesto de ensayo).

La comparación puede comprender la evaluación del diagnóstico por imágenes, incluyendo, a modo de ejemplo no limitante, cSLO, FAF, OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal), SD-OCT (incluyendo con visualización de secciones transversales, tridimensional o frontal) u otras modalidades de diagnóstico por imágenes que incluyen otras longitudes de onda de fluorescencia (p. ej., longitudes de onda que varían del azul al infrarrojo, p. ej., de 390 nm a 1 mm, incluyendo, por ejemplo, la luz azul, la luz blanca, la luz aneja, el infrarrojo cercano o el infrarrojo), entre dos condiciones diferentes (p. ej., con o sin administración de una cantidad efectiva de un compuesto de ensayo).

Los métodos descritos en el presente documento podrían no comprender la administración adicional de (a) una cantidad adicional del compuesto fluorescente o (b) un segundo compuesto fluorescente.

Sujetos y/o animales

En algunas formas de realización, el sujeto y/o animal es un mamífero, p. ej., un humano, un ratón, una rata, un conejillo de indias, un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, un conejo, una oveja, o un primate no humano, tal como un mono, un chimpancé o un babuino. En otras formas de realización, el sujeto y/o animal no es un mamífero, tal como, por ejemplo, un pez cebra. En algunas formas de realización, el sujeto y/o animal puede comprender células marcadas fluorescentemente (con, p. ej., GFP). En algunas formas de realización, el sujeto y/o animal es un animal transgénico que comprende una célula fluorescente, tal como, por ejemplo, una célula del EPR y/o una célula inmunitaria. En algunas formas de realización, el sujeto y/o animal es un humano. En algunas formas de realización, el humano es un humano pediátrico. En otras formas de realización, el humano es un humano adulto. En otras formas de realización, el humano es un humano geriátrico. En otras formas de realización, se puede hacer referencia al humano como un paciente.

En ciertas formas de realización, el humano tiene una edad en un intervalo que varía desde aproximadamente 0 meses hasta aproximadamente 6 meses de edad, desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 12 meses de edad, desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 18 meses de edad, desde aproximadamente 18 hasta aproximadamente 36 meses de edad, desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 años de edad, desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10 años de edad, desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 15 años de edad, desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 20 años de edad, desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 25 años de edad, desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 30 años de edad, desde aproximadamente 30 hasta aproximadamente 35 años de edad, desde aproximadamente 35 hasta aproximadamente 40 años de edad, desde aproximadamente 40 hasta aproximadamente 45 años de edad, desde aproximadamente 45 hasta aproximadamente 50 años de edad, desde aproximadamente 50 hasta

aproximadamente 55 años de edad, desde aproximadamente 55 hasta aproximadamente 60 años de edad, desde aproximadamente 60 hasta aproximadamente 65 años de edad, desde aproximadamente 65 hasta aproximadamente 70 años de edad, desde aproximadamente 70 hasta aproximadamente 75 años de edad, desde aproximadamente 75 hasta aproximadamente 80 años de edad, desde aproximadamente 80 hasta aproximadamente 85 años de edad, desde aproximadamente 85 hasta aproximadamente 90 años de edad, desde aproximadamente 90 hasta aproximadamente 95 años de edad o desde aproximadamente 95 hasta aproximadamente 100 años de edad.

En otras formas de realización, el sujeto es un animal no humano y, por lo tanto, la invención se refiere al uso veterinario. En una forma de realización específica, el animal no humano es una mascota doméstica. En otra forma de realización específica, el animal no humano es un animal de ganadería.

En varias formas de realización, el ojo de un sujeto y/o un animal comprende (i) un compuesto fluorescente en una cantidad efectiva para indicar la presencia de una enfermedad ocular que causa ceguera en el sujeto y/o animal y (ii) una toxina en una cantidad efectiva para inducir atrofia del tejido ocular. En algunas formas de realización, se administra un agente de la invención o no se administra un agente de la invención a tal sujeto y/o animal.

En varias formas de realización, se evalúan y/o efectúan células inmunitarias y del EPR. En algunas formas de realización, las células inmunitarias incluyen células del sistema inmunitario innato de un sujeto y/o animal. En algunas formas de realización, tales células incluyen, pero no se limitan a, macrófagos, monocitos y células de la microglía. En varias formas de realización, la invención contempla la detección de una presencia, la detección de una ausencia, o la medición de una cantidad de células inmunitarias en el ojo de un sujeto y/o animal. Kits

Se desvelan kits que pueden simplificar la administración de cualquier agente descrito en el presente documento. Un kit ejemplar comprende cualquier agente descrito en el presente documento en forma de dosificación unitaria. La dosificación unitaria puede ser un recipiente, tal como una jeringa previamente llena, que puede ser estéril, que contiene cualquier agente descrito en el presente documento y un portador, diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente estable. El kit puede contener además una etiqueta o instrucciones impresas que informen del uso de cualquier agente descrito en el presente documento. El kit también puede incluir un espéculo de párpados, un anestésico tópico y un agente limpiador de la superficie ocular. El kit también puede contener uno o más agentes adicionales descritos en el presente documento.

El kit puede comprender un recipiente que contenga una cantidad efectiva de un agente de la invención, incluyendo, por ejemplo, un compuesto de **Fórmula I**, metotrexato o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y una cantidad efectiva de otro agente terapéutico, tal como los descritos en el presente documento.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Los ejemplos que caen fuera del alcance de las reivindicaciones se proporcionan solo con fines ilustrativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: La inyección sistémica de la toxina del EPR, NaIO_3 , induce patrones de FAF complejos similares a los de la DMAE y/o RPD

La toxina del EPR, yodato sódico (NaIO_3) generó una pérdida irregular de EPR y un DNIRA hipofluorescente en el ojo de rata similares a la atrofia geográfica (GA). Este modelo no solo desarrolló atrofia del EPR, sino que reprodujo fielmente complejos patrones de FAF asociados a enfermedad clínica agresiva, muy parecidos a la DMAE seca avanzada, la RPD y las formas de goteo difuso de la DMAE seca.

Materiales: la ICG (Cardiogreen), el yodato sódico y la hematoxilina-eosina de Harris fueron de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canadá). La tropicamida, 0,8 %, en solución de clorhidrato de fenilefrina (Diophenyl-T) al 5 % fue de Sandoz Canada Inc (Boucherville, QC, Canadá) y las gotas oculares lubricantes GenTeal fueron de Novartis Pharmaceuticals Canada Inc (Dorval, QC, Canadá). El paraformaldehído, al 32 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS), fue de Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA). El anticuerpo de ratón anti-rata CD68 fue de AbD Serotec (Oxford, Reino Unido), y la IgG de ratón fue de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE. UU.). El anticuerpo de conejo anti-Iba-1 fue de Wako Pure Chemical Industries Ltd (Osaka, Japón). El anticuerpo secundario de cabra anti-ratón fluorescente marcado con Alexa, los conjugados de isolectina IB₄ y el tinte de ácidos nucleicos TO-PRO-3 fueron de Invitrogen (Camarillo, CA, EE. UU.). El medio de montaje fluorescente Dako fue de Dako North America (Burlington, ON, Canadá).

Procedimientos animales: todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con el Consejo Canadiense de Protección a los Animales y de conformidad con la *Declaración para el uso de animales en investigación oftálmica y visual de la ARVO*. Para todos los experimentos, se mantuvieron ratas Sprague Dawley (SD) de 6-10 semanas de

edad bajo un ciclo de 12 horas de oscuridad/luz, con comida y agua a voluntad. Para su evaluación, se anestesiaron las ratas con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) y se dilataron sus pupilas con Diophenyl-T. Se acondicionaron los ojos usando gotas oculares lubricantes GenTeal. Los animales se sacrificaron con humanidad mediante inyección intracardiaca de T61 (Intervet Canada, Whitby, Canadá), bien tras una única sesión de diagnóstico por imágenes, bien tras diagnósticos por imágenes en serie.

Se preparó una solución de yodato sódico (solución al 45 %) fresca para cada grupo de experimentos en cloruro sódico al 0,9 % y se inyectó a una concentración final de 45 mg/kg de peso corporal. Se evaluaron 192 ojos en total.

El diagnóstico por imágenes del fondo del ojo se realizó usando un oftalmoscopio láser de barrido confocal disponible en el mercado, (cSLO, Spectralis, Heidelberg Retinal Angiography, HRA-II; Heidelberg Engineering GmbH, Alemania) y el sistema de captura de imágenes Eye Explorer, versión 1.1.10. Las imágenes se capturaron a una longitud de onda de 488 nm de excitación con un filtro barrera de 500 nm para la angiografía con fluoresceína, sin el filtro barrera para el diagnóstico por imágenes con luz aneritra (RF, verde dominante), a 795/810 nm de excitación/emisión para la angiografía con ICG y con un láser de 830 nm para el diagnóstico por imágenes mediante reflectancia en el infrarrojo.

Para evaluar la FAF a 488 nm, se realizó el diagnóstico por imágenes mediante cSLO en ausencia de colorante de fluoresceína. No se administró fluoresceína en el punto de referencia ni en ningún momento durante cada estudio. En los casos en que era necesario obtener imágenes de la vasculatura y, simultáneamente, proporcionar puntos de referencia para el análisis de las imágenes de FAF, se inyectó ICG a través de la vena caudal, con una concentración de 2 o 5 mg/kg, mediante un catéter de calibre 23 previamente introducido en la vena caudal. En un pequeño número de situaciones claramente indicadas, tal como en la caracterización inicial del modelo, se suministró fluoresceína-dextrano (200 kD) intravenosamente. Los resultados de estos últimos estudios usando angiografía con fluoresceína se realizaron en un subgrupo de animales y no se incluyeron en el análisis de la FAF.

Se obtuvieron imágenes del fondo del ojo sistemáticamente en el punto de referencia (día 0, es decir, antes de la inyección sistémica de NaIO_3) y en los días 3 o 4 (3/4), los días 7 u 8 (7/8) y los días 13 o 14 (13/14) posteriores a la inyección de NaIO_3 . Además, para la caracterización inicial del modelo, se obtuvieron imágenes 24 horas después de la administración de NaIO_3 , en los días 21 a 28 y pasados 88 días (3 meses). Cuando fue posible, las imágenes compuestas consistieron en al menos nueve imágenes tomadas en el siguiente orden: cabeza del nervio óptico, superior derecha, derecha, inferior derecha, inferior, inferior izquierda, izquierda, superior izquierda y los campos superiores. En algunos casos, se obtuvo un segundo o tercer anillo completo o parcial de imágenes de forma más periférica, habitualmente mediante realineación del animal con respecto a la cSLO según fuera necesario. Por el contrario, en otros casos, en los que no se podían capturar las nueve imágenes completas, se generó una imagen compuesta parcial.

Se obtuvieron imágenes OCT de dominio espectral de alta resolución (Envisu R2200 VHR Animal SDOIS System, Bioptogen, EE. UU.). Los barridos se obtuvieron a una velocidad de 36 000 por segundo, con una resolución lateral de aproximadamente 2,8 μm al nivel de la retina.

Análisis de tejidos: se realizó tinción de hematoxilina-eosina (H&E) de tejido integrado en parafina, tal y como se sabe en la técnica, tras fijación con fijador de Davidson. Las secciones integradas en parafina se visualizaron con un microscopio vertical Nikon E800. Se siguió el procedimiento de desparafinación y rehidratación como en el procedimiento de tinción H&E.

Para la inmunohistoquímica, se bloquearon secciones en un 5 % de BSA en TBS a temperatura ambiente y se incubaron durante la noche con anticuerpo anti-CD68 a 4 °C, con agitación suave. Después de enjuagarlas, se incubaron las muestras con anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente y se volvieron a lavar. Para el control negativo se usó IgG de las mismas especies a concentraciones molares máximas equivalentes a las del anticuerpo primario. Los núcleos se contratiñeron con TO-PRO-3.

Microscopía fluorescente y confocal: se obtuvieron imágenes usando un microscopio fluorescente confocal TCS SL (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Alemania) y se capturaron y analizaron las imágenes usando el software para microscopía confocal de Leica. También se usó un microscopio de epifluorescencia vertical (Olympus BX50) para visualizar las señales autofluorescentes de las células bajo luz de longitud de onda 488 nm. Se realizaron reconstrucciones 3D de secciones z confocales en serie usando el software de Imaris versión 7.4.2 (Bitplane).

El diagnóstico por imágenes mediante angiografía y FAF *in vivo* del ojo de ratas Sprague Dawley normal producía un brillo de vidrio esmerilado débil y homogéneo, interrumpido por vasos sanguíneos de la retina dispuestos radialmente que bloqueaban la fluorescencia del EPR y, por lo tanto, tenían un aspecto oscuro, y por un círculo hipofluorescente central en la cabeza del nervio óptico (ONH), donde no había EPR (**FIG. 1**). Tres días después de la inyección sistémica de NaIO_3 , aparecía una única área de FAF iso- o ligeramente hiperfluorescente con bordes

hiperfluorescentes y tomaba la forma de una isla, un sector o un anillo de 360° totalmente diferenciados (**FIG. 1**). Las islas o los sectores se localizaban de forma consistente en la parte inferior del ONH o en la hemirretina inferior (**FIG. 1**). Cuando está presente un anillo de 360°, habitualmente abarca gran parte del fondo del ojo, con un borde adyacente, que rodea, a la ONH y el otro en la periferia de media a lejana de la retina. La forma más habitualmente observada fueron anillos de 360° grandes, que se producían en 102/110 (93 %) de los ojos tratados con yodato sódico (**FIG. 2**). En todos los casos, las islas, los sectores o los anillos estaban próximos a la ONH, pero no eran contiguos a ella (**FIG. 1-3**). Estas y las siguientes informaciones se confirmaron en más de 160 ojos.

Comenzando aproximadamente 4-5 días después de la inyección de NaIO_3 , aparecía un marcado patrón reticular o curvilíneo de FAF hiper/hipofluorescente alternante en el interior de las islas, los sectores o los anillos (**FIG. 1**). En el día 7, este patrón era pronunciado. En lesiones pequeñas, llenaba completamente la isla o el sector y emergía rápidamente. En los anillos de 360° grandes, al principio era pronunciado en los bordes proximal y distal y seguía apareciendo durante las semanas siguientes, en las que sus componentes curvilíneos contribuían a patrones de FAF de bucles, óvalos, círculos, rosetas, festoneados o con forma de «huella de animal» (**FIG. 2**). En algunas regiones, las formas curvilíneas, redondas u ovales confluyen y parecen más oscuras que las áreas circundantes, con aspecto de parches homogéneos de color gris oscuro de FAF hipofluorescente. Con el tiempo, el patrón de fluorescencia reticular hiperfluorescente maduraba *in situ*, haciéndose más granular y menos finamente curvilíneo (**FIG. 2**). Sin embargo, incluso tan tarde como a las 20 semanas, el último momento puntual analizado, los bordes retenían su patrón reticular hiperfluorescente y seguían avanzando hacia la periferia de la retina.

La angiografía con fluoresceína realizada en un subgrupo de animales confirmó que el patrón reticular no corresponde a la vasculatura retiniana o coroidea (cabe señalar que, a menos que se indique, no se administró fluoresceína-dextrano, un colorante que emite a 488 nm, a animales que habían sido sometidos a diagnóstico por imágenes mediante FAF) (**FIG. 1**). Sin embargo, la angiografía con IGC reveló un cambio de permeabilidad que se producía en la interfaz coroides-retina, a lo largo del EPR y la BM, aproximadamente dos o tres días después de la administración de NaIO_3 , hecho que coincide con la aparición, tanto espacialmente como temporalmente, de las islas o sectores de anillos de FAF (**FIG. 1**). Este aumento de permeabilidad fue transitorio y se resolvió en el Día 7, el siguiente momento temporal evaluado de forma rutinaria. Los vasos retinianos no presentaron fugas. En el modelo de NaIO_3 , la tinción H&E confirma que se acumula fluido en el espacio subretiniano. Esto también se observó mediante OCT de ultra alta resolución *in vivo*.

Para determinar la correlación patológica del patrón de FAF observado *in vivo*, se visualizaron preparaciones completas de retina extirpada, con una magnificación baja, tanto bajo luz blanca como mediante microscopía epifluorescente a 488 nm, la misma longitud de onda usada para el diagnóstico por imágenes *in vivo*, sin marcado IHC fluorescente. Dependiendo de los análisis de tejido posteriores, se usaron dos microscopios para este fin: un dispositivo epifluorescente con una ventana de excitación/emisión estrecha (488/520 nm), y el sistema de visualización invertido Leica DM IRE2 de un microscopio confocal con una lámpara de arco de mercurio y un filtro de paso largo (mejor que de paso banda) que proporcionaba fluorescencia desde más de 515 nm tras la excitación con una banda de 450-490 nm. Bajo luz blanca, la retina normal de rata parece bastante homogénea en su totalidad, con alguna deformación debida a la intervención humana (**FIG. 3A**). Por el contrario, se hace evidente un sutil patrón reticular blanquecino y fino en las muestras obtenidas 7 días después de la inyección de NaIO_3 . En el día 14, este patrón es más aparente y se vio que correspondía a pequeños pliegues de la retina externa, que se ilustran mejor en el borde de corte de la retina (**FIG. 3B**). Si se visualiza bajo luz fluorescente a 488 nm, este mismo patrón curvilíneo es aparente. Aunque es aparente en el día 7 posterior a la inyección, el aumento de fluorescencia hace que este patrón sea más visible en el Día 14 (**FIG. 3C**). Usando microscopía epifluorescente con una mayor magnificación, se demostró que este patrón reticular con forma de encaje coincide con la distribución espacial de células autofluorescentes que parecen alinearse con las ranuras o pliegues de la retina externa (**FIG. 3**).

La **FIG. 4** muestra una comparación de las características clínicas de la RPD con los hallazgos de tejido en el modelo de NaIO_3 . Además del diagnóstico por imágenes clínico mediante OCT del paciente con RPD (este muestra una estructura piramidal con la base hacia abajo en el espacio subretiniano), se obtuvieron imágenes del fondo del ojo en color y aneiritas (**FIG. 4**). Las imágenes aneiritas mostraron pequeñas manchas oscuras que constituían pseudodrusas individuales de RPD (**FIG. 4A**, imagen superior). Estas se identificaron usando solapamiento gris oscuro. Además, destacamos, circunscrita por círculos, la presencia de las denominadas «lesiones diana» que caracterizan la RPD. Estas tienen el aspecto de manchas oscuras con centros más claros. En paralelo, una ilustración esquematizada de retina externa de rata plegada, tanto en la sección frontal como en la transversal, que, cuando se colorea de forma artificial y se presenta como imágenes en blanco y negro, tanto «positivas» como «negativas», parece tener una correlación directa con lesiones similares a la diana y halos de RPD. En conjunto, estos datos sugieren que los patrones 2D de pseudodrusas oscuras presentes en un patrón reticular o con forma de encaje de círculos, halos y lesión diana con centros oscuros visualizadas de frente, en 2D, corresponden a anillos y cráteres elevados, considerados volumétricamente, en 3D. La matriz entre pseudodrusas consiste en cordones de inflamación subretiniana persistente que, cuando se observan en secciones transversales mediante OCT tienen aspecto de pirámides o puntas. La retina externa perdida entre estas estructuras parece oscura. Esto sitúa las

pseudodrusas definidas mediante OCT adyacentes a los parches oscuros de RPD. Sin querer ceñirnos a la teoría, esta correlación con la deformidad estructural de la retina también explica por qué la RPD se puede visualizar en diferentes modalidades de diagnóstico por imágenes y no se limita a una única longitud de onda concreta, tal como 488 nm, tal como ocurriría si la señal dependiera del fluoróforo.

Ejemplo 2: El DNIRA de un ojo de rata tras administración sistémica de ICG identifica la capa de epitelio pigmentario retiniano (EPR) *in vivo*

Se demuestra que un colorante que emite en el infrarrojo cercano, ICG, puede marcar el EPR/la retina externa tras su inyección sistémica y, de ese modo, mejorar la detección del EPR y la atrofia del EPR. El cambio observado en el DNIRA usando filtros de excitación/emisión de ICG es útil, en lugar de la FAF, en determinados modelos de enfermedad para identificar áreas de pérdida de EPR/retina externa.

Se inyectó el colorante ICG, o PBS, sistémicamente en 46 ratas Sprague Dawley en dosis de 0,35 y 5,0 mg/kg y se evaluó el fondo del ojo *in vivo* usando oftalmoscopia láser de barrido confocal (cSLO), con filtros de excitación/emisión de 795/810 nm, antes de la inyección y en los días 2, 7 y 21 posteriores a ella. Se realizó electroretinografía (ERG) para evaluar la toxicidad potencial. En un subgrupo de animales, se inyectó una toxina del EPR para inducir pérdida o daño del EPR.

Concretamente, para los estudios en animales, los animales se manipularon de acuerdo con las directrices de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) para uso humanitario de animales en investigación oftalmológica, y de acuerdo con las directrices del comité de atención veterinaria del hospital St. Michael. Se mantuvieron 46 ratas Sprague Dawley (SD), de 6-10 semanas de edad y con un peso de 200-300 g bajo un ciclo de 12 horas de oscuridad/luz, con comida y agua a voluntad. Se anestesiaron los animales con una combinación de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) y se dilataron sus pupilas con una sola gota de solución de tropicamida al 0,8 % en clorhidrato de fenilefrina al 5 % (Diophenyl-T, Sandoz Canada Inc.). Se aplicaron gotas oculares lubricantes GenTeal (Novartis, Canadá) a la superficie de la córnea en repetidas ocasiones durante todos los procedimientos.

CSLO: se obtuvieron imágenes *in vivo* usando sistemas cSLO disponibles en el mercado (Heidelberg Retinal Angiography, HRA-2, Heidelberg Engineering, Alemania). Se obtuvieron imágenes en el canal aneritro, FAF (excitación/emisión a 488/500 nm), en el canal NIR (830 nm) y en el canal ICG (excitación/emisión a 795/810 nm).

Angiografía con fluoresceína e ICG: se preparó un colorante de ICG (Cardiogreen, Sigma, n.º de cat. I2633) fresco antes de la realización de los experimentos con una concentración final de solución madre de 5,0 mg/kg. Se introdujo un catéter de calibre 23 en la vena caudal y se infundió el colorante ICG en dosis de 0,35 o 5,0 mg/kg. Se tomaron imágenes antes de la inyección (punto de referencia), durante la circulación del colorante y en varios intervalos posteriores a los 20 minutos. En un subgrupo de animales, se inyectó solución de fluoresceína-dextrano (200 kD) (Sigma, n.º de cat. FD2000S), con una concentración de 5,0 mg/kg, de forma intravenosa a través del catéter de la vena caudal para conseguir una dosis final de 5,0 mg/kg. Las angiografías con ICG y fluoresceína se realizaron simultáneamente solo en un subgrupo de animales, en el resto no se inyectó fluoresceína. Se obtuvieron imágenes angiográficas en los canales de la ICG y la fluoresceína con filtros de excitación/emisión de 488/500 nm y 795/810 nm, respectivamente. A los animales control se les administró PBS.

DNIRA: se obtuvieron imágenes de DNIRA en los días y las semanas posteriores a la inyección de ICG usando los parámetros para angiografía con ICG, es decir, con filtros de excitación/emisión, pero sin reinyección de colorante a las 24 horas, 48 horas, los 3 días, 7 días, 21 días y 28 días después de la angiografía. No se volvió a realizar angiografía durante el curso temporal del estudio.

Administración de toxina: en un subgrupo de animales (n = 7), se inyectó la toxina del EPR NaIO₃ (Sigma, n.º de cat. 424064) sistémicamente, a través de un catéter 23G introducido en la vena caudal, con una dosificación de 45 mg/kg de peso corporal. En estos animales, se realizó la angiografía con ICG en una concentración de 0,35 mg/kg inmediatamente antes de la inyección de NaIO₃. Se realizó DNIRA 7 días después de la inyección de ICG y NaIO₃.

Electroretinografía (ERG): se evaluaron los animales a los que se administró ICG o PBS usando el sistema de ERG con estimuladores mini-Ganzfeld Epsilon (DiagnosysLLC, EE. UU.). Después de la anestesia, se colocaron los animales en una almohadilla térmica eléctricamente silenciosa y se colocaron electrodos de bobina de oro en la superficie de la córnea tras la aplicación de las gotas lubricantes GenTeal. Tras una corta serie de destellos tenues (0,01 candelas s/m²; 1,0 Hz), se evaluó una amplitud de onda b escotópica usando un único destello brillante (3 candelas s/m²) que previamente habíamos determinado que producía una respuesta próxima a la amplitud máxima de la onda b. Se usó la prueba t de Student para comparar las amplitudes posteriores a la inyección con la del punto de referencia (antes de la inyección).

Los análisis estadísticos usaron el análisis de regresión ANCOVA.

Se muestran los hallazgos cSLO representativos en el punto de referencia (pre-ICG) en el ojo de rata Sprague Dawley normal (**FIG. 5**) y, junto con los animales tratados con PBS (**FIG. 6A**), sirvieron como controles normales para todos los experimentos. El diagnóstico por imágenes aneritro (es decir, verde dominante) identificó la cabeza del nervio óptico (ONH) y los vasos sanguíneos radiales de la retina (**FIG. 5A**). También se vieron bajos niveles de señal endógena a longitudes de onda más largas, en el canal NIR (830 nm), y proporcionaron una imagen similar de la ONH y la vasculatura, con cierto diagnóstico por imágenes potencial de los vasos coroideos más profundos que surge gracias a la mayor profundidad de penetración de la luz (**FIG. 5B**). De forma consistente con los estudios en humanos, la FAF tenía un aspecto de débil brillo de vidrio esmerilado con poco detalle, ocultada por los vasos sanguíneos radiales de la retina, y no aparecía en la ONH (**FIG. 5C**). Sin embargo, este brillo difuso es muy débil.

Por el contrario, con los filtros de excitación/emisión del NIR colocados como para angiografía con ICG, se observaba una señal insignificante o no se observaba señal alguna en el ojo antes de la inyección de ICG (**FIG. 5D**). Las líneas de barrido eran evidentes y la vasculatura apenas se detectaba o no se detectaba. Esto se observó en más de 60 ojos. Inmediatamente después de la inyección de ICG, tanto los vasos sanguíneos retinianos como los coroideos (**FIG. 5F**, y **FIG. 5G** segundo panel) se identificaron durante la fase de tránsito y fuera del punto final del experimento, 20 minutos después. La angiografía con fluoresceína confirmó la vasculatura retiniana normal (**FIG. 5E**). En los animales de tipo salvaje SD, no se vio pérdida desde ningún lecho vascular usando ambos fluoróforos.

Aunque las imágenes en el punto de referencia anteriores a la angiografía con ICG no exhibían señal alguna bajo estimulación en el NIR en presencia de filtros de excitación/emisión, las imágenes obtenidas en los días 3, 8, 21 y 28 posteriores a una única inyección en el día 0 ($t = 0$), demostraron una fluorescencia retardada y persistente (**FIG. 5G**). Esto no se observó en experimentos similares realizados después de la angiografía con colorante de angiografía-dextrano y analizadas con los filtros de angiografía con fluoresceína colocados (**FIG. 5H**), donde es visible el mismo nivel bajo de fluorescencia previa a la inyección a lo largo de todo el curso temporal de la investigación. Esto tampoco se produce en ausencia de inyección previa de ICG (**FIG. 6A**). El análisis cualitativo de esta fluorescencia retardada en el NIR tras administración de ICG mostró un patrón de «mosaico» de pequeñas motas en el polo posterior que, visualizadas de frente, son profundas (exteriores) con respecto a los vasos retinianos y ocultan la vista de la vasculatura coroidea, lo que sugiere su localización entre la retina y la coroides. La ONH y el área circumpapilar no exhibieron fluorescencia. Estas características son similares a las de la FAF realizada en pacientes en el espectro azul. Se determinó que el mismo plano del fondo del ojo es óptimo para ambas técnicas de fluorescencia.

Las observaciones hechas usando DNIRA tras inyección de ICG dependían de la dosis (**FIG. 6**). Cuanta más dosificación inicial de ICG se usaba para la angiografía, más brillante era la señal en el NIR. La dosis alta, 5 mg/kg, necesitaba una reducción de la ganancia (sensibilidad) de la cSLO para la obtención de imágenes de calidad adecuada, mientras que la dosis baja (0,35 mg/kg) era menos brillante y necesitaba un aumento de la ganancia para la obtención de imágenes de calidad adecuada. Las imágenes comparativas (**FIG. 6A**, **FIG. 6B** y **FIG. 6C**), tomadas con una ganancia ajustada al mismo nivel demostraron un aumento del brillo sensible a la dosis. En el mismo experimento también se determinó que en el día 28 se observaba el mismo patrón moteado en animales que recibían dosis bajas de ICG (**FIG. 6B**). Por el contrario, en animales que recibían dosis altas de ICG, había una diferencia poco apreciable entre los días 3 y 28 posteriores a la inyección (**FIG. 6C**).

El diagnóstico por imágenes mediante reflectancia en el NIR a 830 nm, sin los filtros de excitación/emisión de 795/810 nm necesarios para la activación de la ICG, no producía los hallazgos de fluorescencia moteada dependiente de la dosis y dependiente del tiempo observados con DNIRA.

Habiendo demostrado que el DNIRA identifica el EPR y/o el complejo retiniano externo, se determinó que el DNIRA se podía usar para identificar anomalías estructurales del EPR. El DNIRA se usó en combinación con la inyección sistémica de la toxina del EPR NaIO_3 . El NaIO_3 es directamente tóxico para las células del EPR y lleva a su pérdida; la apoptosis de los fotorreceptores suprayacentes se produce después. El DNIRA en los días y las semanas posteriores a la inyección de NaIO_3 identificó parches geográficos (espaciales) de hipofluorescencia profunda, evidentes en forma de parches negros en lo que, de lo contrario, sería un fondo continuo de fluorescencia moteada. Estos parches hipofluorescentes estaban unidos mediante un borde definido. Además, a medida que la ganancia de la cSLO aumentaba, una vista más luminosa a través de estos parches permitía la clara visualización del aspecto coroideo en detalle (**FIG. 7**). Los vasos coroideos se identificaban por su complejidad, tamaño variable y patrón no radial con respecto a la ONH. Por el contrario, la capa moteada ocultaba esta vista, pero permitía la visualización en curso de los vasos retinianos suprayacentes. Estos datos eran consistentes con noción de que el DNIRA detecta la capa de EPR/retina externa marcadas con ICG.

Además, se demostró la idoneidad del DNIRA para la experimentación preclínica con estudios de toxicidad. Se realizó electrorretinografía comparando concentraciones de ICG de dosis sistémicas altas y bajas frente a PBS.

Estos datos no mostraron un cambio estadísticamente significativo en la amplitud de la onda b en las tres semanas posteriores a la inyección, en comparación con los cambios observados en los animales control, y demostraron que el DNIRA, en el intervalo de dosis usado, es seguro en estudios preclínicos de enfermedad coriorretiniana. Mientras que la dosis alta es muy superior a la usada clínicamente, la dosis baja es consistente, en gramos/peso corporal, con la dosis usada para el diagnóstico por imágenes tradicional con cámaras de fondo de ojo.

Ejemplo 3: Descubrimiento de compuestos para el tratamiento de enfermedades oculares que causan ceguera

Habiendo establecido un modelo animal de una enfermedad ocular que causa ceguera, se administra un compuesto de ensayo a tal animal.

La presentación de la enfermedad ocular que causa ceguera se determina usando diagnóstico por imágenes *in vivo* que incluye la detección mediante fluorescencia. Se identifica un compuesto candidato mediante observación de la fluorescencia en el ojo en, o después de, un tiempo suficiente para que presente las características de una enfermedad ocular que causa ceguera. Se evalúa la capacidad del compuesto candidato para reducir o eliminar las características de la enfermedad ocular que causa ceguera tal y como se describe en el presente documento.

Ejemplo 4: Evaluación de la actividad de compuestos para enfermedades oculares que causan ceguera

Habiendo desarrollado un modelo animal de una enfermedad ocular que causa ceguera, se administra un compuesto candidato a tal animal.

La presentación de la enfermedad ocular que causa ceguera se determina usando diagnóstico por imágenes *in vivo* que incluye la detección mediante fluorescencia. Se evalúa la actividad de un compuesto candidato mediante observación de la fluorescencia en el ojo en, o después de, un tiempo suficiente para que presente las características de una enfermedad ocular que causa ceguera y la actividad de un compuesto candidato. Se puede evaluar la capacidad del compuesto candidato para reducir o eliminar las características de la enfermedad ocular que causa ceguera tal y como se describe en el presente documento.

Ejemplo 5: Tratamiento de la DMAE seca con bindarit

Los sujetos humanos de 56 a 100 años de edad o más, presentan DMAE seca, tal y como se diagnostica mediante una o más de las siguientes pruebas clínicas: examen clínico, FAF (a cualquier longitud de onda), fotografía en el infrarrojo cercano y/o el canal aneritro, angiografía con fluoresceína, que permite la identificación y localización de procesos vasculares anómalos; OCT, que proporciona imágenes de secciones transversales o frontales de alta resolución del interior del medio de dispersión óptica, tal como la retina humana y la coroides; y microscopía óptica de iluminación estructurada, usando un microscopio de alta resolución especialmente diseñado y configurado para resolver la distribución fluorescente de estructuras autofluorescentes pequeñas (gránulos de lipofusina) en secciones de tejido del epitelio pigmentario retiniano.

Se administró a los sujetos bindarit en dos dosis orales de 300 mg, una vez al día, durante 12 semanas. Tras un periodo de tratamiento inicial de doce semanas, se evaluaron los resultados clínicos de los sujetos. De forma alternativa, los pacientes recibieron inyección intravítrea de un vehículo que contenía bindarit, con o sin un vehículo de entrega de fármaco.

Se determinó un primer resultado clínico usando un test de agudeza visual estándar, tal y como se sabe bien en la técnica. Se evaluó la capacidad de los sujetos para ver con claridad símbolos y objetos en una gráfica de Snellen desde una determinada distancia.

Un segundo resultado clínico evalúa la velocidad de progresión de la atrofia geográfica. Para ello, se dilataron las pupilas de los sujetos con tropicamida al 1,0 % y fenilefrina al 2,5 % antes del diagnóstico por imágenes de la retina. El diagnóstico por imágenes se llevó a cabo con un instrumento (p. ej., Spectralis HRA+OCT; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemania) que permite el registro simultáneo de cSLO y tomografía de coherencia óptica de dominio espectral (SD-OCT) con dos espejos de barrido independientes, tal y como se describe en Helb, y col. Acta Ophthalmol. 2010 Dec; 88(8):842-9. Se emplearon cinco modos operativos: luz blanca, luz aneritra, infrarrojo cercano, FAF y OCT.

Se obtuvieron imágenes cSLO de acuerdo con un protocolo operativo estandarizado que incluye la adquisición de imágenes de reflectancia en el infrarrojo cercano ($\lambda = 815 \text{ nm}$) y FAF (excitación en $\lambda = 488 \text{ nm}$, emisión 500-700 nm). Se llevó a cabo un diagnóstico por imágenes simultáneo mediante SD-OCT con una longitud de onda de iluminación de 870 nm, una velocidad de adquisición de 40 000 barridos en modo A y una profundidad de barrido de 1,8 mm. Se realizaron dos barridos SD-OCT, uno vertical y uno horizontal, por ojo a lo largo del centro foveal

estimado, o en el caso de RPD, en las proximidades de las arcadas vasculares de la mácula. Se realizó angiografía con fluoresceína ($\lambda = 488$ nm, emisión 500-700 nm, 10 % de colorante fluoresceína) según fuera necesario. Se obtuvieron fotografías en color del fondo del ojo con una cámara de fondo de ojo (p. ej., FF 450 Visupac ZK5; Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Alemania).

5 La interpretación de datos de los resultados clínicos informa de una decisión de tratamiento adicional, si la hay.

Ejemplo 6: Tratamiento de la DMAE seca con una terapia combinada

10 Los sujetos humanos de 56 a 100 años de edad o más, presentan DMAE seca, tal y como se diagnostica mediante una o más de las siguientes pruebas clínicas: examen clínico, diagnóstico por imágenes del fondo del ojo, FAF a cualquier longitud de onda, fotografía en el infrarrojo cercano y/o en el canal aneritro, iluminación con luz azul y/o angiografía con fluoresceína o ICG, que permite la identificación y localización de procesos vasculares anómalos; OCT, que proporciona imágenes de secciones transversales, tridimensionales y frontales de alta resolución del interior del medio de dispersión óptica, tal como la retina humana y la coroides; y microscopía óptica de iluminación estructurada, usando un microscopio u oftalmoscopio de alta resolución especialmente diseñado y configurado para resolver la distribución fluorescente de estructuras autofluorescentes pequeñas (gránulos de lipofusina, similares a la lipofusina u otros gránulos) en el epitelio pigmentario retiniano u otras células y capas de células.

20 Se administró a los sujetos bindarit en dos dosis orales de 300 mg, una vez al día, durante 12 semanas. También se administró a los sujetos una inyección de ranizumab al mes (aproximadamente 28 días) en una dosis de 0,5 mg por ojo afectado. Tras un periodo de tratamiento inicial de doce semanas, se evaluaron los resultados clínicos de los sujetos.

25 Se determinó un primer resultado clínico usando un test de agudeza visual estándar, tal y como se sabe bien en la técnica. Se evaluó la capacidad de los sujetos para ver con claridad símbolos y objetos en una gráfica de Snellen desde una determinada distancia.

30 Un segundo resultado clínico evalúa la velocidad de progresión de la atrofia geográfica. Para ello, se dilataron las pupilas de los sujetos con tropicamida al 1,0 % y fenilefrina al 2,5 %, o un agente comparable, antes del diagnóstico por imágenes de la retina. El diagnóstico por imágenes se llevó a cabo con un instrumento (p. ej., Spectralis HRA+OCT; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Alemania) que permite el registro simultáneo de cSLO y SD-OCT, tal y como se describe en Helb, y col. Acta Ophthalmol. 2010 Dec;88(8):842-9. Se pueden emplear múltiples modos operativos: luz blanca, luz aneritra, luz azul, infrarrojo cercano y OCT. Se pueden realizar análisis similares con una cámara de fondo de ojo modificada.

40 Se obtuvieron imágenes cSLO de acuerdo con protocolos operativos conocidos en la técnica que pueden incluir la adquisición de imágenes de reflectancia en el infrarrojo cercano ($\lambda = 800$ -1000 nm) y FAF (excitación en $\lambda = 280$ -550 nm, emisión 350-700 nm). Se llevó a cabo un diagnóstico por imágenes simultáneo mediante SD-OCT con, por ejemplo, una longitud de onda de iluminación de 870 nm, una velocidad de adquisición de 40 000 barridos en modo A y una profundidad de barrido de 1,8 mm. Se realizaron múltiples barridos SD-OCT por ojo a lo largo de la mácula y, adicionalmente o en el caso de RPD, en las proximidades de las arcadas vasculares de la mácula. También se pueden usar otros diagnósticos por imágenes mediante OCT, tales como, por ejemplo, el dominio temporal y el dominio barrido. Se realizó angiografía con fluoresceína ($\lambda = 488$ nm, emisión 500-700 nm, 10 % de colorante fluoresceína) según fuera necesario. Se obtuvieron fotografías en color del fondo del ojo con una cámara de fondo de ojo (p. ej., FF 450 Visupac ZK5; Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Alemania).

50 La interpretación de datos de los resultados clínicos informa de una decisión de tratamiento adicional, si la hay. El análisis de datos ilustrativos incluye los análisis Macular cube y 5 Line Raster.

Ejemplo 7: Detección y/o predicción de la respuesta de un sujeto con enfermedad ocular que causa ceguera a un agente

55 Usando diagnóstico por imágenes multimodal en el ojo de rata, se determinó que la inyección sistémica de la toxina del EPR, NaIO_3 , induce complejos patrones de FAF similares a los de pacientes con formas agresivas de DMAE seca y/o RPD. La histología de tejidos y la microscopía fluorescente ilustraron que los patrones de FAF *in vivo* corresponden a la distribución espacial de células autofluorescentes del sistema inmunitario innato reclutadas a áreas de daño o pérdida de EPR.

60 *Diagnóstico por imágenes multimodal y angiográfico in vivo*: se realizó diagnóstico por imágenes del fondo del ojo usando un oftalmoscopio láser de barrido confocal disponible en el mercado, (cSLO, Spectralis, Heidelberg Retinal Angiography, HRA-II; Heidelberg Engineering GmbH, Alemania) y el sistema de captura de imágenes Eye Explorer, versión 1.1.10. Las imágenes se capturaron a una longitud de onda de 488 nm de excitación con un filtro barrera de

500 nm para la angiografía con fluoresceína, sin el filtro barrera para el diagnóstico por imágenes con luz anérita (RF, verde dominante), a 795/810 nm de excitación/emisión para la angiografía con ICG y con un láser de 830 nm para el diagnóstico por imágenes mediante reflectancia en el infrarrojo. Para evaluar la FAF a 488 nm, se realizó el diagnóstico por imágenes mediante cSLO en ausencia de colorante de fluoresceína. En los casos en los que era necesario obtener imágenes de la vasculatura y, simultáneamente, proporcionar puntos de referencia para el análisis de las imágenes FAF, se inyectó ICG a través de la vena caudal, con una concentración de 2 o 5 mg/kg, mediante un catéter de calibre 23 previamente introducido en la vena caudal.

El diagnóstico por imágenes mediante FAF del ojo de ratas Sprague Dawley normal producía un brillo de vidrio esmerilado débil y homogéneo, interrumpido por vasos sanguíneos de la retina dispuestos radialmente que bloqueaban la fluorescencia del EPR y, por lo tanto, tenían un aspecto oscuro. Tal diagnóstico por imágenes también se caracterizaba por un círculo hipofluorescente central en la cabeza del nervio óptico (ONH), donde no había EPR. Se prepararon inyecciones sistémicas de NaIO_3 (solución al 45 %, preparada fresca para cada grupo de experimentos en cloruro sódico al 0,9 % e inyectada a una concentración final de 45 mg/kg de peso corporal) y se administraron a las ratas experimentales. Tres días después de la inyección, aparecía una única área de FAF iso- o ligeramente hiperfluorescente con bordes hiperfluorescentes y tomaba la forma de una isla, un sector o un anillo de 360° totalmente diferenciados. En todos los casos, las islas, los sectores o los anillos estaban próximos a la ONH, pero no eran contiguos a ella. Estas y las siguientes informaciones se confirmaron en más de 160 ojos.

Comenzando aproximadamente de 4 a 5 días después de la inyección de NaIO_3 , aparecía un marcado patrón reticular o curvilíneo de FAF hiper/hipofluorescente alternante en el interior de las islas, los sectores o los anillos. En el día 7, este patrón era pronunciado y seguía apareciendo durante semanas, en las que sus componentes curvilíneos contribuían a patrones de FAF de bucles, óvalos, círculos, rosetas, festoneados o con forma de «huella de animal». Incluso tan tarde como a las 20 semanas, el último momento puntual analizado, los bordes retenían su patrón reticular hiperfluorescente y seguían avanzando hacia la periferia de la retina.

La angiografía con fluoresceína realizada en un subgrupo de animales confirmó que el patrón reticular no corresponde a la vasculatura retiniana o coroidea, mientras que la angiografía con ICG reveló un cambio de permeabilidad que se producía en la interfaz coroides-retina, a lo largo del EPR y la BM, aproximadamente dos o tres días después de la administración de NaIO_3 que coincide, tanto espacialmente como temporalmente, con la aparición de las islas, los sectores o los anillos de FAF. Este aumento de permeabilidad es transitorio y se resolvió en el día 7, el siguiente momento temporal evaluado de forma rutinaria. Los vasos retinianos no presentan fugas. La histología con hematoxilina-eosina (H&E) de tejido integrado en parafina y la inmunohistoquímica (IHC) (conocidas en la técnica, realizadas tras fijación con, p. ej., fijador de Davidson y en secciones integradas en parafina, visualizadas con un microscopio vertical Nikon E800) confirmaron ese fluido acumulado en el espacio subretiniano. Esto también se observó mediante OCT de alta resolución *in vivo* (se obtuvieron imágenes de OCT de dominio espectral a 160 nm de alta resolución usando el sistema Envisu R2200 VHR Animal SDOIS System, Biopogen, EE. UU.; se adquirieron lecturas a una velocidad de 36 000 por segundo, con una resolución lateral de aproximadamente 2,8 μm al nivel de la retina).

Análisis autofluorescente e inmunofluorescente de retina extirpada y EPR: para determinar la correlación patológica del patrón de FAF observado *in vivo*, se visualizaron preparaciones completas de retina extirpada, con una magnificación baja, tanto bajo luz blanca como mediante microscopía epifluorescente a 488 nm, la misma longitud de onda usada para el diagnóstico por imágenes *in vivo*, sin marcado IHC fluorescente. Dependiendo de los análisis de tejido posteriores, se usaron dos microscopios para este fin: un dispositivo epifluorescente con una ventana de excitación/emisión estrecha (488/520 nm), y el sistema de visualización invertido Leica DM IRE2 de un microscopio confocal con una lámpara de arco de mercurio y un filtro de paso largo (mejor que de paso banda) que proporcionaba fluorescencia desde más de 515 nm tras la excitación con una banda de 450-490 nm. Bajo luz blanca, la retina normal de rata tenía un aspecto bastante homogéneo en su totalidad, con alguna deformación debida a la intervención humana. Por el contrario, se hacía evidente un sutil patrón reticular blanquecino y fino en las muestras obtenidas 7 días después de la inyección de NaIO_3 . En el día 14, este patrón era más aparente y se observó que correspondía a pequeños pliegues de la retina externa, que se ilustran mejor en el borde de corte de la retina. Si se visualizaba bajo luz fluorescente a 488 nm, este mismo patrón curvilíneo era evidente. Usando microscopía epifluorescente con una mayor magnificación, se demostró que este patrón reticular con forma de encaje coincide con la distribución espacial de células autofluorescentes que parecen alinearse con las ranuras o pliegues de la retina externa.

Para determinar la identidad de las células autofluorescentes que coinciden con el patrón reticular de FAF, se tiñó la retina extirpada con marcadores del sistema inmunitario innato, evitando el canal de 488 nm. El Iba1 es un marcador pan-microglial/de macrófagos y, en la retina de rata, los anticuerpos contra él identifican las poblaciones de células fagocíticas principales. Usando este marcador, se encontró que las células Iba1⁺ están dispuestas en un patrón curvilíneo con forma de encaje cuando se visualizan de forma frontal en una preparación completa de retina, es decir, en el plano z. Además, cuando se compara contra tinción nuclear de fotorreceptores, este patrón curvilíneo se

ve que yace interpuesto entre pliegues de la ONL deformada. Este patrón de células Iba1⁺ se corresponde con el patrón de hiperfluorescencia observado *in vivo* mediante diagnóstico por imágenes con FAF y con el patrón de células autofluorescentes de la retina extirpada. Se observaron los correspondientes patrones de tinción de FAF e Iba1⁺ *in vivo* tanto 7 días como 12 semanas después de la inyección de NaIO₃. Significativamente, 7 días después de la administración de NaIO₃, no había células del EPR en la copa ocular posterior, lo que confirmaba que estas células no pueden ser responsables de la FAF observada. Además, se confirmó la identificación de las células autofluorescentes como fagocíticas mediante comparación de los diagnósticos por imágenes de preparaciones en las que se había producido reducción de monocitos/macrófagos. Tal reducción se consiguió mediante tratamiento con cloruro de gadolinio (GAD). Tras el tratamiento con GAD, se observaron patrones de FAF reticulares mucho más definidos, incluyendo una reducción de la demarcación de los bordes.

Tal identificación de células fagocíticas es indicativa de DMAE seca y/o RPD y predictiva de la respuesta de un sujeto a un agente. Concretamente, la observación de tales células fagocíticas hace más probable que un sujeto responda al tratamiento con un agente.

La identificación de un aumento transitorio de permeabilidad a través de la barrera epitelial de un sujeto entre una coroides y una retina con respecto a un estado sano es indicativa de DMAE seca y/o RPD y predictiva de la respuesta de un sujeto a un agente. Concretamente, la observación de un aumento transitorio de permeabilidad a través de la barrera epitelial de un sujeto entre una coroides y una retina con respecto a un estado sano hace más probable que un sujeto responda al tratamiento con un agente.

Análisis retardado en el infrarrojo cercano (DNIRA) de retina extirpada y EPR: además, se lleva a cabo la identificación de características anómalas en comparación con el ojo normal mediante análisis retardado en el infrarrojo cercano (DNIRA). Se obtienen imágenes de DNIRA en los días y las semanas posteriores a la inyección de colorante, tal como inyección de ICG, usando los parámetros de la angiografía con ICG, es decir, con filtros de excitación/emisión, pero sin reinyección de colorante a las 24 horas, 48 horas, los 3 días, 7 días, 21 días o 28 días después de la angiografía. No se vuelve a realizar angiografía durante el curso temporal del estudio.

Para la administración de toxina, se inyecta sistémicamente una toxina tal como NaIO₃ (Sigma, n.º de cat. 424064) a través de un catéter 23G con una dosificación de 45 mg/kg de peso corporal. La angiografía con ICG en una concentración de 0,35 mg/kg se realiza inmediatamente antes de la inyección de NaIO₃. Se realiza DNIRA 7 días después de la inyección de ICG y NaIO₃.

Ejemplo 8: El DNIRA de un ojo de rata tras administración sistémica de ICG marca células inmunitarias *in vivo*

Para determinar la correlación patológica del patrón de FAF observado *in vivo*, se visualizaron preparaciones completas de retina extirpada, con una magnificación baja, tanto bajo luz blanca como mediante microscopía epifluorescente a 488 nm, la misma longitud de onda usada para el diagnóstico por imágenes *in vivo*, sin marcado IHC fluorescente. Dependiendo de los análisis de tejido posteriores, se usaron dos microscopios para este fin: un dispositivo epifluorescente con una ventana de excitación/emisión estrecha (488/520 nm), y el sistema de visualización invertido Leica DM IRE2 de un microscopio confocal con una lámpara de arco de mercurio y un filtro de paso largo (mejor que de paso banda) que proporcionaba fluorescencia desde más de 515 nm tras la excitación con una banda de 450-490 nm. Bajo luz blanca, la retina normal de rata normal tenía un aspecto bastante homogéneo en su totalidad, con alguna deformación debida a la intervención humana (**FIG. 3A**). Por el contrario, se hacía evidente un sutil patrón reticular blanquecino y fino en las muestras obtenidas 7 días después de la inyección de NaIO₃. En el día 14, este patrón era más evidente y se vio que correspondía a pequeños pliegues de la retina externa que se ilustran mejor en el borde de corte de la retina (**FIG. 3B**). Si se visualizaba bajo luz fluorescente a 488 nm, este mismo patrón curvilíneo era evidente. Aunque es claro en el día 7 posterior a la inyección, el aumento de fluorescencia hace que este patrón sea más visible en el Día 14 (**FIG. 3C**). Usando microscopía epifluorescente con una mayor magnificación, se demostró por primera vez que este patrón reticular con forma de encaje coincide con la distribución espacial de células autofluorescentes que parecen alinearse con las ranuras o pliegues de la retina externa (**FIG. 3D**).

Sin querer ceñirnos a la teoría, esto sugiere que el patrón de FAF *in vivo* observado corresponde a la distribución de células autofluorescentes en la retina externa. Esto contrasta con las teorías vigentes, que atribuyen los patrones clínicamente relevantes de FAF a un EPR anómalo; téngase en cuenta que no había EPR en las muestras de retina aisladas que usamos. Sin querer ceñirnos a la teoría, esto también sugiere que el patrón bidimensional de FAF observado en este modelo corresponde a la distribución de células autofluorescentes confinadas en el interior de los pliegues curvilíneos tridimensionales de la retina externa.

Por consiguiente, se investigaron los cambios espaciales y temporales de la estructura de la retina externa y la identidad de los tipos de células autofluorescentes.

Debido a la naturaleza laminar de la neuroretina, consideramos que la deformación de la retina externa se podía evaluar fácilmente observando los cambios conformacionales de la capa nuclear externa (ONL), una capa de núcleos de fotorreceptor dispuestos densamente que en condiciones normales es plana. Por lo tanto, inmediatamente después del análisis autofluorescente de preparaciones completas de retina recién extirpada, se realizó la tinción y se evaluó el tejido mediante microscopía epifluorescente o confocal en un canal distinto del 488. También se evaluaron secciones transversales mediante H&E de ojos íntegros.

En el punto de referencia, antes de la administración de NaIO_3 , la microscopía confocal usando el tinte nuclear Topro3 confirma que la ONL es plana y está exenta de tinción vascular (**FIG. 4C**). Tres días después de la administración de NaIO_3 , se observaron unas ligeras ranuras curvilíneas de la ONL, acompañadas de pliegues lineales y poco profundos ocasionales. En el Día 7, la deformación de la ONL era más pronunciada, produciendo una serie de ranuras claramente interconectadas. En el Día 14, estos cambios eran más complejos y de mayor amplitud.

La histología con H&E de secciones transversales de retina a 90° realizada para las imágenes obtenidas usando microscopía confocal, mostró que la toxicidad del EPR inducida por NaIO_3 primero lleva a pequeñas ondulaciones de la ONL acompañadas de aumento de fluido subretiniano, con poca pérdida de fotorreceptor (**FIG. 4B**). Más tarde, la clara pérdida de fotorreceptor creaba valles de mayor amplitud en los que la ONL estaba yuxtapuesta contra la membrana de Bruch (BM), la membrana basal del EPR. Finalmente, la expansión lateral de estos valles llevaba a grandes regiones contiguas de degeneración de la retina externa, de tal forma que gran parte de la retina interna yacía yuxtapuesta contra la BM.

Para determinar la identidad de las células autofluorescentes que coinciden con el patrón reticular de FAF, se tiñó la retina extirpada con marcadores del sistema inmunitario innato, evitando el canal de 488 nm. El Iba1 es un marcador pan-microglial/de macrófagos y, en la retina de rata, los anticuerpos contra él identifican las poblaciones de células fagocíticas principales. Usando este marcador, se mostró que las células Iba1⁺ están dispuestas en un patrón curvilíneo con forma de encaje cuando se visualizan de forma frontal en una preparación completa de retina, es decir, en el plano z (**FIG. 5**). Además, cuando se comparó contra tinción nuclear de fotorreceptores, este patrón curvilíneo se vio que yacía interpuesto entre pliegues de la ONL deformada. Tal y como se muestra en la **FIG. 5**, este patrón de células Iba1⁺ se correspondía con el patrón de hiperfluorescencia observado *in vivo* mediante diagnóstico por imágenes con FAF (**FIG 1 y 2**) y con el patrón de células autofluorescentes de la retina extirpada (**FIG. 3**). Los correspondientes patrones de tinción de FAF e Iba1⁺ *in vivo* se muestran tanto 7 días como 12 semanas después de la inyección de NaIO_3 (**FIG. 5A y 5B**). 7 días después de la administración de NaIO_3 , no había células del EPR en la capa ocular posterior, lo que confirmaba que estas células no eran responsables de la FAF observada (**FIG 5C y 5D**).

A continuación, se evaluó la relación tridimensional (3D) entre las células Iba1⁺ y la retina mediante microscopía confocal en serie frontal de preparaciones completas de retina (es decir, en el eje z), pasando de forma gradual desde la capa plexiforme interna (INL), a través de la capa plexiforme externa (OPL), hasta la ONL interna, media y externa. Se proyectaron (aplanaron) pilas cortas de imágenes confocales (segmentos) en estas tres etapas (**FIG. 6**). También se evaluó la codistribución de macrófagos CD68⁺ activados del linaje monocito.

En el punto de referencia, antes de la administración de NaIO_3 , solo se vieron células Iba1⁺ en la IPL. No se identificaron células CD68⁺ (**FIG. 6A**). Tres o cuatro días después de la administración de NaIO_3 , aumentó el número de células Iba1⁺ y aumentó tanto en la IPL como también en la totalidad de la retina externa, incluyendo la capa de ONL externa (**FIG. 6B**). Dos semanas después de la administración de NaIO_3 , se vio una compleja distribución de células Iba1⁺ y CD68⁺ entrelazadas entre los pliegues curvilíneos de la ONL. Además, se observaron círculos u óvalos de núcleos de fotorreceptor seccionados ópticamente bien definidos en una capa tan interna como la OPL, la capa de retina media de los vasos sanguíneos, poniendo así en contacto la capa nuclear de fotorreceptores deformada y la capa vascular, dos compartimentos tisulares que en condiciones normales están separados. En la ONL media, las secciones transversales ovaladas de la capa nuclear deformada tenían un aspecto más curvilíneo o pisciforme y se encontraron células Iba1⁺ y CD68⁺ dentro de su vacío central. En el tercio más externo de la ONL, las secciones transversales seguían siendo curvilíneas y estaban considerablemente contiguas, con muchos segmentos acoplados. El espacio subretiniano, en condiciones normales solo un espacio potencial, se había expandido por la deformación de la retina externa y muestra células inflamatorias Iba1⁺ y/o CD68⁺ y núcleos de fotorreceptor juntos en la zona inmediatamente interna a la membrana de Bruch (en el espacio donde residirían normalmente los segmentos externos de fotorreceptor perdidos).

Se realizó microscopía de barrido confocal y reconstrucción tridimensional de las preparaciones completas de retina extirpada (**FIG. 7A**). Estos datos mostraban que las células Iba1⁺ formaban un patrón reticular o con forma de encaje interpuesto entre los núcleos de fotorreceptor. Además, la proyección de la pila en z, dividida en los tres mismos planos (**FIG. 7B**, derecha) mostraba que la ONL interna se caracterizaba por secciones transversales circulares u

ovales de la ONL. Por el contrario, la ONL media se caracteriza por secciones transversales curvadas de bucles de la capa nuclear y la ONL externa está formada por segmentos curvilíneos con múltiples elementos acoplados. Las proyecciones volumétricas oblicuas de estas capas ilustran fácilmente la configuración pseudo caja de huevos resultante de la ONL, con diversos picos cónicos que se extienden desde los pliegues sencillos contiguos en su base (**FIG. 7B**, media y derecha). Sin querer ceñirnos a la teoría, estos datos demuestran que la mayoría de células inflamatorias no están ubicadas en, o entre, los valles de la ONL, sino que se encuentran bajo (es decir, en el exterior de) los picos de la ONL, en el espacio subretiniano expandido.

Sin querer ceñirnos a la teoría, estas observaciones muestran que la distribución tridimensional de células inflamatorias autofluorescentes bajos la retina externa deformada justifica el patrón 2D de diagnóstico por imágenes mediante FAF *in vivo* en estos animales.

Para correlacionar estas observaciones hechas en tejido extirpado con los cambios y hallazgos de FAF *in vivo*, se realizó un análisis volumétrico 3D de la retina viva usando OCT de alta resolución *in vivo*. La HR-OCT proporciona de forma no invasiva secciones transversales *in vivo* de la retina previamente observadas solo en especímenes histológicos tras la enucleación. El diagnóstico por imágenes OCT depende de la señal generada en la interfaz entre capas de diferente densidad óptica y, en la retina normal de rata, confirma su estructura multilaminar. Los tres bordes OCT más externos principales de la retina son, desde el interior hacia el exterior, la membrana limitante externa (ELM), la unión de los segmentos interno y externo de fotorreceptor (IS/OS) y el EPR/la BM (**FIG. 8A**, izquierda). Las técnicas estándar, tanto en clínica como en estas investigaciones, definen las capas nucleares, incluyendo la ONL, como oscuras (es decir, un vacío de señal).

Tres días después de la administración de NaIO₃, una imagen frontal de la retina viva reconstruida, capturada usando OCT, demostró un sutil cambio que se limita a la región inferior del nervio óptico (**FIG. 8A**, media). En comparación con el punto de referencia y la retina superior (que tiene un aspecto totalmente normal tres días después de la administración de NaIO₃) (**FIG. 8A**, media), las secciones transversales ópticas de la retina inferior mostraban una ligera deformación de la unión de los IS/OS de los fotorreceptores y la ELM tal que hacía visibles montículos bajos y brillantes (hiperecóicos) (**FIG. 8A**, derecha). La señal se encontró en el exterior de la ONL y el interior de la BM. La línea fina y oscura representa que el EPR ya no está presente. En el día 14, estos montículos maduraron para convertirse en picos pronunciados, formando una parte de ellos brillantes triángulos o pirámides totalmente diferenciados, cuyas bases parece que se asientan sobre la BM (**FIG 8B y 8C**). Otros montículos formaban puntas estrechas discretas que se extendían desde la ELM, a lo largo de la capa de fotorreceptor, para alcanzar la retina media. Una imagen clínica de OCT de un paciente humano con RPD muestra un depósito subretiniano piramidal que es patognomónico de esta enfermedad (**FIG. 8D**).

Para probar si los montículos, los triángulos y las puntas, que caracterizan la RPD y se ven en el presente sistema, se corresponden con la distribución de células fagocíticas autofluorescentes observadas en el espacio subretiniano, se usaron proyecciones de volumen-intensidad (VIP). Estas estaban compuestas por secciones ópticas generadas mediante OCT para proporcionar un medio de evaluación de los bloques tridimensionales de tejido vivo *in vivo* que se pueden reconstruir en los ejes z e y.

La reconstrucción de imágenes de OCT adyacentes en el eje y mostró que los montículos o triángulos, dispuestos uno al lado del otro, contribuyen a complejas estructuras tales como círculos, óvalos, halos y lesiones similares a la diana. En el ejemplo mostrado en la **FIG. 9A**, dos montículos subretinianos forman los «lados» de un círculo y yacen juntos en su lado superior e inferior, con una separación máxima en el medio. Los montículos, las pirámides y las puntas sencillas contribuyen a estructuras curvilíneas más sencillas.

Para apoyar aún más este hallazgo, se analizaron las VIP en el eje z (es decir, en los segmentos cortos graduales desde la ONL interna hasta la ONL externa) (**FIG. 9B**). Las VIP a lo largo de la capa interna de la ONL mostraron una serie de manchas moteadas y separadas regularmente a lo largo de toda la retina. Las VIP de la ONL media mostraron líneas cortas curvadas o pisciformes con una separación menos regular, algunas de ellas acopladas. Las VIP de la ONL externa mostraron segmentos curvilíneos contiguos con muchos elementos acoplados. Estos hallazgos se corresponden directamente con los datos 3D generados a partir de las preparaciones completas de retina extirpada (**FIG. 6**).

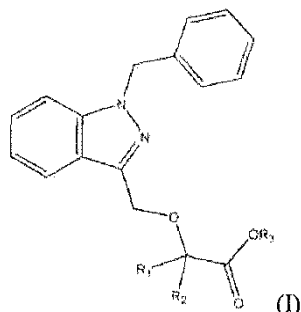
Además, para confirmar que los patrones de FAF hiperfluorescentes o patrones de FAF anómalos y los patrones de DNIRA hiperfluorescentes se correlacionaban o colocalizaban con la distribución de células fagocíticas, se redujo la población circulante de macrófagos/monocitos usando cloruro de gadolinio (GAD o GdCl₃), una sal de metal térreo raro que reduce la actividad de los macrófagos. La reducción de células inmunitarias con GAD llevó a una profunda alteración del patrón de FAF y DNIRA inducido por NaIO₃. La reducción de las poblaciones de monocitos/macrófagos con GAD llevó a una profunda alteración del patrón de FAF inducido por NaIO₃. Esto fue cualitativamente evidente tanto dentro de las áreas geográficas de daño como en su borde (**FIG. 8**).

Ejemplo 9: Diagnóstico por imágenes *in vivo* de RPD y DMAE de goteo difuso:

- 5 En la **FIG. 10**, se proporcionan imágenes y diagramas interpretativos que comparan directamente las características clínicas de la RPD con los hallazgos de tejido del modelo de NaIO_3 . Además del diagnóstico por imágenes clínico mediante OCT de un paciente humano con RPD (este muestra una estructura piramidal con la base hacia abajo en el espacio subretiniano, **FIG. 8D**), se obtuvieron también imágenes del fondo del ojo en color y en el canal aneritro (**FIG. 10**). Las imágenes aneritras mostraron pequeñas manchas oscuras que constituían pseudodrusas individuales de RPD (**FIG. 10A**, imagen superior). Estas se identificaron usando solapamiento de gris oscuro. Esto además destaca, circunscrita por círculos, la presencia de las denominadas «lesiones diana» que caracterizan la RPD. Estas
- 10 tienen el aspecto de manchas oscuras con centros más claros. En paralelo, se presenta una ilustración esquematizada de retina externa de rata plegada, tanto frontal como en sección transversal, que, cuando se colorea de forma artificial y se presenta como imágenes en blanco y negro, tanto «positivas» como «negativas», se correlaciona directamente con dianas y halos de RPD.
- 15 Estos datos indican que los patrones 2D de pseudodrusas oscuras presentes en un patrón reticular o con forma de encaje de círculos, halos y lesión diana con centros oscuros visualizadas de frente, en 2D, corresponden a anillos y cráteres elevados, considerados volumétricamente, en 3D.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto para uso en la reducción de la velocidad de progresión de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), compuesto de **Fórmula I**:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
donde:

R_1 y R_2 son independientemente H o un alquilo C_1-C_6 y

R_3 es H o un alquilo C_1-C_6 , donde

el compuesto es para administración intravítrea en una cantidad efectiva a un sujeto con necesidad del mismo.

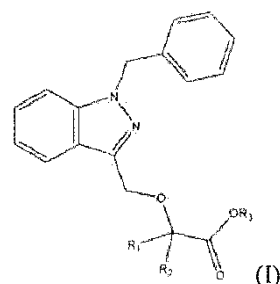
2. Compuesto para uso de la reivindicación 1, donde el compuesto de **Fórmula I** es bindarit.

3. Compuesto para uso de la reivindicación 1, donde la DMAE seca es DMAE temprana o DMAE atrófica.

4. Compuesto para uso de la reivindicación 1, donde el método reduce la velocidad de progresión a enfermedad tardía.

5. Compuesto para uso de la reivindicación 1, donde el método reduce la velocidad de expansión de la atrofia geográfica.

6. Compuesto para uso en la reducción de la velocidad de expansión de la atrofia geográfica en un ojo de un sujeto aquejado de degeneración macular asociada a la edad (DMAE), **de Fórmula I**:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
donde:

R_1 y R_2 son independientemente H o un alquilo C_1-C_6 y

R_3 es H o un alquilo C_1-C_6 , donde

el compuesto es para administración oftálmica en una cantidad efectiva al sujeto.

7. Compuesto para uso de la reivindicación 6, donde el compuesto de **Fórmula I** es bindarit.

8. Compuesto para uso de la reivindicación 7, donde el bindarit se formula para administración oftálmica.

9. Compuesto para uso de la reivindicación 8, donde la administración oftálmica es administración intravítrea o intraocular.

10. Compuesto para uso de la reivindicación 9, donde el bindarit se formula para liberación sostenida.

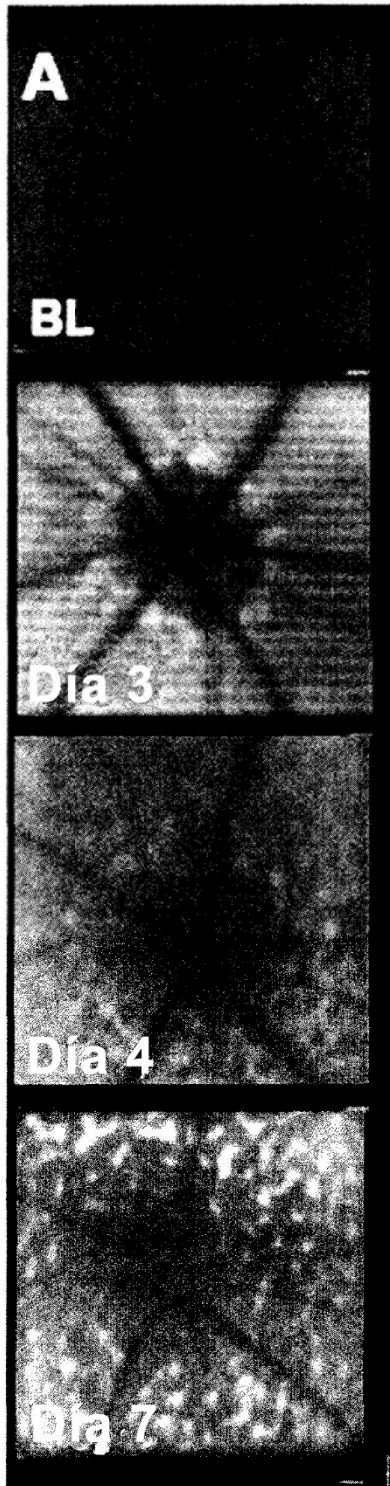


FIG. 1A

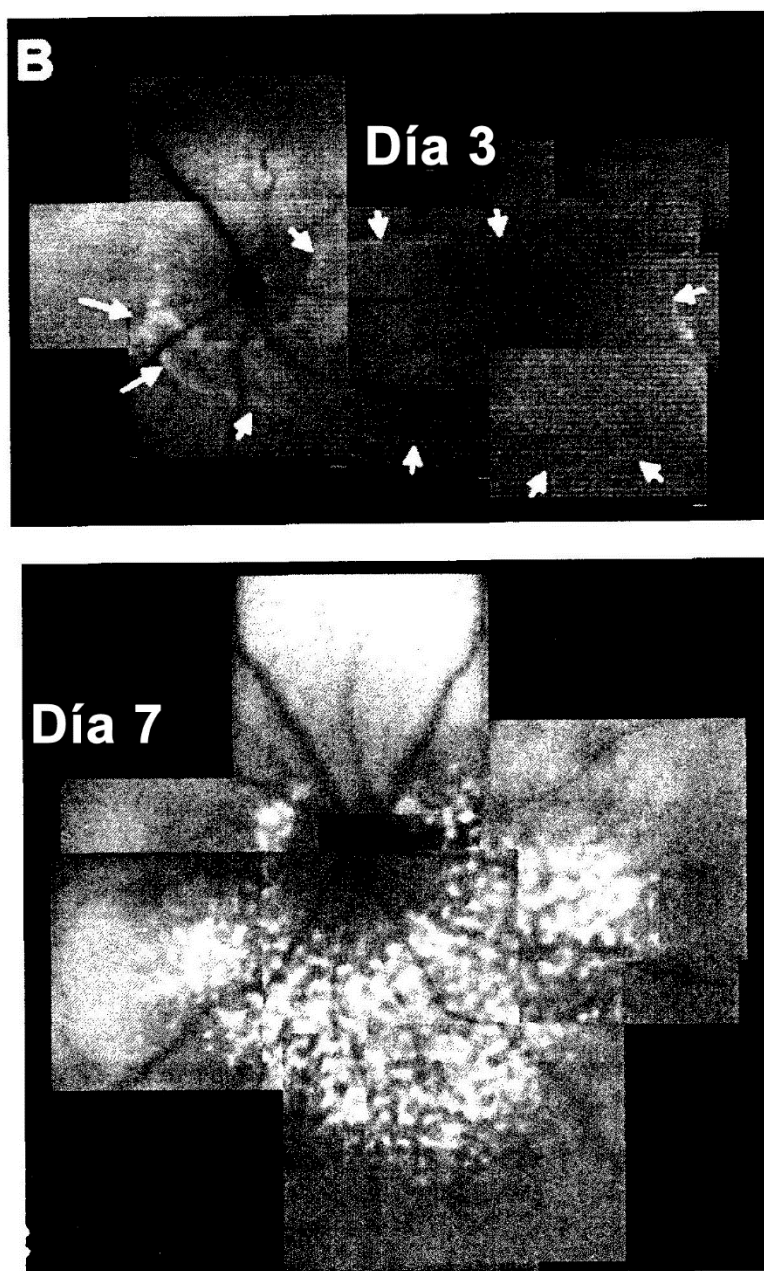


FIG. 1B

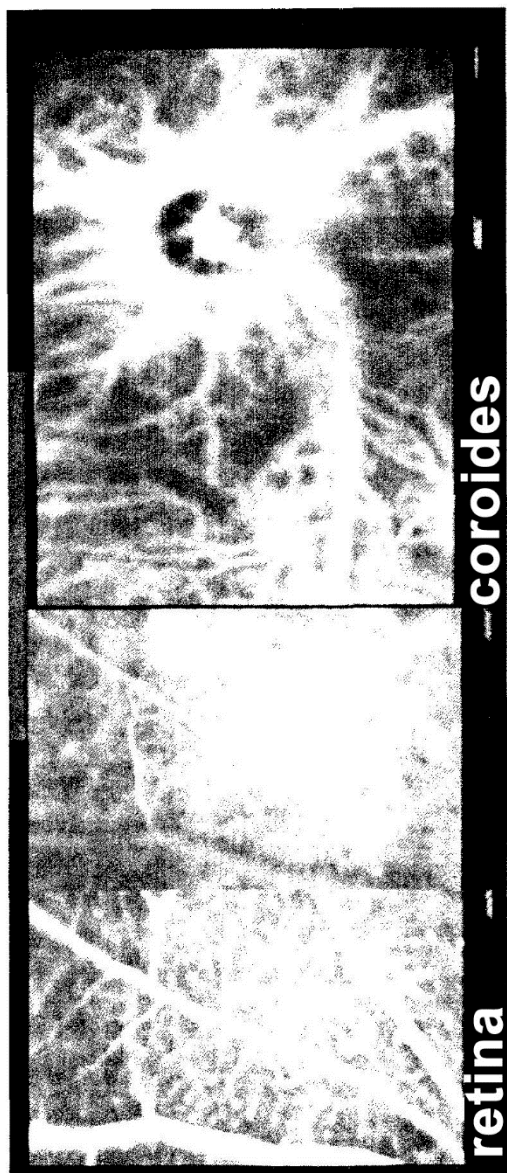


FIG. 1C

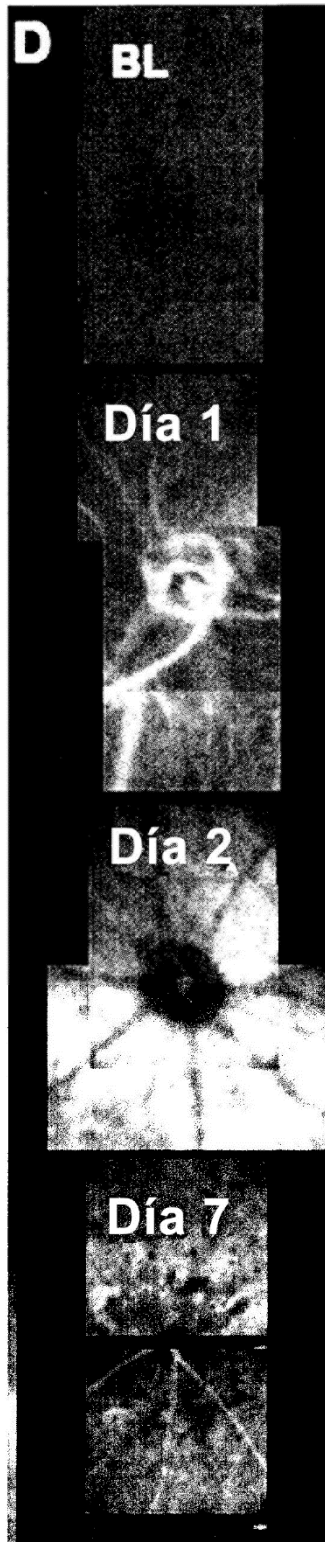


FIG. 1D



FIG. 2A

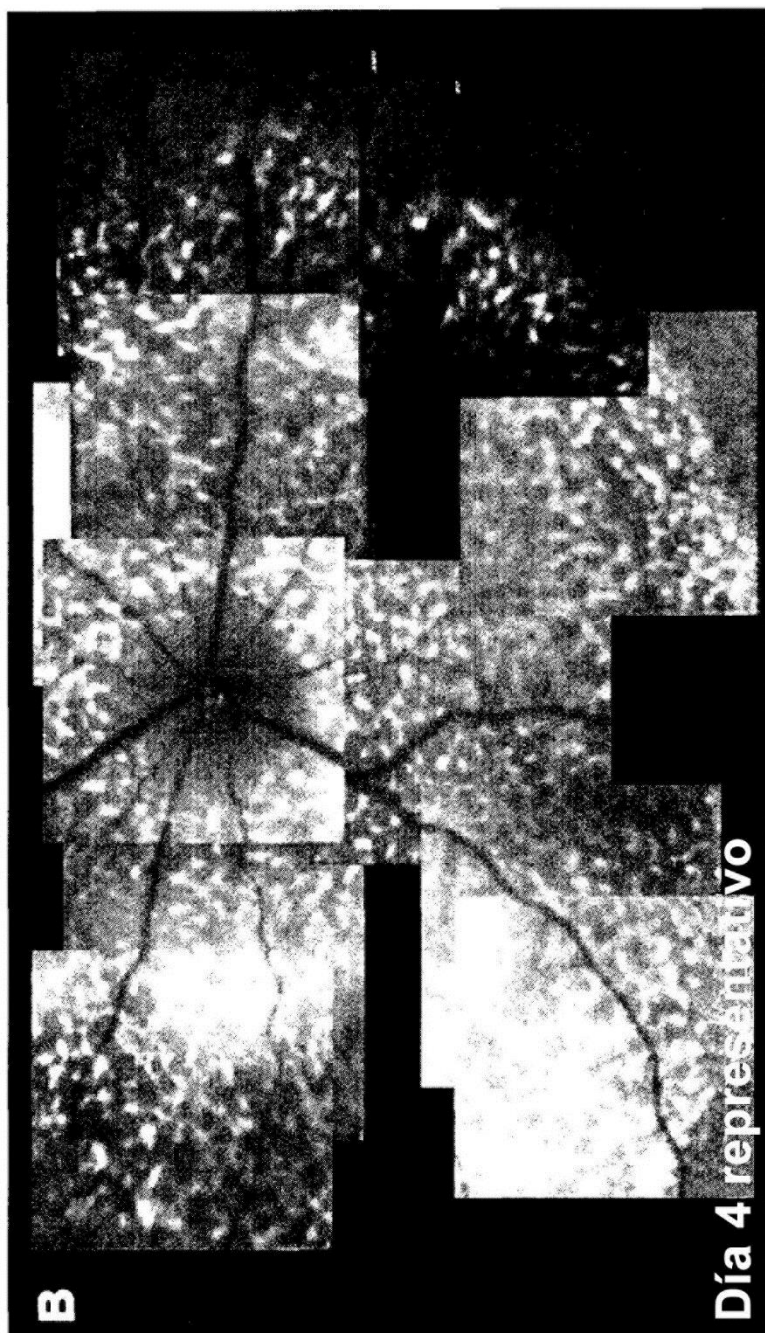


FIG. 2B

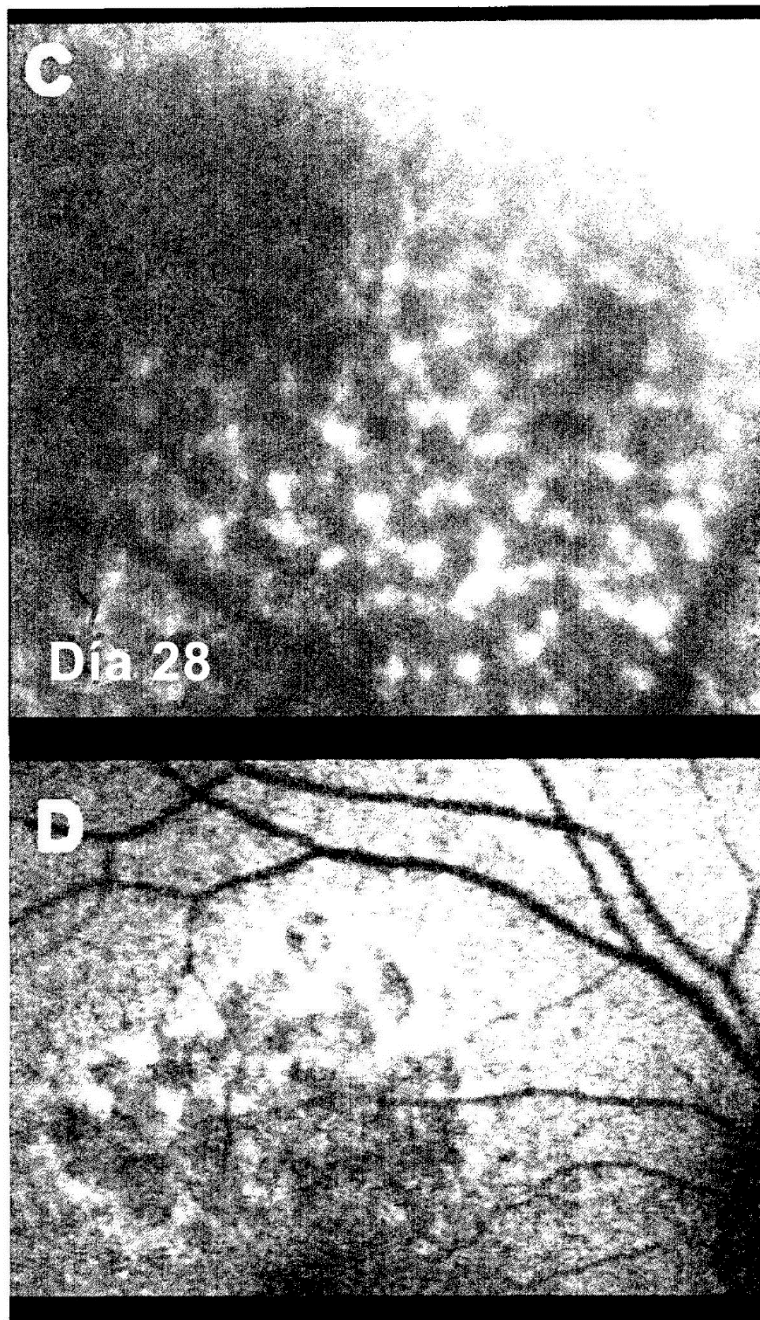


FIG. 2C-D

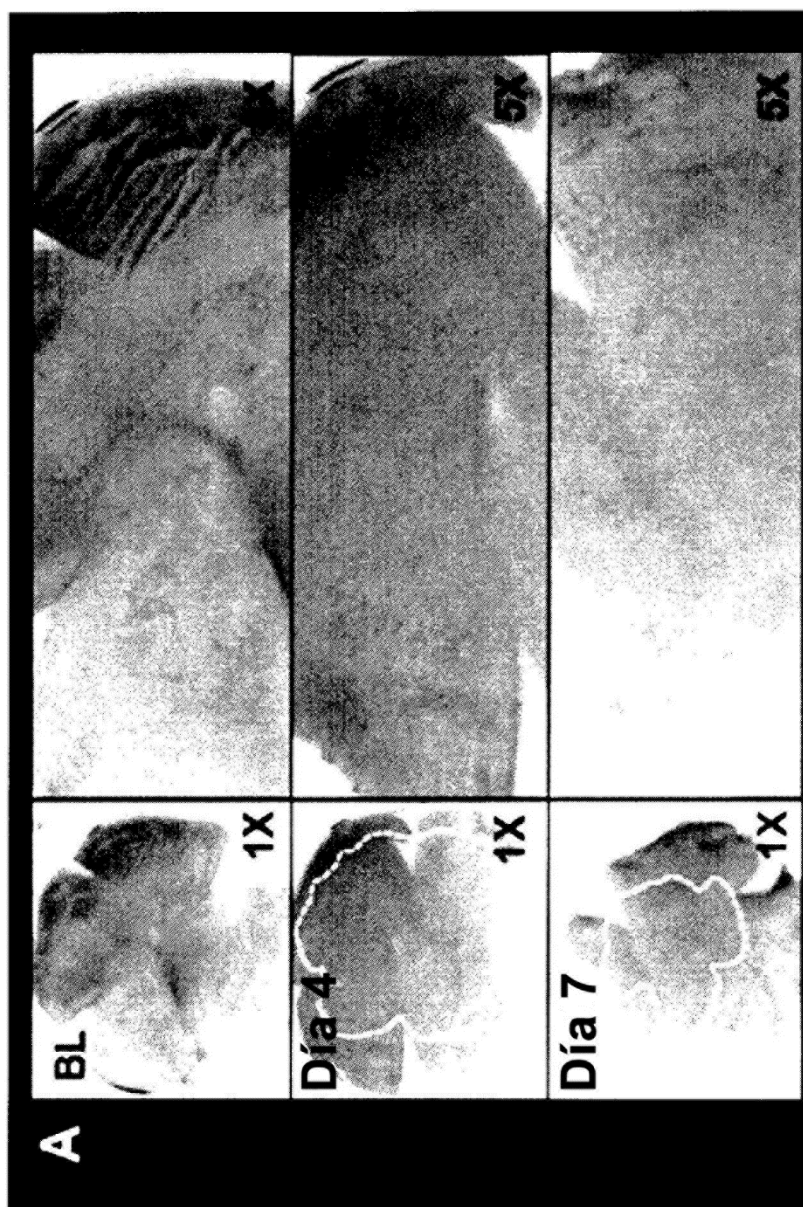


FIG. 3A

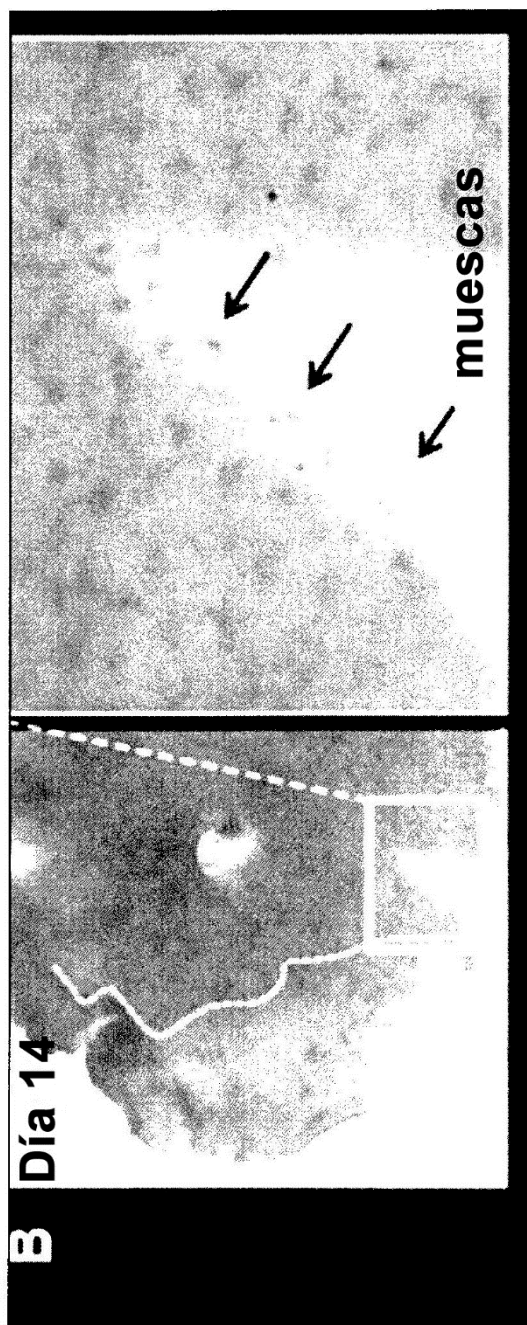


FIG. 3B

C

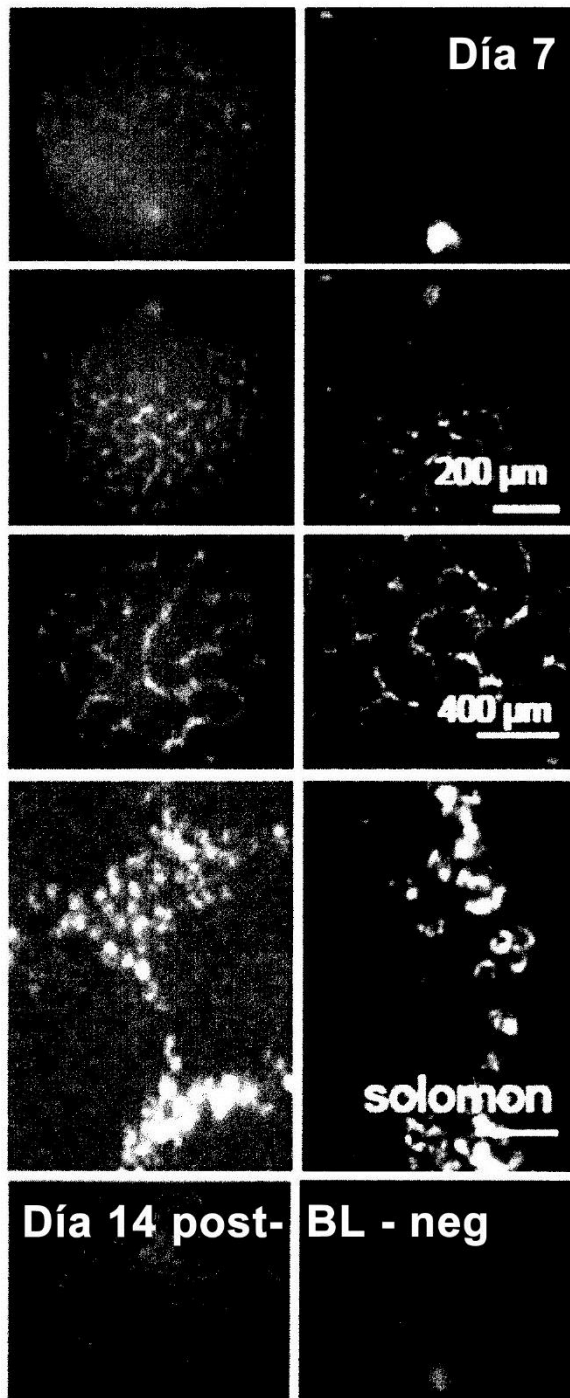


FIG. 3C

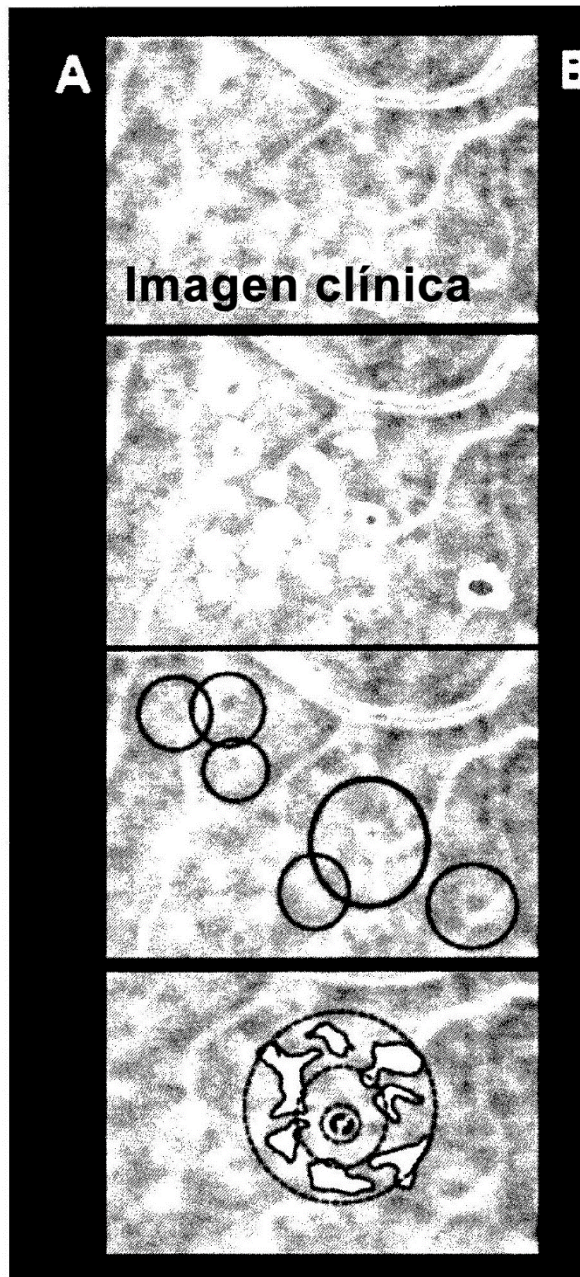


FIG. 4A

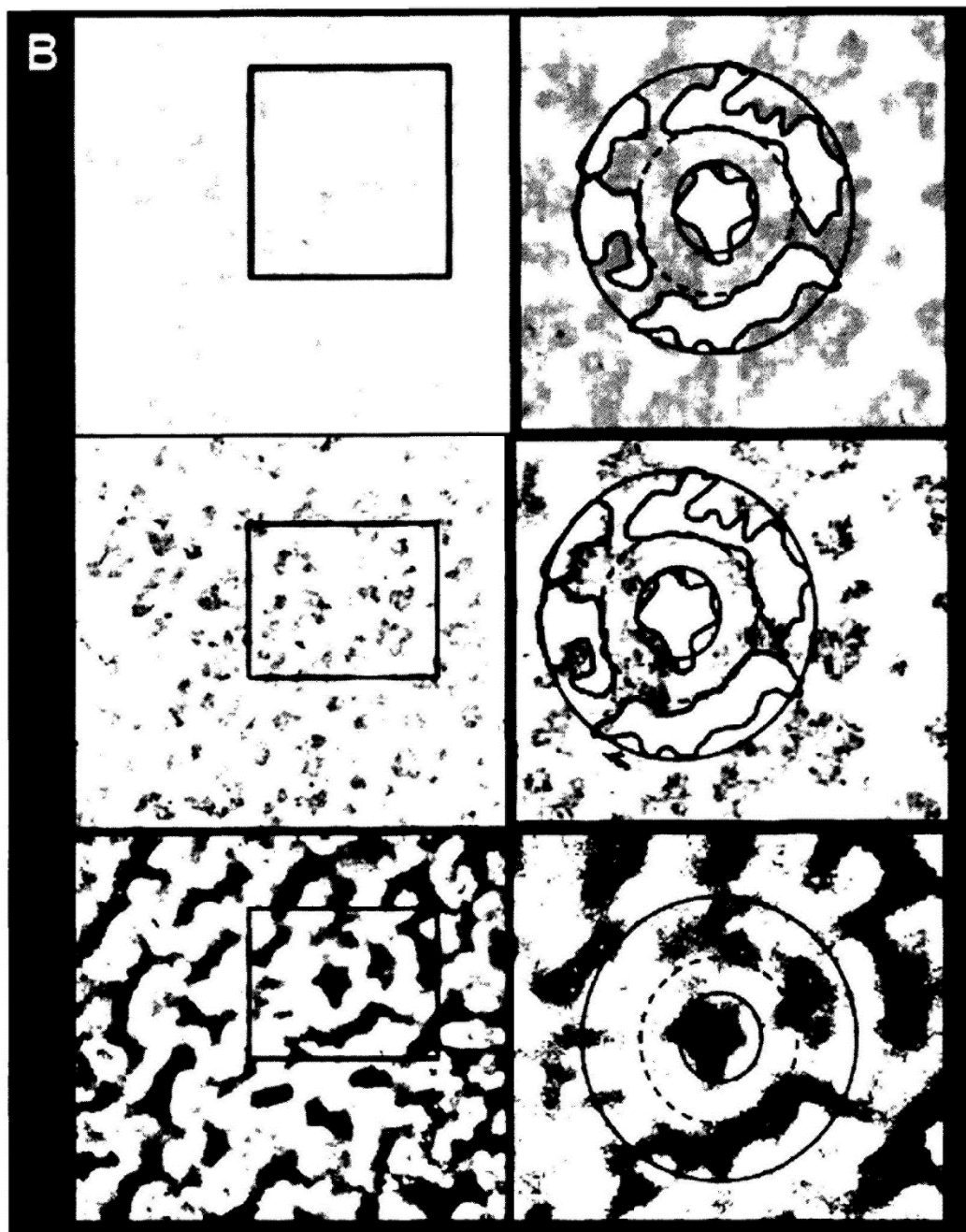


FIG. 4B

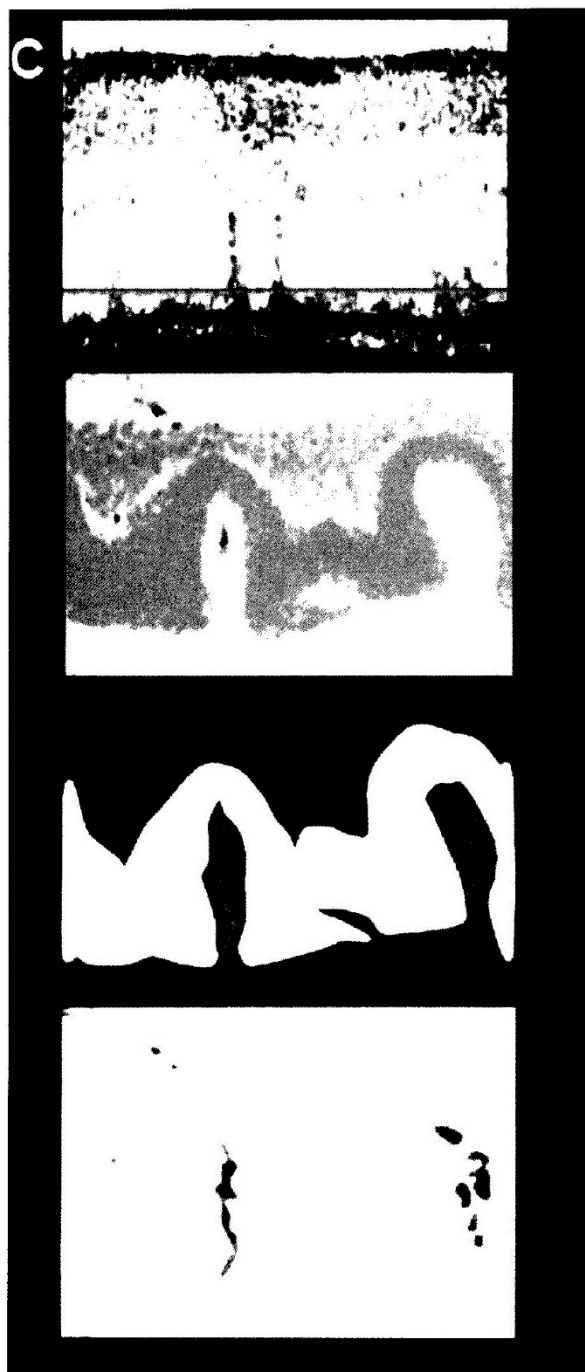


FIG. 4C

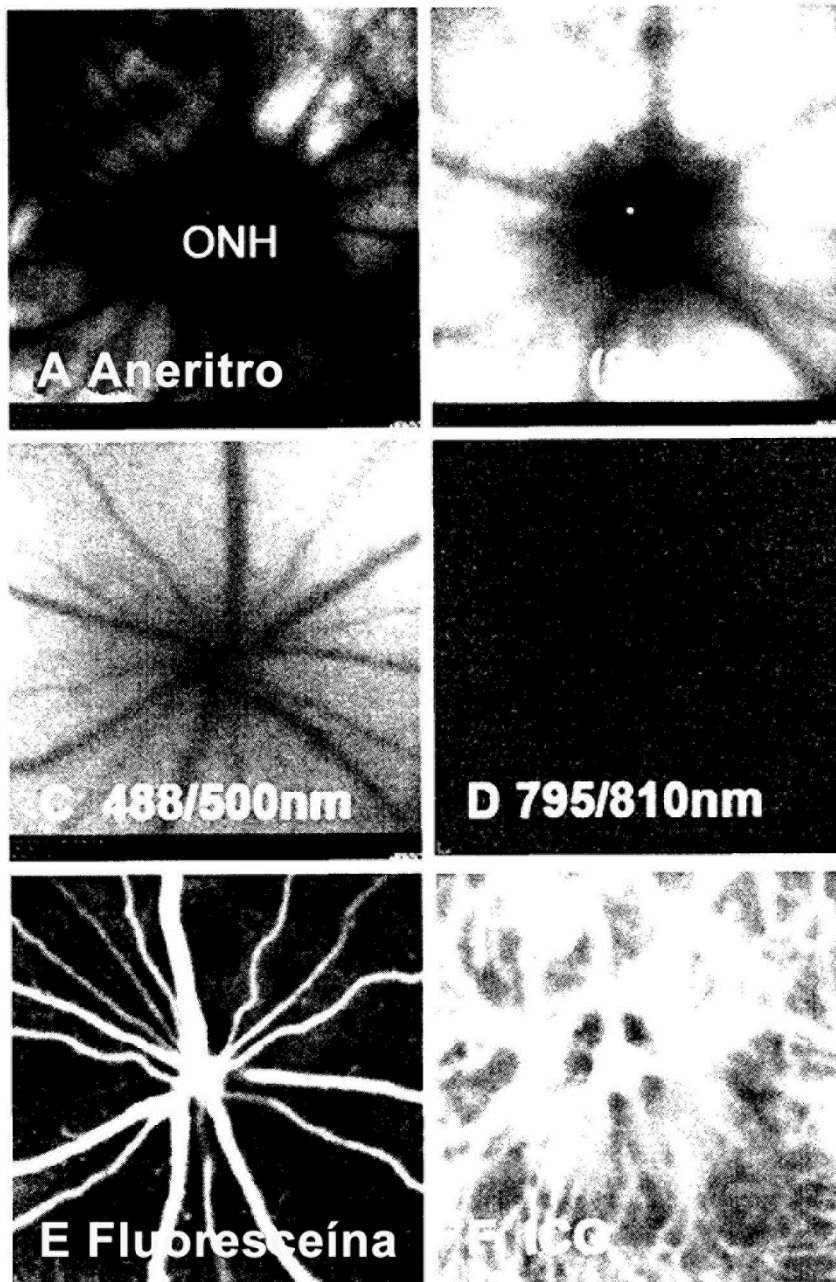


FIG. 5A-F

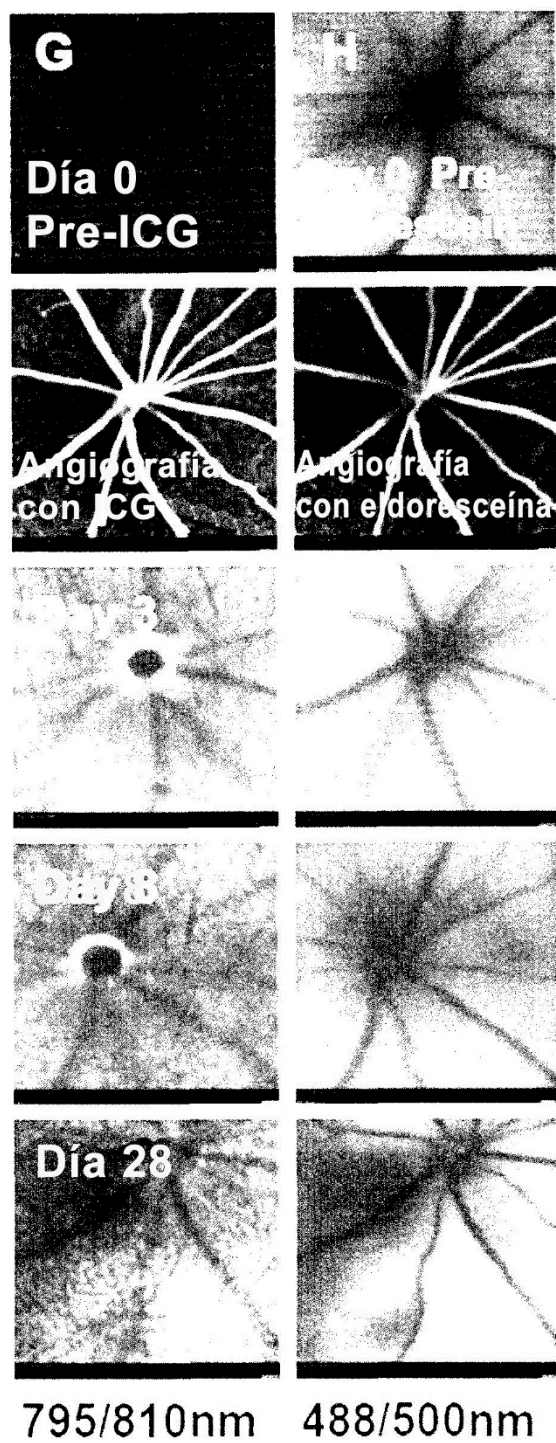


FIG. 5G-H

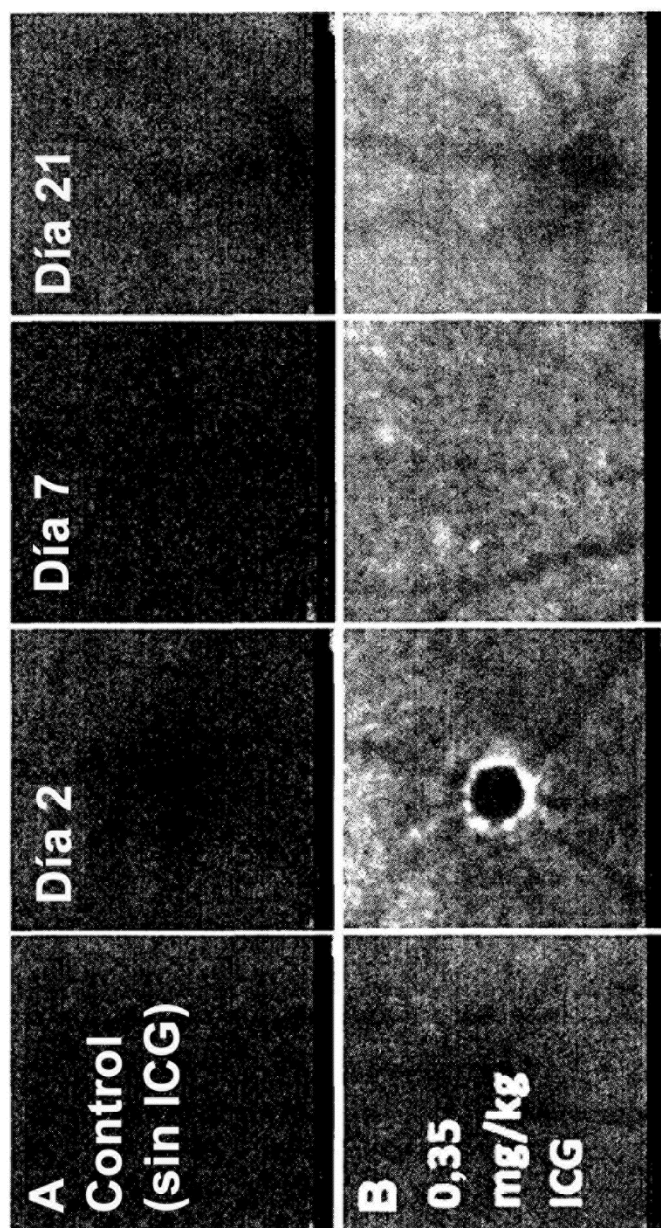


FIG. 6A-B

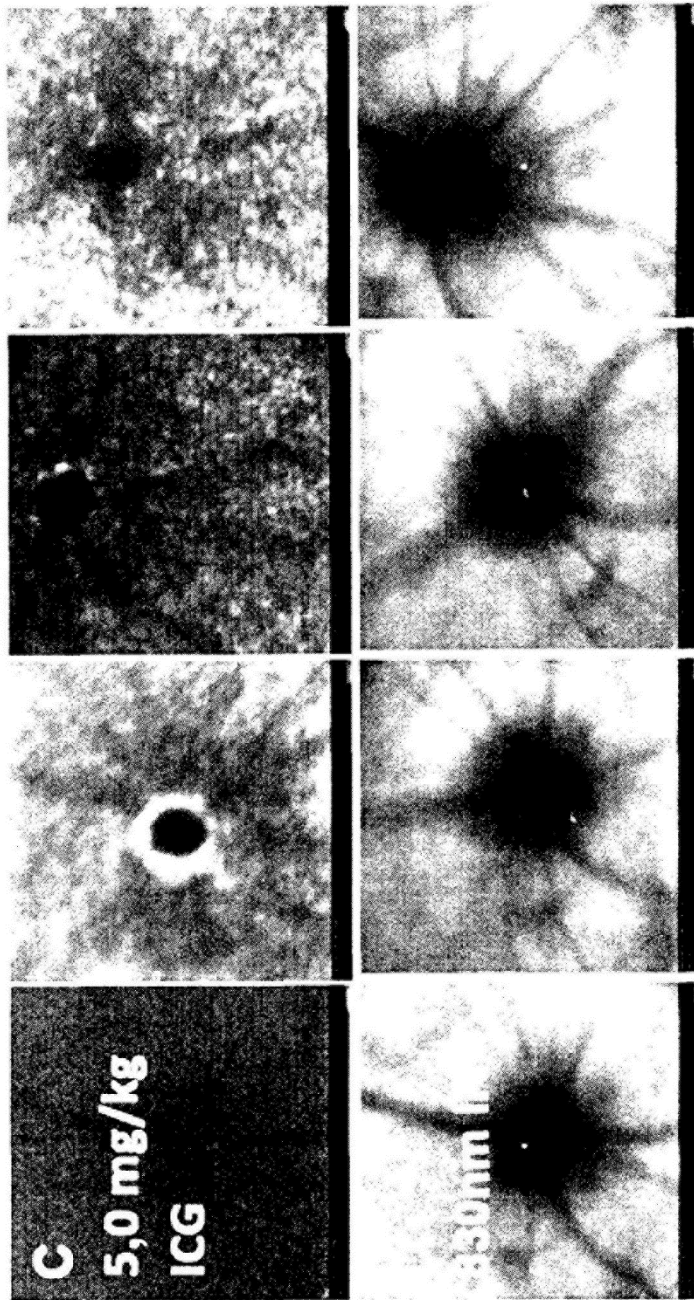


FIG. 6C-D



FIG. 7A

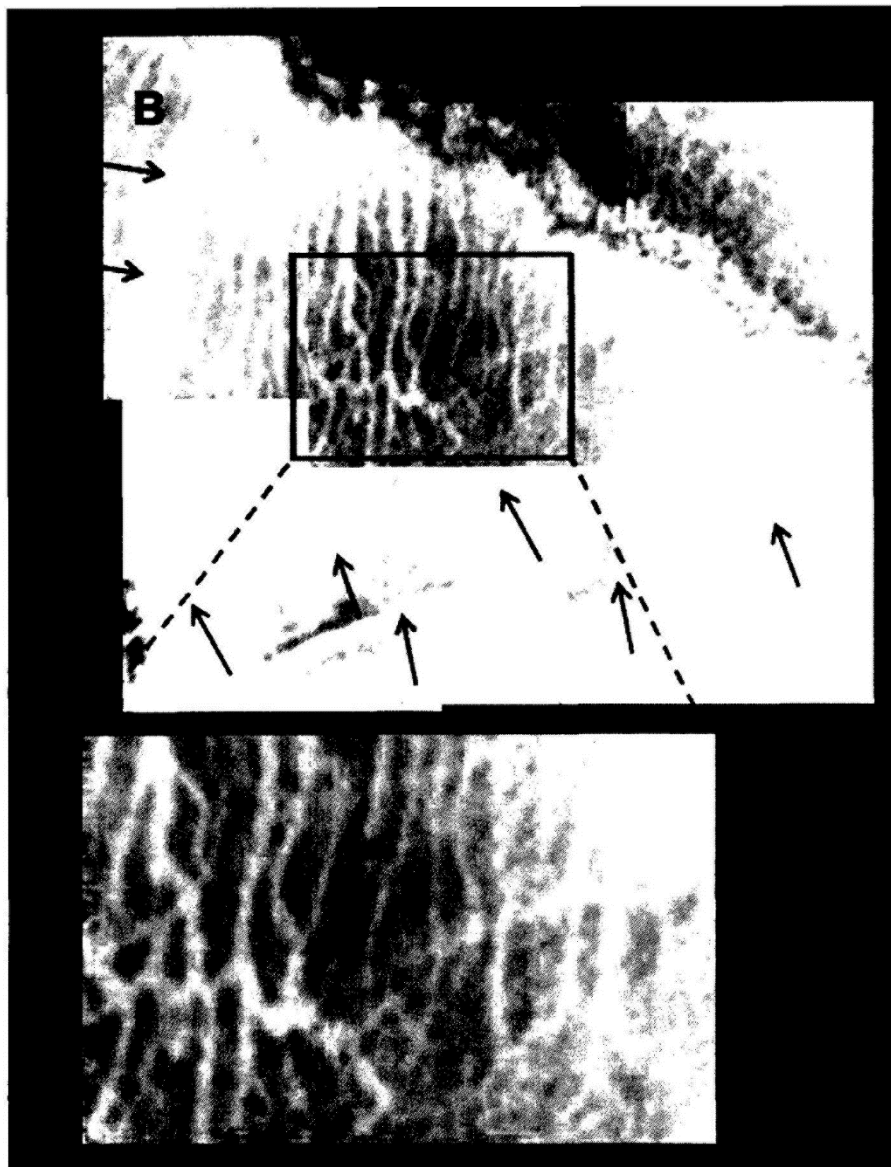


FIG. 7B

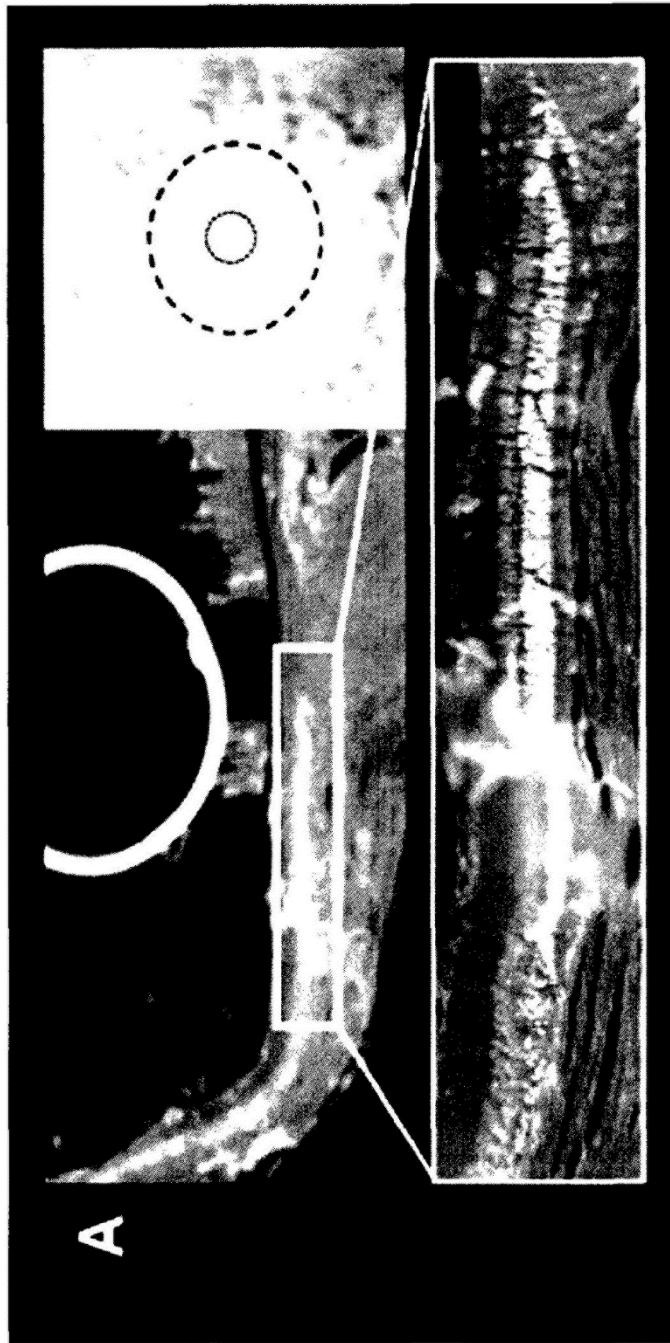


FIG. 8A

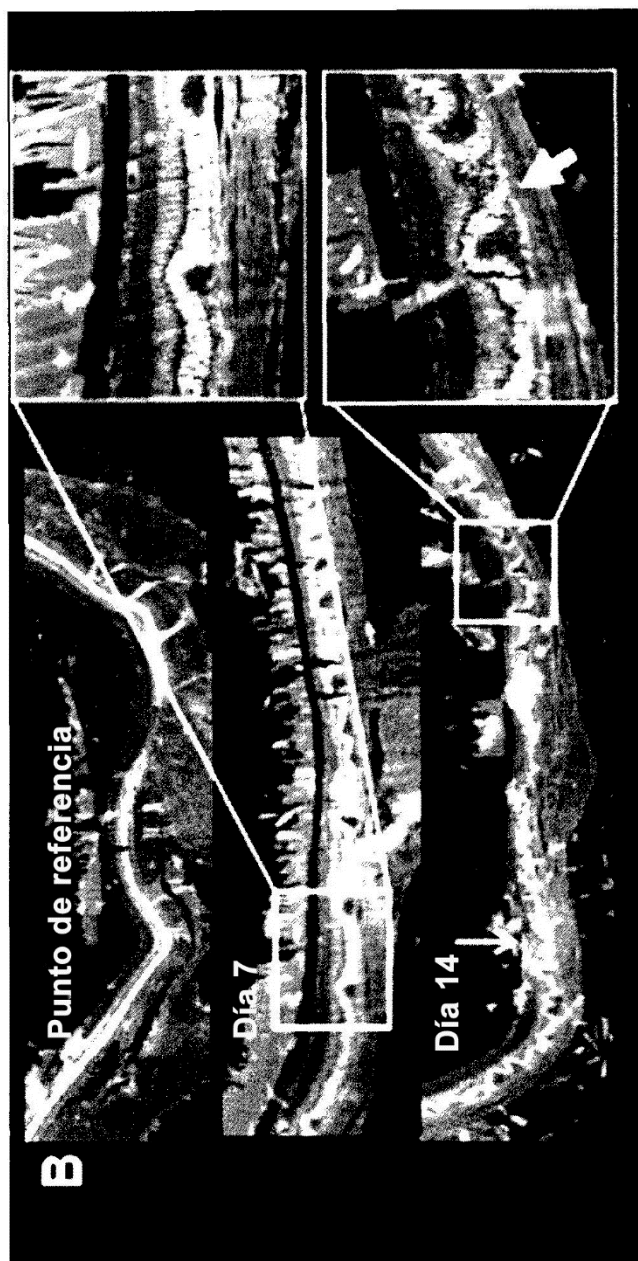


FIG. 8B

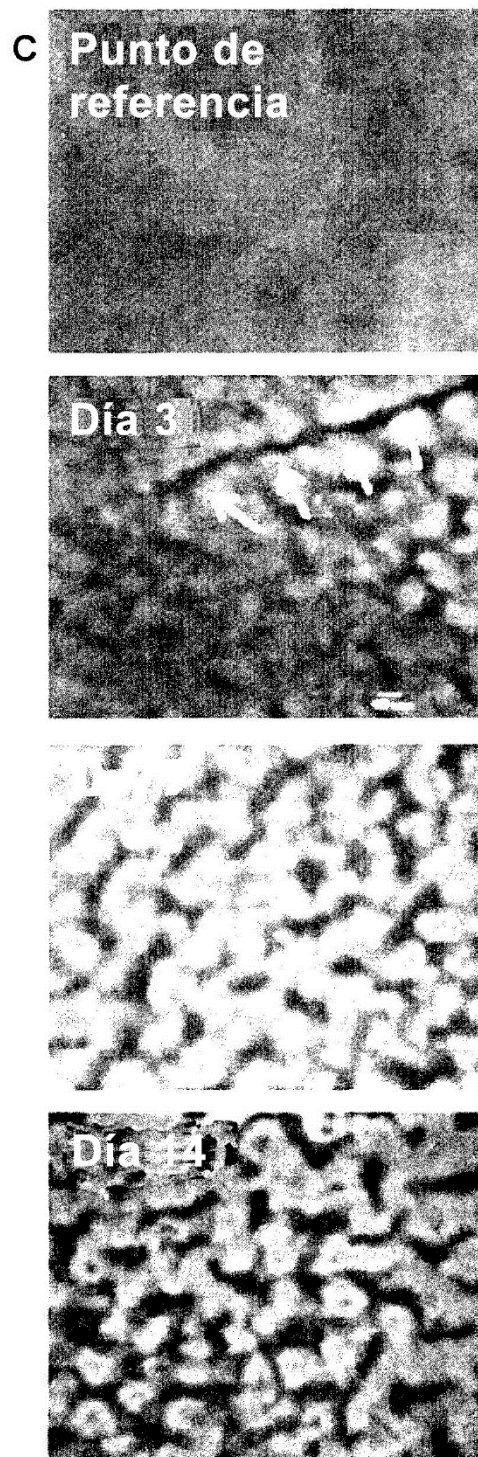
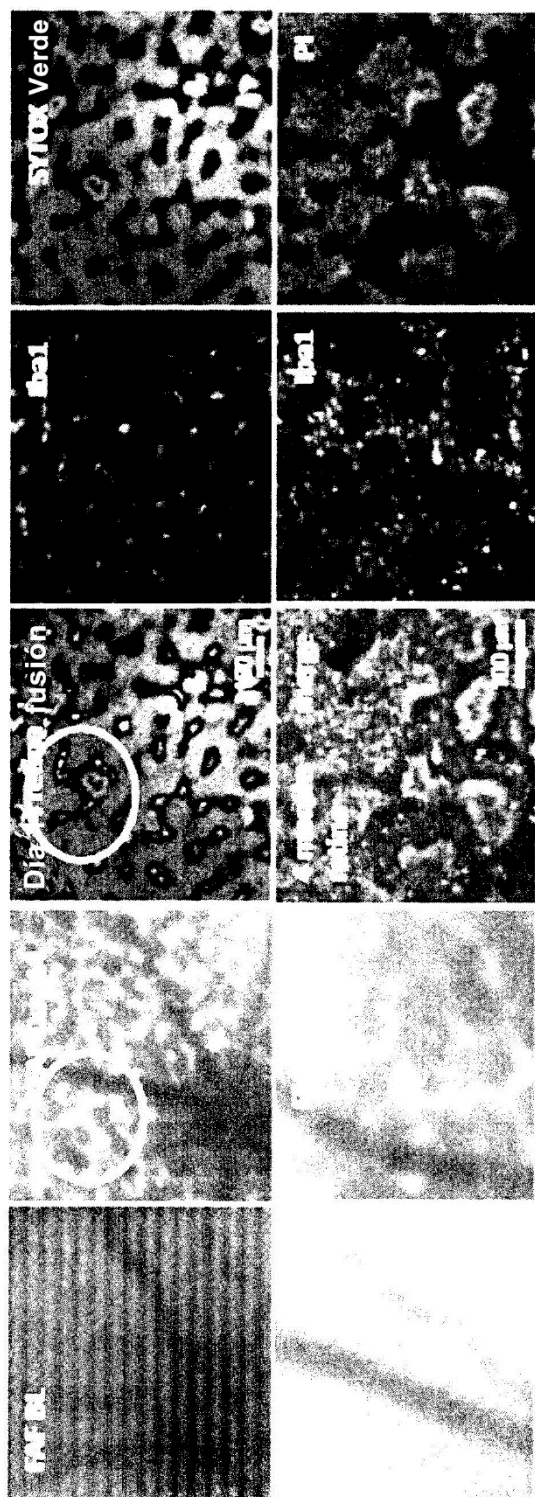


FIG. 8C



A

FIG. 9A

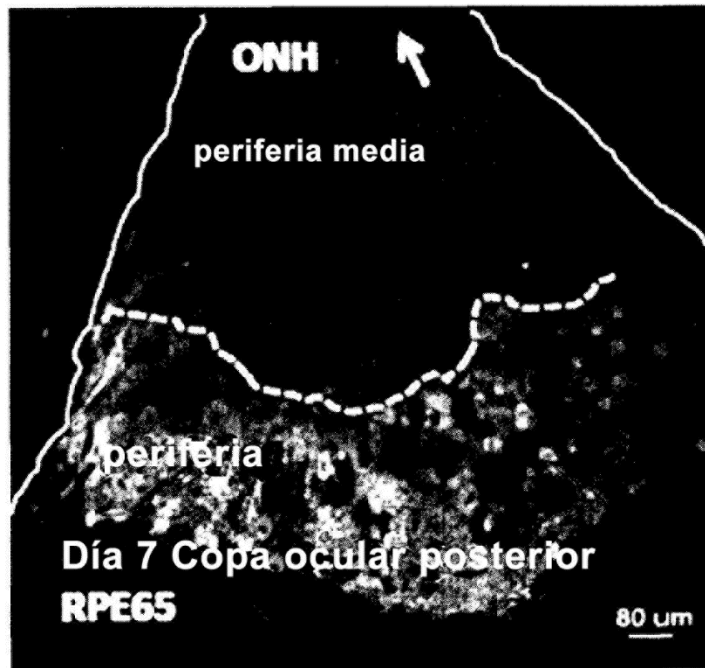


FIG. 9B

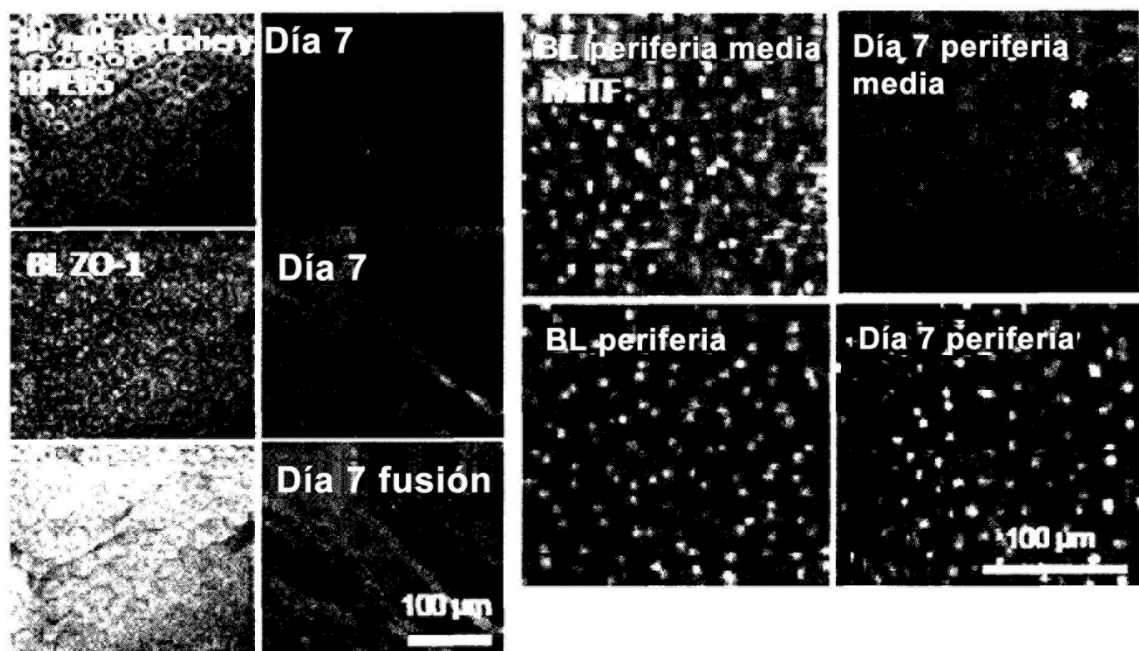


FIG. 9C

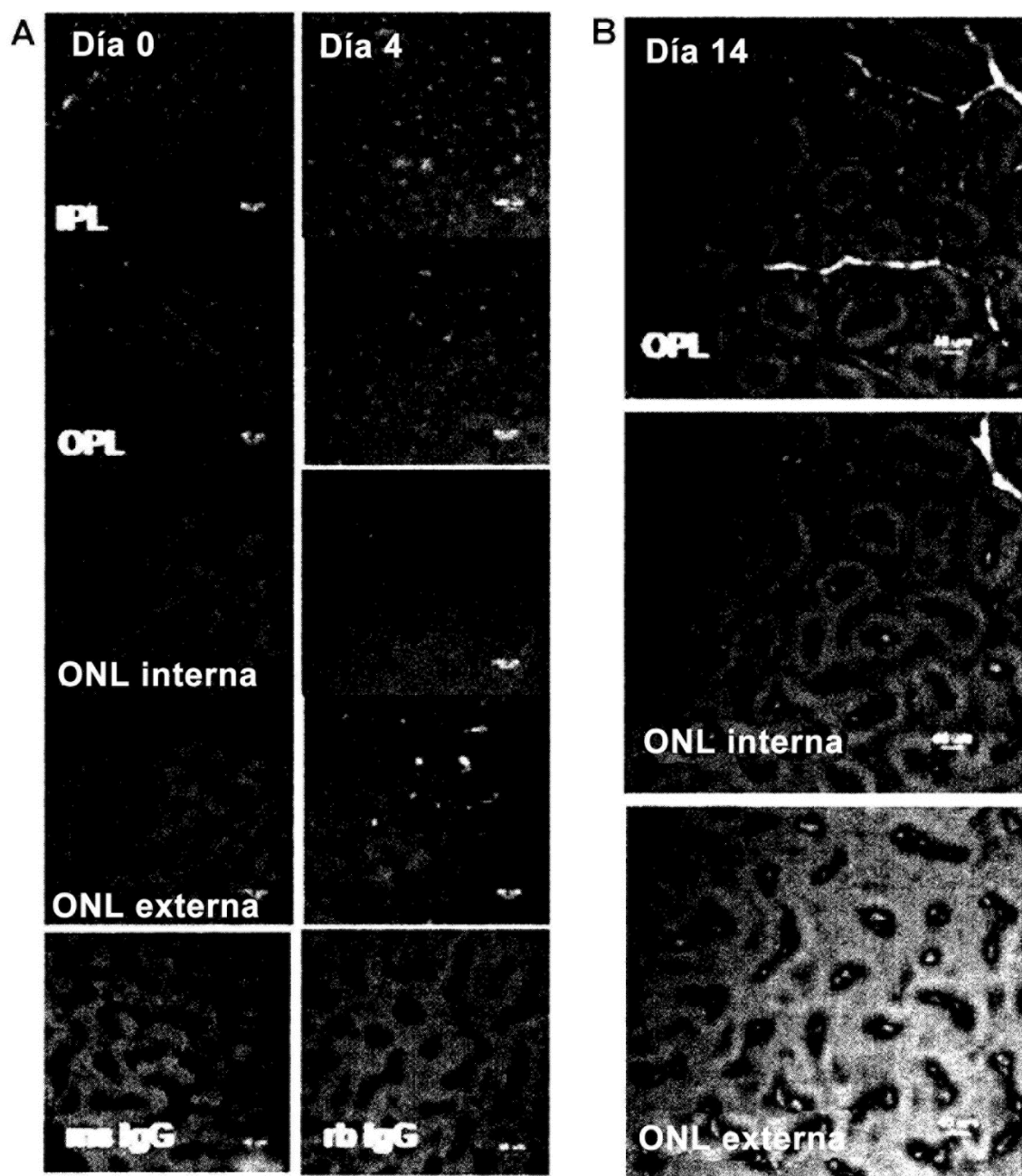


FIG. 10A-B

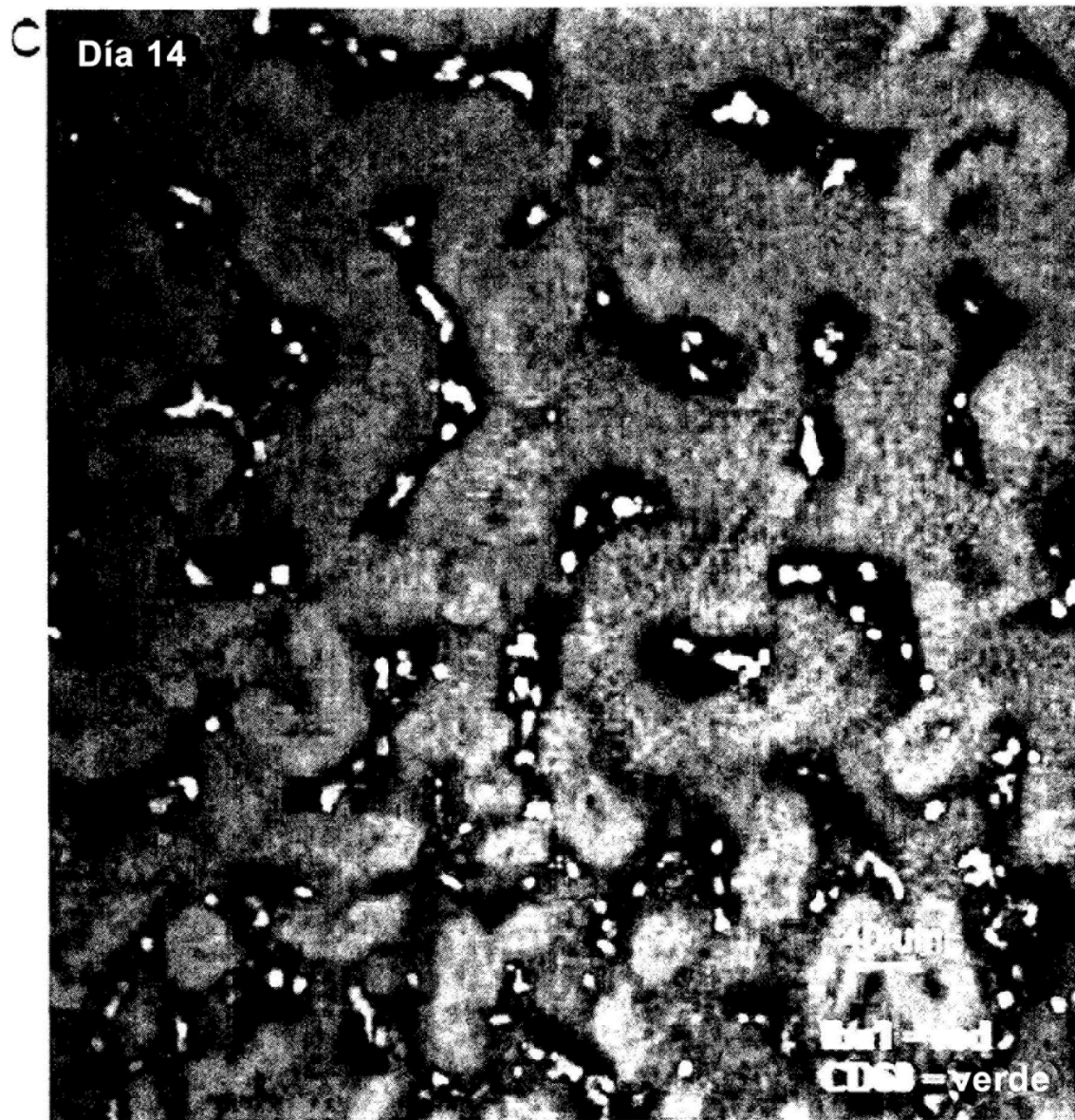


FIG. 10C

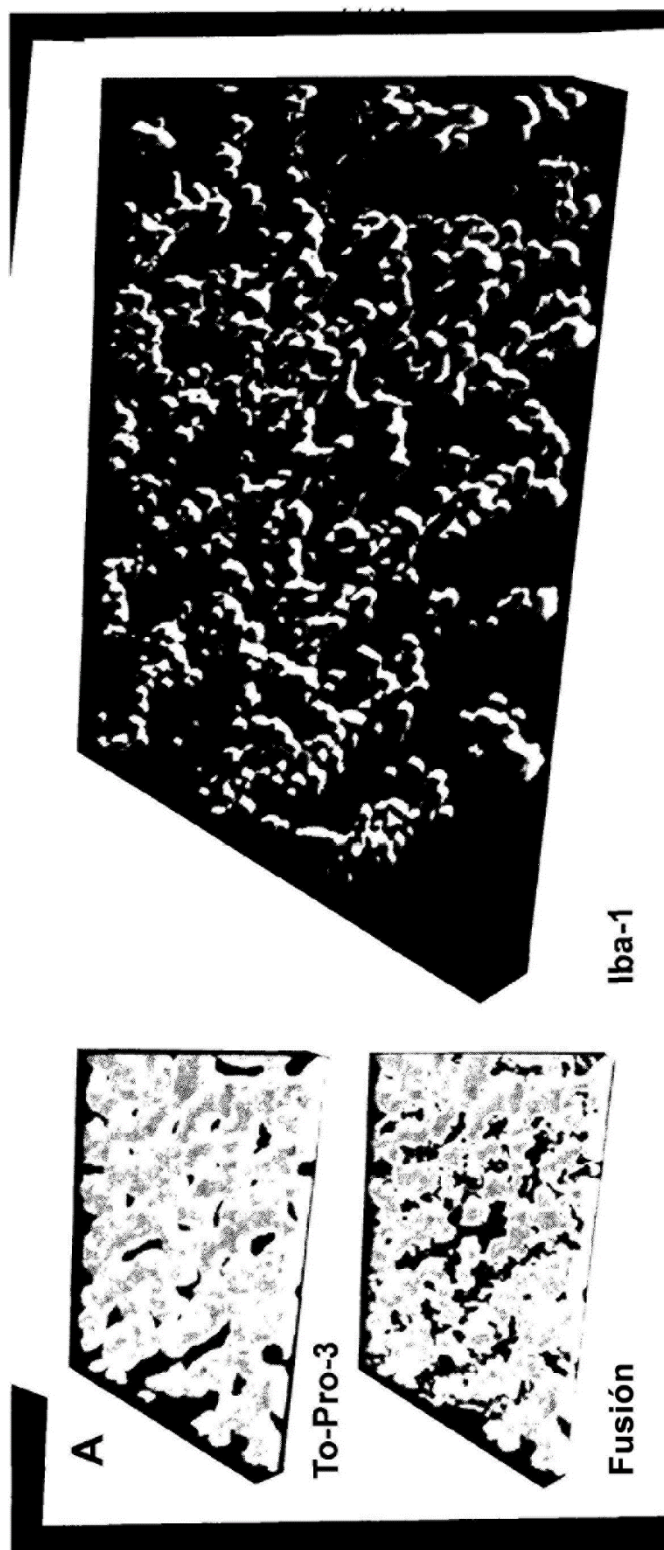


FIG. 11A

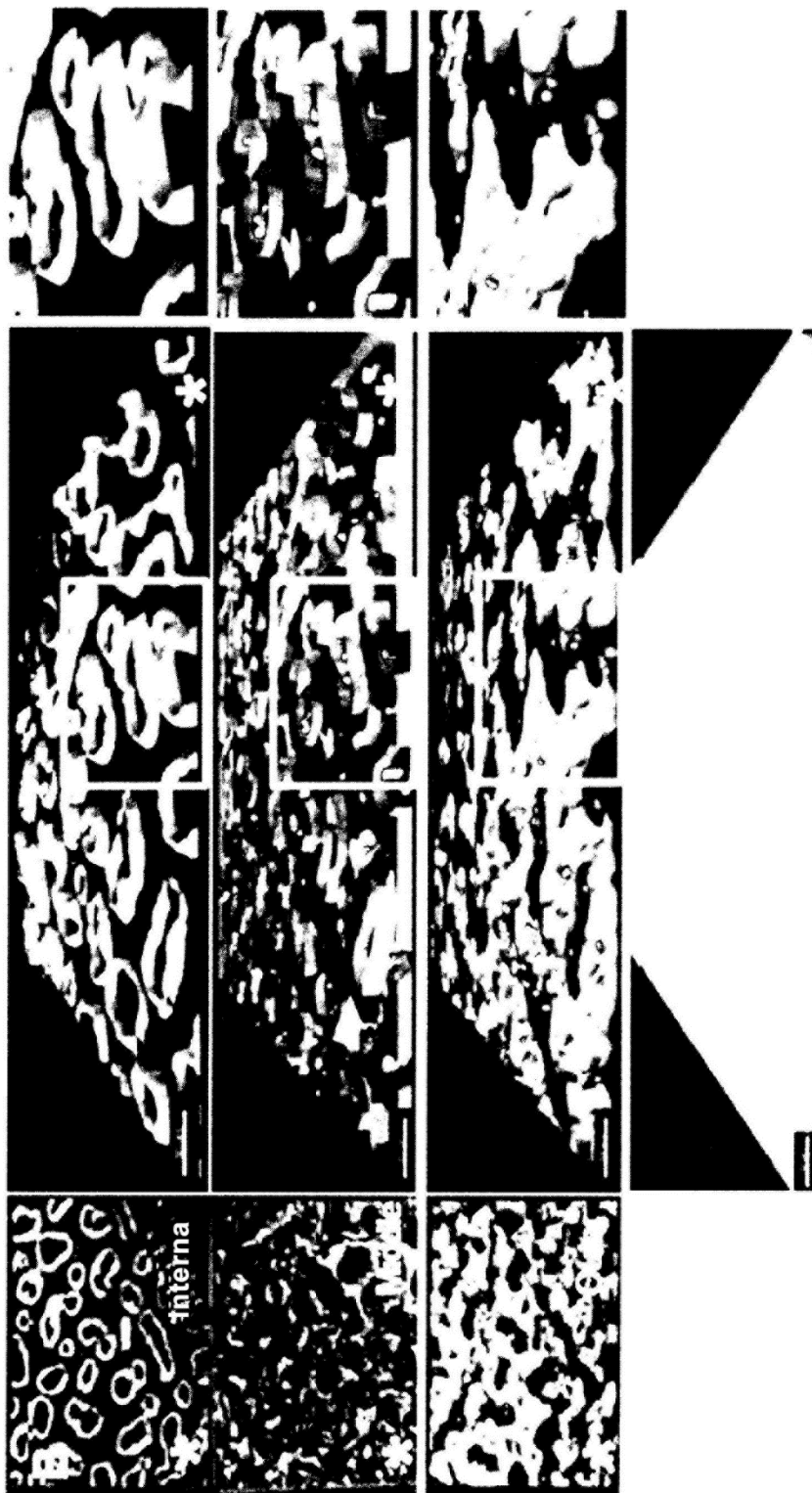


FIG. 11B

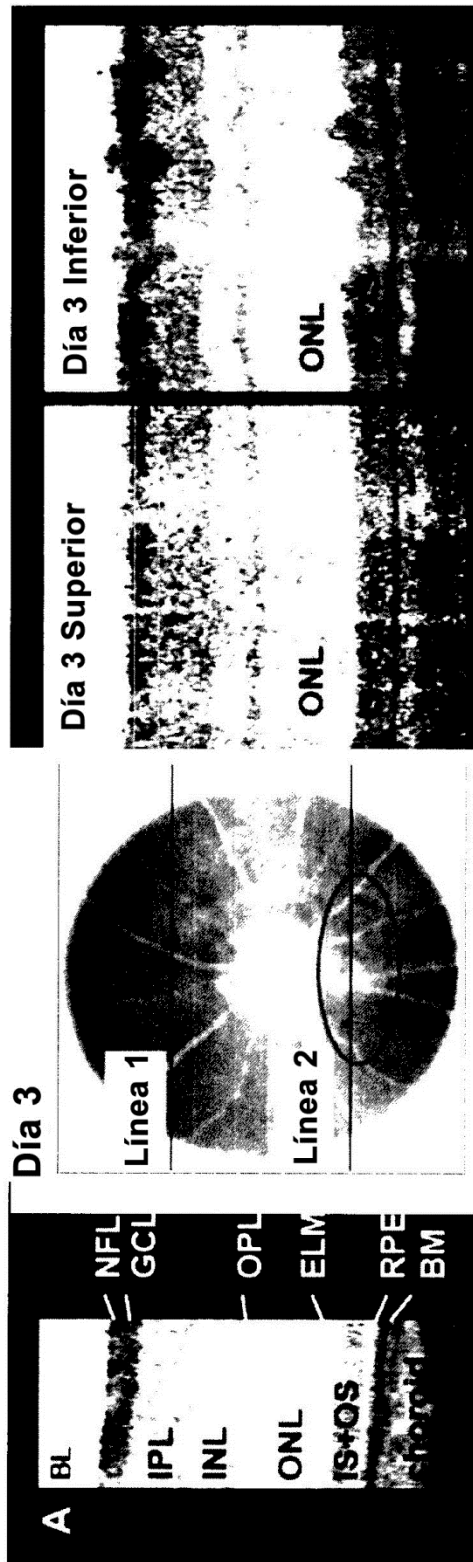


FIG. 12A

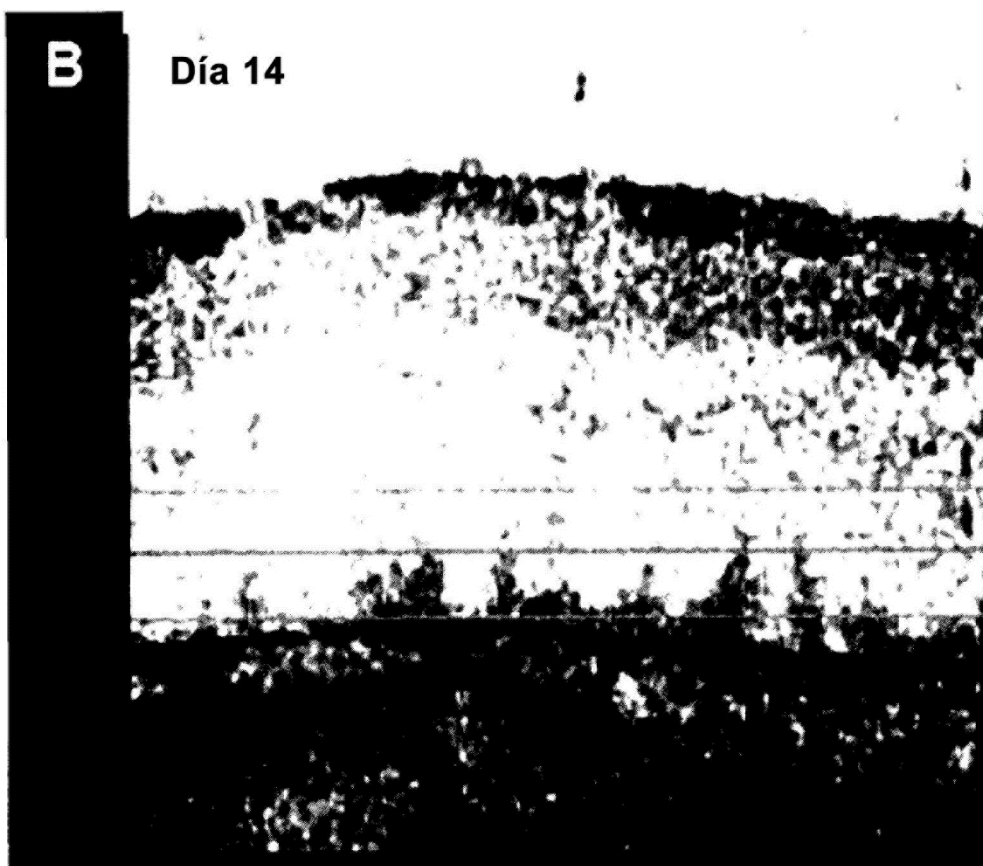


FIG. 12B



FIG. 12C



FIG. 12D

A

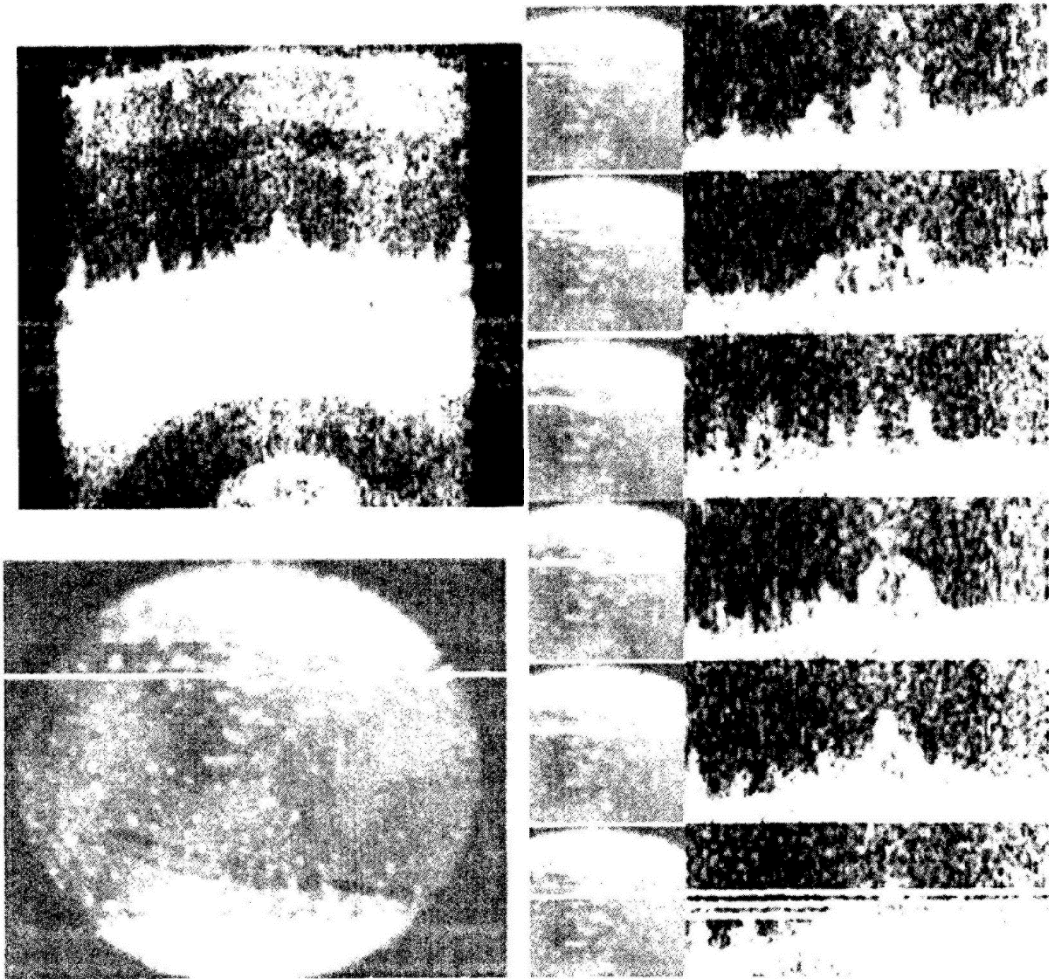


FIG. 13A

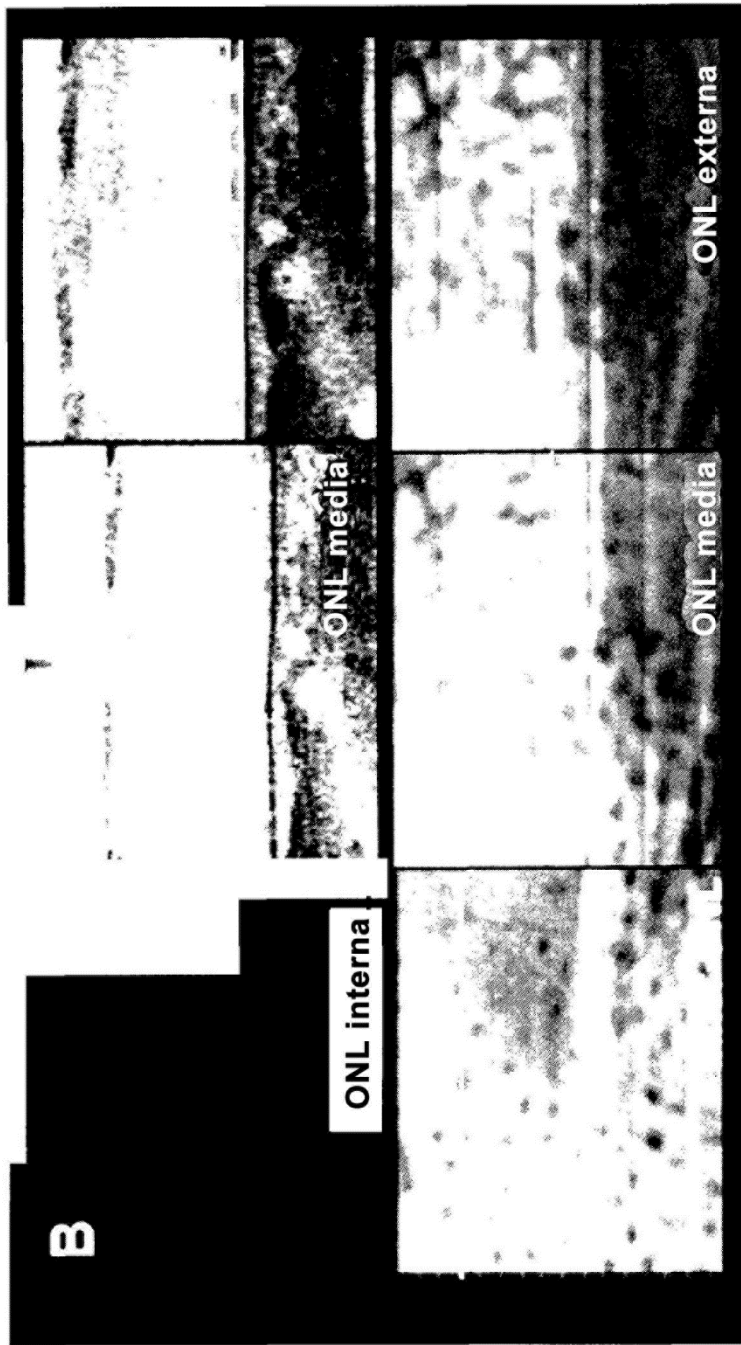


FIG. 13B

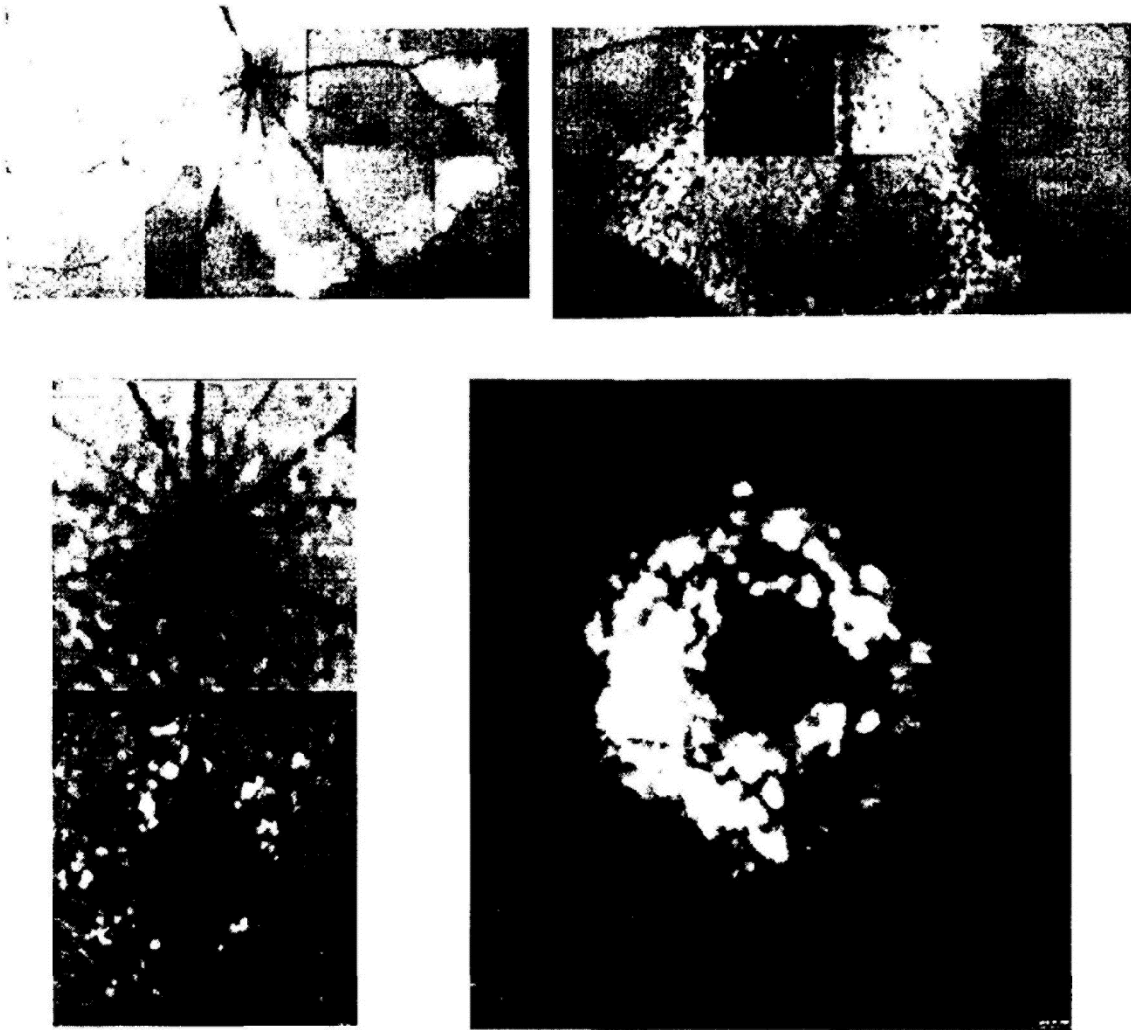


FIG. 14A

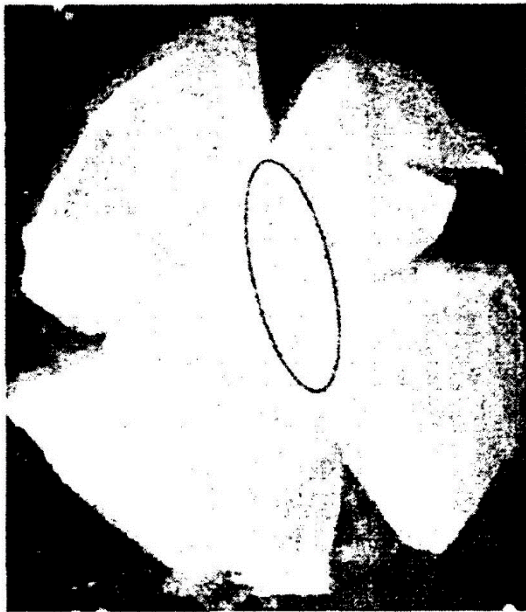


FIG. 14B

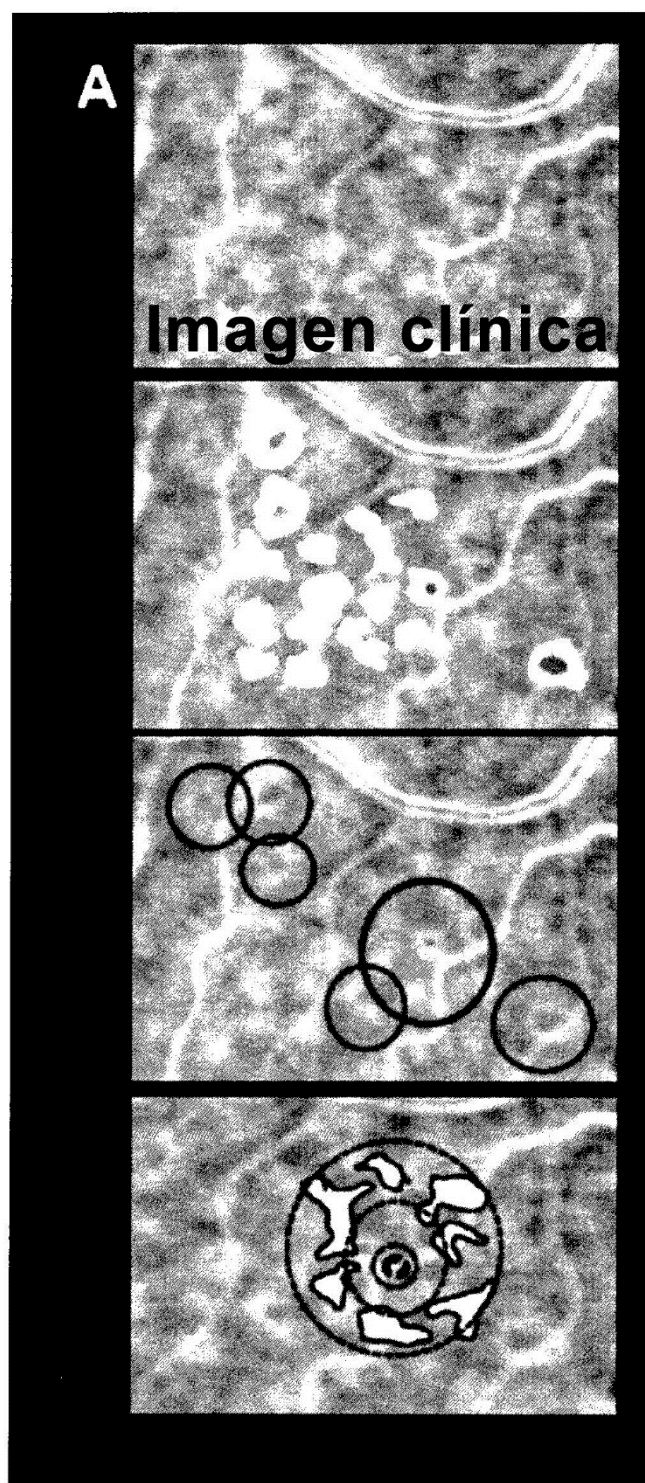


FIG. 15A

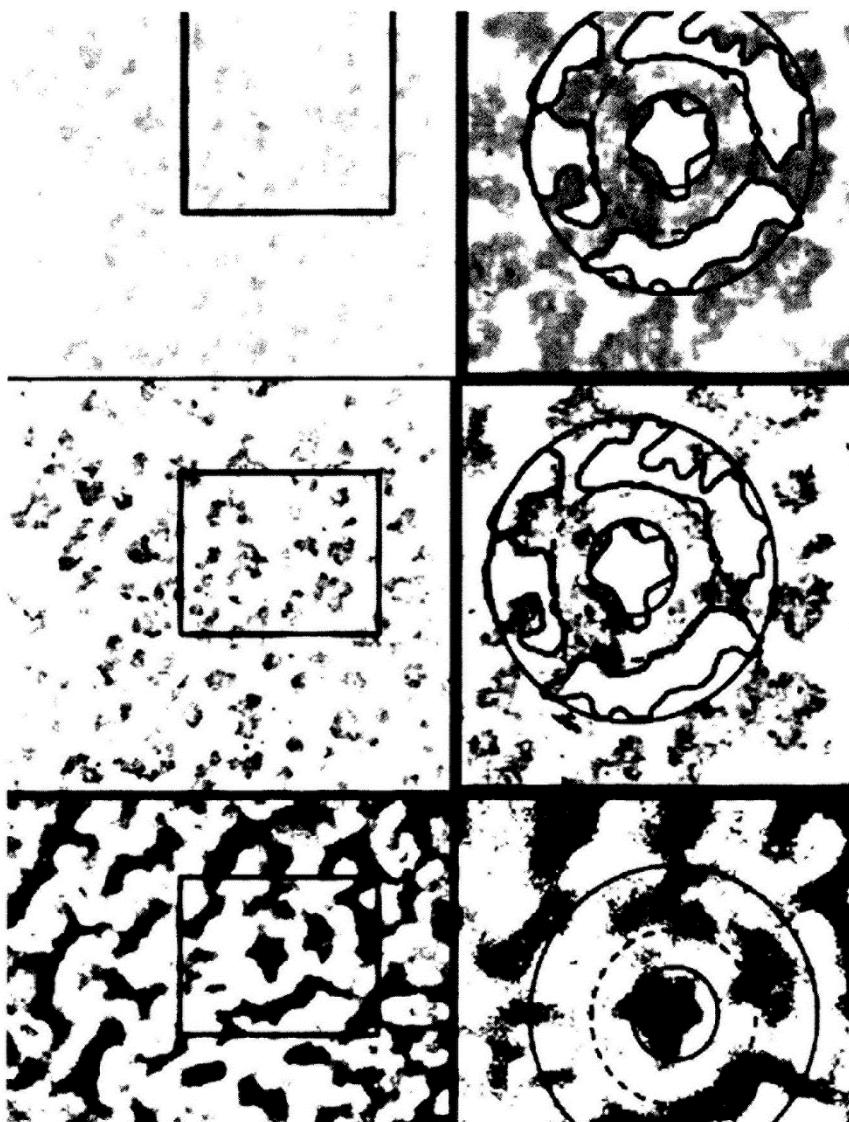


FIG. 15B

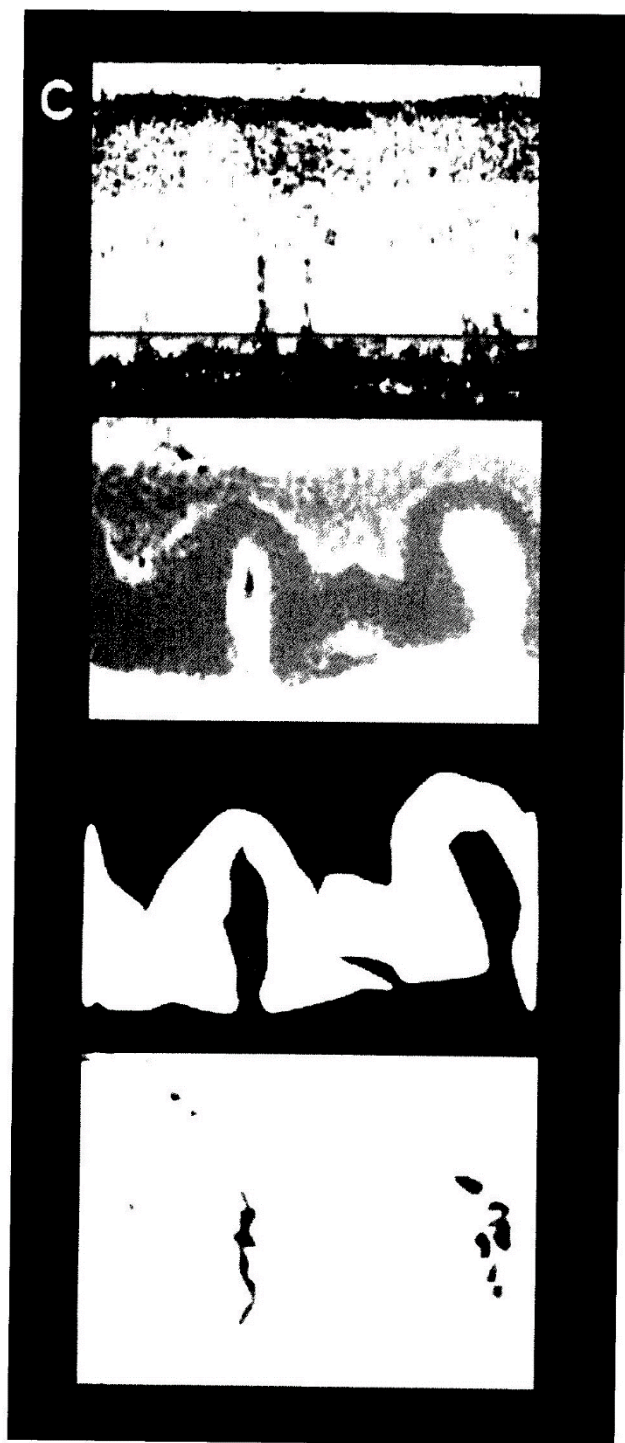


FIG. 15C