

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 012 058**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2015 E 20198697 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024 EP 3855181**

54 Título: **Compuestos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la lipofuscina**

30 Prioridad:

13.02.2014 EP 14155057

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

08.04.2025

73 Titular/es:

KATAIRO GMBH (50.00%)

Lederstrasse 21

72127 Kusterdingen, DE y

TAKEDA GMBH (50.00%)

72 Inventor/es:

SCHRAERMAYER, ULRICH;

BURNET, MICHAEL;

SENN-BILFINGER, JÖRG;

STURM, ERNST y

HANAUER, GUIDO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 3 012 058 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

Compuestos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la lipofuscina

Campo de la divulgación

5 La presente invención se refiere al campo de las enfermedades, asociadas con la lipofuscina del ojo de los mamíferos. Entre otras cosas, proporciona un compuesto para uso en el tratamiento de las enfermedades oculares asociadas con la lipofuscina.

Antecedentes de la invención

10 Lipofuscina es un término general para describir los depósitos lisosómicos de materiales insolubles que se acumulan en los tejidos de los organismos en proceso de envejecimiento o debido a deficiencias genéticas en los mecanismos comunes de eliminación hidrófuga (por ejemplo, mutaciones de transportadores ABC). En su sentido más amplio, la acumulación de cantidades críticas de lipofuscina es patológica en cualquier tejido, pero especialmente en los tejidos del SNC donde la pérdida de la función celular por la lipofuscina es particularmente evidente.

15 Se ha encontrado que la lipofuscina, que es una sustancia rica en lípidos, se acumula en las células postmitóticas de, por ejemplo, el cerebro, el corazón o el epitelio pigmentario de la retina en el ojo durante toda la vida. La composición es compleja y aún está bajo investigación. En el ojo, un componente importante y bien caracterizado de la lipofuscina es el fluoróforo N-retinilideno-N-retiniletanolamina (A2E), un subproducto del ciclo visual. Se puede detectar histológicamente por sus propiedades de autofluorescencia. El origen de la lipofuscina en el EPR todavía está en debate (C J Kennedy, P E Rakoczy e I J Constable, 'Lipofuscin of the
20 Retinal Pigment Epithelium: A Review', Eye (Londres, Inglaterra), 9 (Pt 6) (1995), 763-771.).

25 La lipofuscina se forma particularmente en tejidos con alto estrés oxidativo (A Terman y U T Brunk, 'Lipofuscin: Mechanisms of Formation and Increase with Age', APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 106 (1998), 265-276.). Se acumula progresivamente con el tiempo en lisosomas de células postmitóticas, como neuronas y miocitos cardíacos y el epitelio pigmentario de la retina (EPR). Los mecanismos exactos detrás de esta acumulación aún no están claros y pueden variar en diferentes enfermedades. Numerosos estudios indican que la formación de lipofuscina se debe a la alteración oxidativa de macromoléculas por radicales libres derivados del oxígeno generados en reacciones catalizadas por hierro redox-activo de bajo peso molecular. Se han sugerido dos explicaciones principales para el aumento de la lipofuscina con la edad. El primero se basa en la noción de que la lipofuscina no se elimina totalmente (ya sea por degradación o exocitosis) incluso a una edad temprana y, por lo tanto, se acumula en las células postmitóticas en función del tiempo. Dado que las reacciones oxidativas son obligatorias de por vida, actuarían como potenciadores independientes de la edad de la acumulación de lipofuscina, así como de muchas otras manifestaciones de senescencia. La segunda explicación es que el aumento de la lipofuscina es un efecto del envejecimiento que es causado por una mejora de la autofagocitosis relacionada con la edad, una disminución
30 en la degradación intralisosomal y/o una disminución en la exocitosis.

35 Una función general del metabolismo es mantener los compuestos en solución para permitir que se eliminen mediante mecanismos de solución (por ejemplo, orina) o mecanismos de descarga que se llevan a cabo por parte de transportadores ABC. Para esta función, la célula contiene enzimas para oxidar y conjugar incluso compuestos lipofílicos. Sin embargo, los componentes particularmente lipofílicos, como los pigmentos, son susceptibles a reacciones redox que pueden conducir a la reticulación y la consiguiente precipitación. Una vez precipitados, las interacciones hidrófugas estabilizan el precipitado y, por lo tanto, presentan pocos o ningún sitio donde el material pueda interactuar con las bolsas de reacción generalmente profundas de las enzimas hidrolíticas. Los depósitos hidrófobos son, a su vez, propensos a seguir interactuando y precipitar otras especies hidrófugas. Por lo tanto, la acumulación de lipofuscina representa una forma estabilizada de detritos
40 hidrófugos que parece inaccesible a la eliminación metabólica normal por parte de enzimas.

45 Las lipofuscinosis y las lipofuscinopatías son, por lo tanto, enfermedades caracterizadas por altos niveles de depósitos de lipofuscina como resultado del envejecimiento o defectos metabólicos. Las enfermedades degenerativas del ojo, asociadas con la lipofuscina, tienen en común que la lipofuscina se acumula en las células del EPR. Tales enfermedades incluyen la degeneración macular relacionada con la edad, la enfermedad de Stargardt, la enfermedad de Best y las subpoblaciones de retinitis pigmentosa.

50 En la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), los estadios tempranos con capacidad visual completa de los pacientes se distinguen de los estadios avanzados con discapacidad visual inicial a grave. Para estadios avanzados de DMAE, se diferencian la DMAE atrófica con atrofia geográfica y la DMAE exudativa (o DMAE neovascular húmeda sinónima) con neovascularización coroidea. Por lo general, pero no en todos los casos, la DMAE atrófica ocurre en el ojo antes del desarrollo de la forma exudativa. Todos los estadios tempranos de la DMAE y la DMAE atrófica avanzada generalmente se resumen como DMAE seca (ver Fig. 1). Todos los estadios de la DMAE se caracterizan por la formación de drusas y la acumulación de lipofuscina en las células RPE. La DMAE seca avanzada se caracteriza además por la degeneración completa e irreversible

del tejido de neurorretina formando áreas claramente demarcadas de atrofia de EPR, la llamada atrofia geográfica. La atrofia geográfica que se extiende a la mácula, el área de la retina responsable de la agudeza visual (Fig. 1), afectará seriamente la capacidad de leer, reconocer caras o dedicarse a actividades cotidianas como caminar, conducir o ir de compras. Como tal, el impacto de la DMAE en la calidad de vida y la independencia del paciente puede ser devastador. En la DMAE húmeda, además de las características de la DMAE temprana y generalmente también de la DMAE seca avanzada, tiene lugar la neovascularización.

La enfermedad de Stargardt (código de enfermedad H35.5 según ICD-10) es una degeneración macular juvenil hereditaria grave debida a una mutación autosómica recesiva del gen ABCA4 o a una mutación autosómica dominante del gen ELOVL 4. Comienza en la infancia tardía. Junto con la progresión de la enfermedad, los depósitos ricos en lípidos (lipofuscina) se acumulan en la capa de epitelio pigmentario de la retina (EPR) debajo de la mácula. En la enfermedad de Stargardt avanzada, la acumulación de lipofuscina causa atrofia del EPR y posteriormente de la mácula suministrada por esta área del EPR. En el estadio final, la enfermedad de Stargardt conduce a la ceguera legal.

La enfermedad de Best, también denominada distrofia macular viteliforme o distrofia viteliforme, es una lipofuscinosis retiniana que conduce a una pérdida progresiva de la visión en la mácula. La forma de inicio temprano, la enfermedad de Best, está causada por mutaciones del gen que codifica el transportador de cloruro bestropina, VMD2, y generalmente aparece en la infancia. La forma de inicio tardío comienza en la mediana edad, y tiende a ser más leve y se asocia en aproximadamente el 25% de los casos con mutaciones de VMD2 o RDS (periferina).

La retinosis pigmentaria (RP) es un grupo de enfermedades hereditarias de la retina. Los pacientes con RP desarrollan una degeneración de los fotorreceptores y las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR). La RP culmina en la degeneración de los fotorreceptores en la fóvea reduciendo la visión central. La RP es una de las principales causas de ceguera adquirida en los países desarrollados. Se observan niveles anormales de acumulación de lipofuscina en más de la mitad de los pacientes con RP.

Las enfermedades asociadas con la lipofuscina también se encuentran en otros tejidos. Por ejemplo, lipofuscinosis ceroides neuronales (NCL) es el nombre general de una familia de al menos ocho trastornos neurodegenerativos genéticamente separados que resultan de la acumulación excesiva de lipofuscina en los tejidos del cuerpo. Las lipofuscinosis ceroides neuronales (NCL) se caracterizan por un deterioro intelectual y motor progresivo, convulsiones y muerte prematura. La pérdida visual es una característica de la mayoría de las formas.

La causa principal responsable de la enfermedad de Alzheimer (DA) sigue siendo desconocida. Se ha identificado la proteína A β como el componente principal del amiloide de las placas seniles, la lesión distintiva de la EA, pero no es seguro si la formación de depósitos extracelulares de A β es la causa principal de la serie de eventos patológicos en el cerebro en el curso de la EA esporádica. La lipofuscina es un producto relacionado con la edad relativamente pasado por alto y se ha formulado la hipótesis de que su liberación en el espacio extracelular después de la muerte de las neuronas puede contribuir a la formación de placas seniles. La presencia de A β intraneuronal, las similitudes entre la EA y la degeneración macular relacionada con la edad, y la posible explicación de algunos de los problemas desconocidos en la EA sugieren que se debe considerar una contribución de la lipofuscina a la patología de la EA (Giorgio Giaccone y otros, 'Lipofuscin Hypothesis of Alzheimer's Disease', *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 1 (2011), 292-296 <doi:10.1159/000329544>.). Al mismo tiempo, se han establecido efectos negativos de la lipofuscina en, por ejemplo, el sistema proteasómico (Annika Höhn y Tilman Grune, 'Lipofuscin: Formation, Effects and Role of Macroautophagy', *Redox biology*, 1 (2013), 140-144 <doi:10.1016/j.redox.2013.01.006>.).

Se ha encontrado que los tetrahidropiridoéteres (THPE), en particular (7R, 8R, 9R)-2,3-dimetil-8-hidroxi-7-(2-metoxietoxi)-9-fenil-7,8,9,10-tetrahidro-imidazo[1,2-h] [1,7]naftiridina (Nombre DCI: Soraprazan) y sus sales y compuestos relacionados eliminan la lipofuscina natural de las células EPR y, por lo tanto, pueden servir como ingrediente activo en el tratamiento de la degeneración de la DMAE, en particular de la DMAE seca y la enfermedad de Stargardt (EP 2080513 A1). El efecto se ha observado en monos sanos que eliminan la lipofuscina acumulada naturalmente (Sylvie Julien y Ulrich Schraermeyer, 'Lipofuscin Can Be Eliminated from the Retinal Pigment Epithelium of Monkeys', *Neurobiology of aging*, 33 (2012), 2390-2397 <doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.12.009>.), en células de EPR humanas de donantes envejecidos (S. Julien y otros, 'Lipofuscin Can Be Eliminated From Retinal Pigment Epithelium After Drug Treatment', *ARVO Meeting Abstracts*, 51 (2010), 481.), y en ratones que exhiben un defecto genético que se cree que sirve como modelo para la enfermedad de Stargardt. Sin embargo, se desconocía el modo de acción de los compuestos de THPE.

Wu et al. (2011) *J Am Chem Soc* 133, 849-857 divulgan la degradación de A2E por HRP (peroxidasa de rábano picante). La HRP debe administrarse activamente a las células. En Wu et al. (2011), se utilizó un enfoque que utiliza un reactivo basado en lípidos para encapsular moléculas, formando así complejos que se adhieren a las superficies celulares cargadas negativamente y se internalizan.

Resumen de la invención

La invención proporciona un compuesto para su uso en el tratamiento de enfermedades oculares asociadas con la lipofuscina por degradación de la lipofuscina, en el que la enfermedad se selecciona de la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), la enfermedad de Stargardt, la enfermedad de Best y la retinosis pigmentaria, y en la que el compuesto es riboflavina.

- 5 En una realización preferida, el tratamiento comprende administrar una inyección intravenosa o intravítrea del compuesto a un paciente con una lipofuscinopatía retiniana.

Preferiblemente, el tratamiento comprende además una iluminación del ojo. De acuerdo con una realización preferida, el tiempo de iluminación está en el intervalo de 1 min a 72 h, preferiblemente en el rango de 2 min a 48 h, más preferiblemente en el intervalo de 3 min a 48 h. En una realización preferida, la radiancia de la luz de iluminación está en el intervalo de 0.001 a 1 W/cm², preferiblemente en el intervalo de 0.02 a 0.9 W/cm², más preferiblemente en el intervalo de 0.03 a 0.7 W/cm², lo más preferiblemente en el intervalo de 0.04 a 0.6 W/m². Se prefiere que la luz tenga una longitud de onda en el intervalo de 380 nm a 800 nm, preferiblemente la luz tiene una longitud de onda en el intervalo de 380 nm a 650 nm, lo más preferiblemente, la luz para iluminación tiene una longitud de onda en el intervalo de 380 nm a 500 nm. Preferiblemente, la luz es diferente de la luz láser.

El compuesto para uso de acuerdo con la invención se administra preferiblemente a una dosis por ojo en mg de menos de 1/10000, más preferiblemente menos de 1/2000, e incluso más preferiblemente menos de 1/1000 de la dosis corporal total calculada en mg.

Se encontró sorprendentemente que los compuestos que comprenden la combinación de un factor de reactividad, como, por ejemplo, un agente que proporciona radicales y un factor objetivo como, por ejemplo, la lipofilia de la molécula, pueden degradar la lipofuscina en las células.

El factor de reactividad es preferiblemente un agente que proporciona radicales. Por lo tanto, el factor de reactividad puede oxidar la lipofuscina y, en consecuencia, causar una degradación y disolución de los agregados de lipofuscina. Como se muestra, por ejemplo, en el ejemplo 1, un eliminador de radicales abole la degradación de la lipofuscina causada por el compuesto de prueba. Para oxidar la lipofuscina, el factor de reactividad tiene que estar cerca de los depósitos de lipofuscina y, por lo tanto, debe ingresar a una célula que contiene lipofuscina y dirigirse a la lipofuscina en la célula. El factor de direccionamiento permite una entrada del compuesto o composición en una célula y garantiza un direccionamiento del compuesto o composición a la lipofuscina en la célula.

30 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra una visión general esquemática de los diferentes estadios de DMAE

La Fig. 2A a H muestra micrografías de EPR de células después de una semana de incubación con compuestos de prueba e iluminación. Las imágenes corresponden a los siguientes compuestos de prueba: A) 50 µg/ml Donante de Anión superóxido (SAD), B) 50 µg/ml SAD, 10 µM cardioxano, C) 50 µg/ml SAD, 50 µM cardioxano, D) 50 µg/ml SAD, 100 µM cardioxano, E) ningún compuesto de prueba, F), 10 µM cardioxano, G) 50 µM cardioxano, H) 100 µM cardioxano. En las imágenes originales, la lipofuscina en las células es visible como una estructura fluorescente de color amarillo-oro-naranja, antes del fondo azul. Las áreas de degradación de lipofuscina en las células de hRPE aparecen como estructuras brillantes de color azul a blanquecino. En la reproducción de la escala de grises de la Fig. 2 las estructuras amarillo-oro-naranja aparecen de color gris claro (amarillo) o gris oscuro (oro) ante un fondo gris. Las estructuras originalmente brillantes de azul a blanquecino están rodeadas en círculos en la reproducción de la escala de grises.

La Fig. 3A. muestra un diagrama de columnas que representa los resultados del estudio de unión de diferentes compuestos con partículas de melanina y A2E. La altura de la columna indica la proporción de compuesto unido a la partícula de melanina A2E después de la incubación. La Fig. 3B muestra el espectro de absorbancia de luz del soraprazán en agua sola o en combinación con FeCl₃, el espectro de absorción de luz de FeCl₃ solo, y el espectro de diferencia de soraprazán más FeCl₃ y soraprazán.

La Fig. 4 muestra los resultados de una medición de citometría de flujo de células ARPE19 tratadas con células A2E y ARPE19 no tratadas. Estos datos muestran que las células ARPE aceptan A2E, que es detectable como un cambio en la fluorescencia.

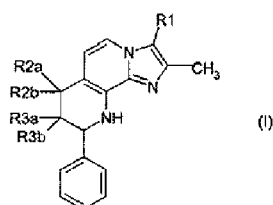
50 La Fig. 5 muestra micrografías electrónicas de secciones semidelgadas de los ojos de ratones que carecen del transportador Abca4, ya sea sin tratar (Fig. 5a) o verteporfina tratada (Fig. 5b). La flecha indica la capa de celda EPR. Las células EPR de ratones no tratados son mucho más densas que las células EPR de ratones tratados.

La Fig. 6 muestra un cromatograma a partir de una separación de la muestra estándar A2E 33 µM, utilizando detección selectiva de masa (azul, estándar interno, rojo m/z 592, verde m/z 608).

La Fig. 7 muestra un cromatograma de un extracto ocular, utilizando la detección selectiva de masa (azul, estándar interno, rojo m/z 592, verde m/z 608).

Descripción detallada de la invención

5 Según la invención, se proporciona un compuesto que comprende al menos un factor de reactividad y al menos un factor de focalización que permite una captación en una célula y proporciona una focalización de la lipofuscina, para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a la lipofuscina del ojo mediante la degradación de la lipofuscina, en donde el compuesto no es un compuesto de fórmula (I).



10 en donde R1 es metilo o hidroximetilo, uno de los sustituyentes R2a y R2b es hidrógeno y el otro es hidroxilo, metoxi, etoxi, isopropoxi, metoxietoxi o etoxipropoxi, uno de los sustituyentes R3a y R3b es hidrógeno y el otro es hidroxilo, metoxi, etoxi, isopropoxi, metoxietoxi o metoxipropoxi,

en donde la enfermedad se selecciona entre degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), enfermedad de Stargardt, enfermedad de Best y retinitis pigmentosa,

y en donde el compuesto es riboflavina.

15 Según la invención, el compuesto es riboflavina. La riboflavina es un metabolito natural de las células y, por lo tanto, es altamente tolerada por las células.

20 Según una realización, el tratamiento de enfermedades relacionadas con la lipofuscina incluye una disminución de la lipofuscina celular en las células de un paciente. La disminución de la lipofuscina celular puede ser una disminución del tamaño de los agregados de lipofuscina y/o la reducción de las cantidades de agregados de lipofuscina. Preferiblemente, el tratamiento de una enfermedad relacionada con la lipofuscina incluye la eliminación de los agregados de lipofuscina.

25 El compuesto puede administrarse al paciente para tratar una enfermedad asociada a la lipofuscinopatía de acuerdo con cualquier vía de administración conocida. Las vías de administración ejemplares son oral, parenteral, mucosal, enteral o percutánea. El compuesto puede administrarse por vía oral en forma de, por ejemplo, una píldora, una cápsula o en forma líquida. Las formas de administración parenteral incluyen inyectar el compuesto o la composición en una vena (intravenosa). De acuerdo con una realización, el tratamiento comprende administrar una inyección intravenosa del compuesto a un paciente con una lipofuscinopatía retiniana. Alternativamente, el compuesto puede administrarse por inyección directa en el tejido afectado, por ejemplo, el vítreo (intravítreo) o la conjuntiva (conjuntival). De acuerdo con una realización del compuesto para su uso, el tratamiento comprende administrar una inyección intravítrea del compuesto a un paciente con una lipofuscinopatía retiniana. Esta vía de administración está asociada con una dosis total más baja, una concentración más alta en el sitio de la enfermedad y una exposición sistémica más baja. Otras formas de administración parenteral son, por ejemplo, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, intracardíaca y subcutánea.

35 El tratamiento puede comprender además una iluminación del ojo con luz visible. Para la iluminación se puede utilizar una fuente de luz que proporcione todo el espectro de luz visible. Alternativamente, se pueden emplear fuentes de luz que proporcionen luz de longitudes de onda específicas. Según una realización, la luz tiene una longitud de onda en el intervalo de 380 nm a 800 nm. Preferiblemente, la luz tiene una longitud de onda en el intervalo de 380 nm a 650 nm. Lo más preferiblemente, la luz para la iluminación tiene una longitud de onda en el intervalo de 380 nm a 500 nm.

45 Según una realización, el tratamiento comprende un tiempo de iluminación que está en el intervalo de 1 min a 72 h, preferiblemente en el intervalo de 2 min a 48 h, más preferiblemente en el intervalo de 3 min a 30 h. El tiempo de iluminación de un tratamiento de iluminación corto está en el intervalo de 1 min a 1 h, preferiblemente en el intervalo de 2 min a 30 min, más preferiblemente en el intervalo de 3 min a 10 min, lo más preferiblemente en el intervalo de 4 a 6 min. El tiempo de iluminación de un tratamiento de iluminación prolongado está en el intervalo de 1 h a 72 h, preferiblemente en el intervalo de 2 h a 48 h, más preferiblemente en el intervalo de 3 h a 30 h.

50 Según una realización, la radiancia de la luz de iluminación está en el intervalo de 0.01 a 1 W/cm² preferiblemente en el intervalo de 0.02 a 0.9 W/cm², más preferiblemente en el intervalo de 0.03 a 0.7 W/cm², lo más preferiblemente en el intervalo de 0.04 a 0.6 W/m². En caso de un tiempo de iluminación corto, la

- radiancia de la luz de iluminación está en el intervalo de 0.1 a 1 W/cm² preferiblemente en el intervalo de 0.2 a 0.9 W/cm² más preferiblemente en el intervalo de 0.3 a 0.7 W/cm² lo más preferiblemente en el intervalo de 0.4 a 0.6 W/m². En el caso de un tiempo de radiación prolongado, la radiancia de la luz de iluminación está en el intervalo de 0.01 a 0.1 W/cm² preferiblemente en el intervalo de 0.02 a 0.09 W/cm² más preferiblemente en el intervalo de 0.03 a 0.07 W/cm² lo más preferiblemente en el intervalo de 0.04 a 0.06 W/m². En el caso de un tiempo de radiación prolongado, la radiancia de la luz de iluminación está en el intervalo de 0.01 a 1 W/cm² preferiblemente en el intervalo de 0.02 a 0.09 W/cm² más preferiblemente en el intervalo de 0.03 a 0.07 W/cm² lo más preferiblemente en el intervalo de 0.04 a 0.06 W/m².
- 5
- 10 Cuando el compuesto o la composición se administra directamente al ojo, se necesita menos compuesto en comparación con una inyección intravenosa.
- La presente descripción también divulga (que no forma parte de las reivindicaciones) métodos para seleccionar nuevos compuestos para el tratamiento de enfermedades asociadas a la lipofuscina.
- Se divulga, por ejemplo, un procedimiento para seleccionar un compuesto o una composición adecuada para tratar enfermedades asociadas con la lipofuscina en un paciente que comprende los pasos de
- 15 a) determinar un factor de reactividad,
- b) determinar un factor de direccionamiento que permite una absorción en una célula y proporciona un direccionamiento de lipofuscina,
- c) seleccionar un compuesto o una composición o combinar compuestos para obtener un compuesto o composición que comprenda un factor de reactividad y un factor de direccionamiento.
- 20 Este procedimiento se basa, entre otras cosas, en la conclusión inesperada de que un factor de reactividad y un factor de direccionamiento son suficientes para que un compuesto o composición degrade eficazmente los depósitos de lipofuscina.
- El factor de reactividad es un átomo o molécula que puede iniciar, mejorar o sufrir una reacción con lipofuscina o componentes de lipofuscina. El factor de reactividad puede ser un agente oxidante y/o un agente que proporciona radicales.
- 25 El requisito de un factor de reactividad se basa en el hallazgo de que miembros particulares de la familia de los tetrahidropiridoéteres (THPE) son capaces de degradar la lipofuscina y esta degradación de los depósitos de lipofuscina depende de la acción de los radicales. Aunque se había demostrado anteriormente que, en particular, el soraprazán puede degradar activamente la lipofuscina en el ojo y en células EPR aisladas, se suponía que la molécula pequeña podría inducir un sistema de desintoxicación, es decir, como un ligando al receptor nuclear PXR, que controla la expresión de muchas enzimas de desintoxicación.
- 30 Sin embargo, como se muestra en los ejemplos, el componente A2E de lipofuscina es degradado por el soraprazán también en sistemas libres de células, lo que sugiere que no se requiere una inducción de un mecanismo celular por el compuesto y, en particular, la acción de las enzimas. Además, se encontró sorprendentemente que los miembros de la familia THPE son generadores de un anión superóxido como lo demuestran los estudios que utilizan resonancia paramagnética electrónica y atrapamiento de espín de los productos radicales. En este documento, una sustancia capaz de generar especies radicales de oxígeno se denomina donante de anión superóxido (SAD) o donante de oxígeno reactivo (ROD).
- 35 Además, como se muestra en los ejemplos, un eliminador de radical abole la degradación de la lipofuscina inducida por un SAD. Por lo tanto, es necesario un radical, es decir el anión superóxido, para la degradación de la lipofuscina observada en la incubación con el SAD. Este hallazgo es particularmente sorprendente, porque hasta ahora se pensaba que las especies de oxígeno reactivo mediaban en la precipitación y la acumulación de lipofuscina. Sin estar ligado a una teoría se propone la siguiente hipótesis para el mecanismo de degradación. La transferencia del radical, es decir del oxígeno, a la lipofuscina resulta en la adición de grupos hidroxilo, y la desestabilización de dobles enlaces en pigmentos precipitados, lo que a su vez conduce a la disolución de los depósitos. Una vez iniciada la solución de los depósitos, el equilibrio favorece su exportación a la sangre o al medio. En un organismo, la lipofuscina solubilizada se elimina a través de las vías excretoras normales.
- 40 Para causar una reacción con la lipofuscina en la célula, el factor de reactividad tiene que llegar a la lipofuscina o acercarse a la lipofuscina. En consecuencia, tiene que ser absorbido por una célula y dirigirse a los depósitos de lipofuscina. Un factor de direccionamiento o factor de acumulación permite una absorción en una célula y permite el direccionamiento de lipofuscina.
- 45
- 50 Soraprazan es, por ejemplo, absorbido por una célula y se dirige a los depósitos de lipofuscina debido a su naturaleza lipofílica.

Por lo tanto, se determina que los compuestos o composiciones que comprenden un factor de reactividad, preferiblemente un agente que proporciona radicales y, además, comprenden un factor de transferencia que permite la absorción celular y un direccionamiento de lipofuscina son adecuados para la degradación de lipofuscina y, en consecuencia, para el tratamiento de enfermedades asociadas con lipofuscina. Por lo tanto, el mecanismo inesperado de degradación de la lipofuscina descrito en este documento y las propiedades necesarias concluidas de los compuestos o la composición permiten (que no forman parte de las reivindicaciones) encontrar otros compuestos adecuados para tratar las enfermedades asociadas con la lipofuscina.

Como se definió anteriormente, el factor de direccionamiento preferiblemente no solo proporciona un direccionamiento de lipofuscina en la célula. Además, el factor de direccionamiento también puede permitir una absorción en la célula. La absorción en la célula puede ocurrir, por ejemplo, por endocitosis, transporte activo o pasivo de la membrana. Por ejemplo, la absorción del factor de direccionamiento en la célula se determina cultivando una o más células en presencia de un factor de direccionamiento potencial y midiendo el aumento de la concentración del factor de direccionamiento en la célula. Tal experimento también se describe en los ejemplos. El aumento de la concentración define la absorción celular.

Uno de los componentes de las células derivadas del ojo es la N-retinilideno-N-retiniletanolamina (A2E). Como se muestra en los ejemplos, el soraprazan, que se sabe que elimina la lipofuscina en las células, también degrada el A2E en solución bajo iluminación por luz visible. Por lo tanto, la eliminación de lipofuscina puede ser imitada por A2E en solución.

20 Ejemplos

Ejemplo 1 - La degradación de la lipofuscina depende de la especie química reactiva

Para explorar el papel de las especies químicas reactivas, las células del epitelio pigmentario retiniano humano (EPR) se trataron con el donante de aniones súper óxido (SAD soraprazán ((7R,8R,9R)-2,3-dimetil-8-hidroxi-7-etoxi-9-fenil-7,8,9,10-tetrahidro-imidazo-[1,2-h][1,7]-naftiridina), un miembro de la familia THPE, ya sea solo o en combinación con un conocido eliminador de radical de oxígeno, el cardioxano.

Después de cultivar las células de hRPE hasta la confluencia, los compuestos de prueba se añadieron a siete cultivos celulares y las células se incubaron a 37 °C y al 5 % de CO₂. El SAD se añadió a los cultivos celulares en una concentración de 50 µg/ml, ya sea solo o en combinación con cardioxano en una concentración de 10 µM, 50 µM o 100 µM. Además, se incubaron tres cultivos celulares solo con cardioxano en una concentración de 10 µM, 50 µM o 100 µM. Como control, se cultivó un cultivo celular sin compuestos de prueba.

Después de una semana de incubación se tomaron micrografías de las células EPR incubadas de manera diferente, como se muestra en la Fig. 2A a H. En las imágenes originales, la lipofuscina en las células es visible como una estructura fluorescente amarilla-dorada-naranja, ante un fondo azul. En la reproducción de la escala de grises de la Fig. 2, la estructura amarillo-oro-naranja aparece de color gris claro (amarillo) o gris oscuro (naranja) ante un fondo gris. Las áreas de degradación de lipofuscina en las células de hRPE aparecen como estructuras brillantes de color azul a blanquecino que aparecen blancas en la reproducción en la escala de grises y están rodeadas en círculos en la Fig. 2A.

Las estructuras brillantes de color azul solo se observan en la configuración experimental con SAD solo (Fig. 2A). Por lo tanto, solo el tratamiento con SAD solo conduce a la eliminación de la lipofuscina. Las células incubadas con cardioxano solo no muestran ninguna degradación de la lipofuscina. Además, la adición de cardioxano al SAD abole la degradación de la lipofuscina que se observa con el SAD solo. En consecuencia, un eliminador de radicales como el cardioxano previene la degradación, lo que sugiere que un mecanismo mediado por radicales es la base de la eliminación de lipofuscina observada con el SAD.

Ejemplo 2 - Degradación in vitro de N-retinilideno-N-retiniletanolamina (A2E)

La degradación de N-retinilideno-N-retiniletanolamina (A2E) - componente de lipofuscina - en una solución acuosa de agua se midió en presencia de posibles mediadores de degradación e iluminación lumínica.

En un ensayo libre de células, el A2E se disolvió en H₂O desionizada en una concentración de 20 µM y la solución se dividió en dos partes. A una parte de la solución A2E se añadió verteporfina en una cantidad de 25 µM. Las muestras de la solución de A2E con y sin verteporfina se iluminaron con una lámpara LED SunaECO 1500, Tropic Marin ya sea durante 1 min a 689 nm o durante 5 min con luz blanca. Las muestras no iluminadas de solución de A2E incubadas con y sin verteporfina durante 5 min sirvieron como controles.

Las cantidades restantes de A2E y sus epóxidos (A2E+O, A2E+2O) restantes se cuantificaron mediante cromatografía líquida combinada con espectroscopia de masas (LCMS) utilizando las transiciones indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1: A2E medido y sus epóxidos

ES 3 012 058 T3

| Detección | A2E | A2E + O | A2E + 2O |
|-------------------|-------|---------|----------|
| Q1 (ion parental) | 592.4 | 608.3 | 624.3 |
| Q3 (ion producto) | 71 | 176 | 196 |

5 Como se muestra en la tabla 2, después de la iluminación del A2E durante 1 minuto con luz a 689 nm, solo el 76 % del A2E pudo detectarse con A2E no iluminado. El uso de luz blanca y un tiempo de iluminación más largo (5 min) conducen a una reducción más dramática a solo el 8 % del A2E no iluminado. Este resultado muestra que el A2E en solución se degrada tras la iluminación.

La Tabla 2 también muestra que la iluminación de una suspensión de A2E que contiene verteporfina conduce a una disminución más fuerte de A2E. Por lo tanto, el fotosensibilizador verteporfina aumenta la velocidad con la que A2E se elimina o se degrada de otra manera.

Tabla 2: Resultados de la iluminación de A2E solo o en presencia de verteporfina

| Tratamiento | A2E (nM) | A2E (control en %) |
|----------------------------------------|----------|--------------------|
| A2E no-iluminado, 5 min | 32445 | 100 |
| A2E 689 nm, 83 s * | 24605 | 76 |
| A2E Luz blanca, 5 min | 2637 | 8 |
| A2E + Verteporfina no-iluminada, 5 min | 28864 | 89 |
| A2E + Verteporfina 689 nm, 83 s * | 14338 | 44 |
| A2E + verteporfina luz blanca, 5 min | 1295 | 4 |

10

Ejemplo 3 - Generación de células EPR que incluyen A2E

Las células ARPE-19 (aproximadamente 10.000 células) se siembran en DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S en placas de 96 pozos y se cultivan a 37 °C y 0.5 % de CO₂. Después de un día se agregan 25 µM de A2E a cada uno de los pozos y las células se dejan inactivas durante tres días antes del tratamiento con los SAD.

15 Ejemplo 4 - Generación de células EPR incluyendo lipofuscina

4.1 Aislamiento de lipofuscina

20 Las células EPR de un donante humano se suspenden en un tampón acuoso y se afectan por medio de sonicación durante 25 min a 4 °C usando un Soniprep 150 (MSE) equipado con una microsonda exponencial. El material sonicado se centrifuga a 60 g durante 7 min para eliminar los desechos celulares y el sobrenadante resultante se centrifuga a 6000 g durante 10 min para sedimentar los gránulos de pigmento. Este sedimento se resuspende en una solución acuosa de sacarosa en una concentración de 0.3 M y se coloca en capas sobre un gradiente de sacarosa discontinua que consta de ocho capas de soluciones con una concentración decreciente de sacarosa: 2 M; 1.8 M; 1.6 M; 1.55 M; 1.5 M; 1.4 M; 1.2 M y 1 M. El gradiente superpuesto en 25 capas se centrifuga en un cabezal oscilante a 103,000 g durante 1 hora. Al final de la centrifugación se observan dos fracciones pigmentadas distintas. La fracción superior es una banda difusa de color marrón claro en la interfaz de las capas con sacarosa de 1.55 y 1.6 M y la fracción inferior constituye un sedimento de color marrón oscuro que pasa incluso la capa de sacarosa con la mayor concentración (2 M). Utilizando tanto el campo brillante como la microscopía de fluorescencia, la banda superior se identifica como lipofuscina y la inferior como melanina.

30 Las dos fracciones se eliminan del gradiente de sacarosa, se diluyen en PBSA y se centrifugan a 6000 g durante 10 min. Cada sedimento se resuspende en una solución de sacarosa de 0.3 M y se purifica aún más en un segundo gradiente de sacarosa como se describió anteriormente. De nuevo las fracciones se eliminan del segundo gradiente, se diluyen en PBSA y se centrifugan a 6,000 g durante 10 min. La pella resultante de cada zona pigmentada se lava cinco veces en PBSA y se almacena a - 20' hasta que sea necesario.

35 4.2 Células EPR que se alimentan con lipofuscina

Las células ARPE-19 (aproximadamente 10.000 células) se siembran en DMEM + 10% FBS + 1% P/S en placas de 96 pozos y se cultivan a 37 °C y 0.5% de CO₂. Después de un día, se agregan 300 gránulos/células de lipofuscina a los pozos y las células se cultivan durante 24 horas adicionales antes del tratamiento con SAD.

Ejemplo 5 - Procedimiento de ensayo para células EPR de donantes

5 Las células EPR de donantes humanos envejecidos contienen grandes cantidades de lipofuscina que se pueden cuantificar fácil por medio de un microscopio debido a su autofluorescencia. Por lo tanto, las células EPR humanas envejecidas imitan la situación patológica observada en los pacientes, en la que las células EPR están completamente llenas de lipofuscina. Las células EPR de donantes humanos envejecidos (aproximadamente 10.000 células) se siembran en DMEM + 10% FBS + 1% P/S en placas de 96 pozos y se
10 cultivan a 37 ° C y 5 % CO₂. Cuando las células son 80% confluentes, las células se tratan con SAD.

Ejemplo 6 - Ensayo para la unión a la melanina A2E

Para estudiar la unión de A2E a la melanina, se prepara una suspensión de 2 mg/ml de melanina natural (*S. officinalis*) en PBS, pH 7.4. La suspensión de melanina se lleva a 37°C y se sonica durante 15 minutos para formar una suspensión uniforme. La suspensión de melanina (0.75 ml) se mide en alícuotas en tubos de ensayo
15 de vidrio (12 x 75 mm) con agitación continua para evitar la sedimentación. La solución de A2E (0.75 ml) se añade a las alícuotas de melanina mencionadas anteriormente, y los tubos se incubarán en una incubadora agitadora a 37°C y 300 rpm durante 4 h.

Los controles se preparan incubando A2E en ausencia de melanina en el medio de incubación e incubando melanina sin A2E. Los compuestos se agregan a la suspensión de melanina a partir de soluciones de stock.
20 Después de la incubación, las suspensiones se centrifugan a 13,000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente para eliminar los gránulos de melanina. El sobrenadante se recoge, se diluye con acetonitrilo y se analiza mediante un procedimiento LC-MS/MS para determinar la concentración de SAD en el sobrenadante. Los parámetros cinéticos del estudio de unión, es decir, la capacidad máxima de unión (*r*_{max}) y la afinidad de unión (*k*) se determinan para A2E de acuerdo con el procedimiento previamente informado (Cheruvu et al.,
25 2008).

La Fig. 3A muestra el resultado del experimento de unión de los compuestos de prueba al complejo A2E en forma de diagrama de columnas. Un alto porcentaje de soraprazán y demetoxisoraprazán -alrededor del 46 % y alrededor del 53 %, respectivamente- se encuentran unidos a las partículas de melanina A2E. También la verteporfina y R/S-demetoxisoraprazán se unen a las partículas de melanina A2E, aunque en un porcentaje
30 menor.

En un experimento relacionado, se prueba la afinidad de un SAD hacia los iones metálicos. El SAD se incuba en diversas proporciones con iones metálicos como Fe II o Fe III y se mide la absorbancia de la luz por parte de complejos. Cuando se combina en una proporción molar de soraprazán a FeCl₃ de 3:1, un espectro de diferencia sugiere interacción entre las especies, lo que puede explicar algún aspecto de la unión al pigmento.
35 La Fig. 3B muestra la absorbancia en dependencia de la longitud de onda de iluminación para una solución de soraprazán, una solución de FeCl₃ y una solución de soraprazán y FeCl₃. Además, el gráfico de la Fig. 3B muestra un espectro de diferencia que representa la absorción de FeCl₃ restada de la absorción de soraprazán + FeCl₃. Comparando el espectro de diferencia con el espectro de soraprazán se puede concluir que la combinación de soraprazán + FeCl₃ tiene una mayor absorción por encima de 290 nm que los componentes
40 individuales.

Ejemplo 7 (no forma parte del alcance reivindicado) - La melanina y la lipofuscina aumentan la absorción celular de verteporfina

Para probar los factores que influyen en la absorción celular de verteporfina en dos tipos de células utilizadas:

- ARPE-19, una línea celular humana de EPR que carece de melanina y lipofuscina
- 45 - HuRPE, células EPR aisladas de ojos de donantes humanos que contienen melanina y lipofuscina

Las células fueron tratadas con 200 µl de un medio de cultivo que contenía Verteporfina de 278 nM durante el tiempo indicado, se descartó el medio de cultivo, se tripsinizaron las células, se resuspendieron en medio de 500 µl y se contaron.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la absorción de verteporfina después de 1 y 18 h respectivamente. Ya después de 1 h de incubación, la concentración de verteporfina en HRPE es más del doble en comparación con la concentración en ARPE-19. Después de 18 horas, la concentración aumentó aproximadamente cuatro veces en las células huRPE y aproximadamente dos veces en las células ARPE-19. Por lo tanto, la diferencia en la concentración se vuelve aún más pronunciada, en las dos líneas celulares se vuelve aún más pronunciada con el tiempo. En consecuencia, las células de HuRPE melanizadas exhiben una mayor absorción de
50

verteporfina que en las células ARPE no melanizadas y la diferencia aumenta con el tiempo. Esto sugiere una tasa de absorción que es constantemente mayor que en las células ARPE-19.

Tabla 3: Absorción de verteporfina celular

| Tipo de célula | Tiempo de incubación (h) | Número de células después del tiempo de incubación | Verteporfina en las células después de la incubación (nM) |
|----------------|--------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| HuRPE | 1 | 283.750 | 339 |
| ARPE-19 | 1 | 356.250 | 159 |
| HuRPE | 18 | 243.750 | 1206 |
| ARPE-19 | 18 | 221.250 | 351 |

5 **Ejemplo 8** - Ensayo para efectos de múltiples compuestos en formato de selección

El procedimiento del ejemplo 2 se adapta a un formato de 96 pozos en el que se añaden 300 µL de suspensión o solución de prueba a cada pozo de la placa de microtitulación. La luz es proporcionada por una matriz de LED y difundida a través de un filtro fotográfico. Después de la iluminación, la placa se centrifuga en una centrífuga de placa (1000 g, 1 min) y luego se coloca en un inyector de HPLC refrigerado donde las muestras se inyectan continuamente en un sistema LCMS para determinar los niveles relativos de A2E y sus epóxidos después de la iluminación.

Ejemplo 9 - Ensayo de citometría de flujo de alto rendimiento para detectar la degradación de lipofuscina

Las células ARPE19 se incuban con o sin A2E (20 µM) durante 3 días y luego se ponen en suspensión mediante tripsinización lumínica. Las células se pasan a través de un citómetro para detectar la fluorescencia amarilla. Como se muestra en la Fig. 4 las células del panel superior incubadas con A2E (Fig. 4 panel inferior) se detectan con alta fluorescencia amarilla. Esto indica una gran cantidad de A2E. Las células incubadas sin A2E (Fig. 4 panel superior) tienen inherentemente baja fluorescencia amarilla. El tratamiento con fármacos reductores de lipofuscina da como resultado una distribución intermedia de A2E en las células. Por lo tanto, este ensayo se puede utilizar para probar la eliminación de lipofuscina por parte de SAD.

20 **Ejemplo 10** (no forma parte del alcance reivindicado) - Uso clínico del fotosensibilizador para tratar la DMAE

Se examina a un paciente con DMAE seca putativa y se determina la fluorescencia retiniana basal mediante el dispositivo de imágenes con láser azul (Heidelberg engineering). El paciente es sometido a una dosis intravenosa de 6 mg/m² de verteporfina mediante infusión de 30 ml durante 10 minutos. Una alternativa a la aplicación intravenosa es la aplicación intravítrea directa de verteporfina. En este caso, se administran aproximadamente 4 µg de verteporfina a un solo ojo afectado. La fluorescencia después de 1, 2 y 4 semanas se compara con la fluorescencia al inicio del estudio. Los ojos se tratan de manera alterna.

En el tratamiento estándar con verteporfina, quince minutos después del inicio de la infusión, una luz láser a 689 nm entregó 50 J/cm² mediante la aplicación de una intensidad de 600 mW/cm² durante 83 segundos utilizando un tamaño de punto con un diámetro de 1000 µm. Para los fines del tratamiento de la DMAE, la luz láser no es necesaria para promover la eliminación de la lipofuscina en presencia de una verteporfina. Después de la administración de verteporfina a un paciente, una exposición de los ojos del paciente a una luz interior suave de aproximadamente 500 lux. Alternativamente, las gafas de sol de bajo filtrado se pueden utilizar como un medio para mantener una exposición de los ojos del paciente a 500 lux cuando está al aire libre. La exposición debe mantenerse durante un período de al menos 6 h por día.

35 La fluorescencia retiniana con láser de luz azul se mide en los días 7, 14 y 28 después del tratamiento y se compara con los valores previos al tratamiento. Las reducciones específicas de la fluorescencia retiniana > 1-20% se encuentran en el examen posterior al tratamiento. En ciertos pacientes, el efecto se observa en ausencia de tratamiento con luz láser. El tratamiento se repite con intervalos de 3 meses para reducir los niveles generales de lipofuscina.

40 **Ejemplo 11** (no forma parte del alcance reivindicado) - Inyección de verteporfina en el vítreo de ratones Abca4 (-/-)

Se inyectaron 2 µl de una solución de verteporfina en el vítreo de los ojos de ratones Abca4 (-/-) (de 12 meses de edad) que carecen del transportador Abca4 en las membranas del disco de los fotorreceptores. Cuatro semanas después de la inyección, los ojos de los ratones se enuclearon, se incrustaron en la resina epoxi Epon™ y se cortaron en secciones semidelgadas. Como ojos de control de ratones no tratados de la misma edad, que carecían del transportador Abca4, se prepararon de la misma manera. La Fig. 5 muestra micrografías

electrónicas de las secciones semidelgadas de ratones no tratados (Fig. 5a) y tratados (Fig. 5b). La capa de célula EPR está marcada por flechas en la figura. Comparando las micrografías de la sección semidelgada de ojos de ratones no tratados (Fig. 5a) y tratados (Fig. 5b), el citoplasma de las células EPR de ratones no tratados parece mucho más denso debido al direccionamiento de los componentes confluentes de lipofuscina. Por lo tanto, se eliminaron cantidades sustanciales de lipofuscina y melanolipofuscina del citoplasma de las células EPR como resultado del tratamiento con lipofuscina. En los ojos tratados predominaron los gránulos de melanina en el citoplasma de las células EPR. Este resultado muestra que el tratamiento con verteporfina es posible bajo iluminación diurna normal.

Ejemplo 12 (no forma parte del alcance reivindicado) - Inyección de quinolona en el vítreo de ratones Abca4 (-/-).

Diversos compuestos son fotoactivos o fotosensibilizantes y también poseen propiedades lipofílicas compatibles con la partición en células que contienen lipofuscina. Los antibióticos de quinolona son ejemplos de tales compuestos. Martínez et al 1998 (Photochem Photobiol. 1998 Apr;67(4):399-403. Fluoroquinolone antimicrobials: singlet oxygen, superoxide and phototoxicity. Martínez LJ1, Sik RH, Chignell CF.) informan que la actividad de fotosensibilización relativa de las quinolonas es como sigue:

"floxacin > lomefloxacin, pefloxacin >> ciprofloxacin > enoxacin, norfloxacin y ofloxacin.

Los estudios tanto in vivo como in vitro han relacionado esta fototoxicidad con la generación de especies reactivas de oxígeno, incluido el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo". Sobre la base de estas observaciones, comparamos el efecto de la floxacin (una quinolona fotosensibilizante) con el de la norfloxacin, un análogo sin esta actividad. Los ratones Abca4 (-/-) (véase el ejemplo 11), de 12 a 26 semanas de edad, fueron tratados en el ojo derecho mediante inyección intravítrea con 2 µl de una solución que contenía 20 mg/ml de una solución o una suspensión de la sustancia de ensayo. Una semana después de la inyección, los ojos de los ratones se enuclearon, y la mitad del ojo se extrajo primero por sonicación en un volumen igual de solución salina, y luego se extrajeron con 3 volúmenes de acetonitrilo. La otra mitad del ojo se fijó con glutaraldehído preparado como secciones delgadas como se describe en el ejemplo 11. El ojo izquierdo no fue tratado y se mantuvo como control. Los ojos no tratados de ratones de la misma edad que carecían del transportador Abca4 fueron un control adicional.

Los extractos de acetonitrilo fueron sometidos a análisis por HPLCMSMS utilizando un espectrómetro cuadrupolo triple Sciex 4000 o 4500, como se muestra en el ejemplo 2 de la Tabla 1, para detectar A2E y sus epóxidos. Usando una curva estándar basada en A2E auténtico (ver ejemplo a continuación) calculamos la concentración efectiva de A2E en el tejido ocular (sin incluir el cristalino y la córnea). La concentración en cada ojo tratado se expresó como un porcentaje de la concentración promedio en todos los ojos no tratados en los ratones de la misma edad. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Concentración de A2E en ojos de ratón tratados con quinolonas

| Sustancia de ensayo | Concentración A2E (µM) en el ojo tratado | % de A2E en relación con grupo de edad, sin tratamiento |
|---------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Floxacin | 24 | 74 |
| Vehículo | 33 | 100 |
| Esparfloxacin | 36 | 99 |
| Norfloxacin | 36 | 106 |

Ejemplo 13 (no forma parte del alcance reivindicado) - Inyección de antibiótico de tetraciclina en el vítreo de ratones Abca4 (-/-).

Se sabe que ciertos análogos de tetraciclina causan fotosensibilidad a través de la producción de radicales. El efecto fotosensibilizador relativo de las tetraciclinas se resumió en "Hasan T, Kochevar IE, McAuliffe DJ, Cooperman BS, Abdulah D. Mechanism of tetracycline phototoxicity. J Invest Dermatol. 1984 Sep;83(3):179-83". Estos autores concluyeron que: "En las series de demeclociclina, tetraciclina y minociclina, se encuentra que la eficiencia de la generación de oxígeno singlete es paralela a la observación clínica de la frecuencia relativa de fototoxicidad de estos antibióticos, lo que sugiere la generación de oxígeno singlete como el origen de su fototoxicidad".

Para determinar si esta relación se mantuvo para las tetraciclinas, se comparó la eficacia de la doxiciclina (fotosensibilizador) frente a la minociclina (no fotosensibilizador).

ES 3 012 058 T3

Los ratones fueron tratados como en el ejemplo 12 con una inyección intravítrea con 2 µl de una solución que contenía 20 mg/ml de una solución o una suspensión de la sustancia de ensayo. Una semana después de la inyección, los ojos fueron recuperados y analizados como en los ejemplos 11 y 12. El ojo izquierdo no fue tratado y se mantuvo como control. Los ojos no tratados de ratones de la misma edad que carecían del transportador Abca4 fueron un control adicional. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

5

Tabla 5: Concentración de A2E en ojos de ratones tratados con antibióticos de tetraciclina

| Sustancia de ensayo | Concentración de A2E (µM) en el ojo tratado | % de A2E en relación con grupo de edad, sin tratamiento |
|---------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Cloranfenicol | 24 | 70 |
| Doxiciclina | 28 | 81 |
| Demeclociclina | 37 | 89 |
| Minociclina | 33 | 100 |
| Vehículo | 33 | 106 |

En términos de la eliminación de A2E de los ojos tratados, observamos lo siguiente a los 7 días. La doxiciclina (fotosensibilizador) tuvo más efecto que la minociclina, que no es un fotosensibilizador. La demeclociclina fue notablemente menos soluble, lo que puede explicar un efecto limitado.

10

Ejemplo 14 - Inyección de aminoácidos o metabolitos en el vítreo de ratones Abca4 (-/-).

Los ratones fueron tratados como en el ejemplo 12 con una inyección intravítrea con 2 µl de una solución que contenía 40 mg /ml de una solución o una suspensión de la sustancia de ensayo. Una semana después de la inyección, los ojos fueron recuperados y analizados como en los ejemplos 11 y 12. El ojo izquierdo no fue tratado y se mantuvo como control. Los ojos no tratados de ratones de la misma edad que carecían del transportador Abca4 fueron un control adicional. Los aminoácidos fotoactivos y reactivos parecieron mediar en reducciones en A2E. La cisteína es capaz de interactuar con metales, particularmente hierro III (Monatshefte für Chemie/November 1991, Volume 122, Issue 11, pp 887-906) y también es redox activo en el contexto del hierro. El triptófano es capaz de absorber y volver a irradiar energía de la luz, al igual que la riboflavina. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

15

20

Tabla 6: Concentración de A2E en ojos de ratón tratados con aminoácidos o metabolitos

| Sustancia de ensayo | Concentración A2E (µM) en el ojo tratado | % de A2E en relación con grupo de edad, sin tratamiento |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Cisteína (no forma parte del alcance reivindicado) | 12 | 59 |
| Triptófano (no forma parte del alcance reivindicado) | 13 | 66 |
| Glutación (no forma parte del alcance reivindicado) | 35 | 89 |
| Riboflavina | 19 | 91 |
| | | |
| Vehículo | 33 | 106 |

Ejemplo 15 (no forma parte del alcance reivindicado) - Inyección de quelante o interactor metálico en el vítreo de ratones Abca4 (-/-).

Los ratones fueron tratados como en el ejemplo 14 con una inyección intravítrea con 2 µl de una solución que contenía 40 mg /ml de una solución o una suspensión de la sustancia de ensayo o una concentración como se

25

indica en la tabla. Una semana después de la inyección, los ojos fueron recuperados y analizados como en los ejemplos 11 y 12. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Concentración de A2E en ojos de ratón tratados con quelantes o interactores metálicos

| Sustancia de ensayo | Concentración de A2E (μM) en el ojo tratado | % de A2E en relación con grupo de edad sin tratamiento |
|------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Cisteína | 12 | 59 |
| Taurodesoxicolato EDTA | 16 | 75 |
| 1,10-fenantrolina | 20 | 91 |
| Ciclodextrina EDTA | 20 | 97 |
| Vehículo | 33 | 106 |

5 La interacción con metales parece tener algún efecto o beneficio para la eliminación de A2E. Sin embargo, la mayoría de los quelantes o formadores complejos metálicos como el EDTA están altamente cargados y es poco probable que pasen fácilmente a través de las membranas. Ayudar al paso de los quelantes a través de las membranas hasta donde se encuentra la lipofuscina es probable que mejore su efecto, al igual que el uso de quelantes o interactores que son intrínsecamente lipofílicos.

10 **Ejemplo 16** (no forma parte del alcance reivindicado) - Inyección de agente de permeabilidad en el vítreo de ratones Abca4 (-/-).

Los ratones fueron tratados como en el ejemplo 14 con una inyección intravítrea con 2 μl de una solución que contenía 40 mg/ml de una solución o una suspensión de la sustancia de ensayo o una concentración como se indica en la tabla. Una semana después de la inyección, los ojos fueron recuperados y analizados como en los

15 ejemplos 11 y 12. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: Concentración de A2E en ratones tratados con agentes de permeabilidad

| Sustancia de ensayo | Concentración A2E (μM) en el ojo tratado | % de A2E en relación con grupo de edad sin tratamiento |
|---------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 20% de PEG 400 | 12 | 56 |
| Ciclodextrina | 20 | 83 |
| 1% Tween 80 | 22 | 95 |
| Vehículo | 33 | 106 |

Ejemplo 17 (no forma parte del alcance reivindicado) - Inyección de tinte y porfirinas en el vítreo de ratones Abca4 (-/-).

20 Ciertos tintes son fotosensibilizantes o son capaces de reacciones redox. Del mismo modo, las porfirinas son, en ciertos casos, fotosensibilizantes. La verteporfina es uno de esos ejemplos, mientras que la ftalocianina lo es menos.

Los ratones fueron tratados como en el ejemplo 14 con una inyección intravítrea con 2 μl de una solución que contenía 20 mg/ml de solución o una suspensión de la sustancia de ensayo. Una semana después de la inyección, los ojos fueron recuperados y analizados como en los ejemplos 11 y 12.

25

En general, las sustancias fluorescentes fueron más activas, lo que sugiere que la retransmisión de la energía lumínica puede ser relevante para el mecanismo de eliminación de la lipofuscina. Los resultados se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9: Concentración de A2E en ojos de ratón tratados con tintes y porfirinas

| Sustancia de ensayo | Concentración de A2E (μM) en el ojo tratado | % de A2E en relación con grupo de edad sin tratamiento |
|---------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|---------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|

ES 3 012 058 T3

| | | |
|------------------------|----|-----|
| Verde de indocianina | 20 | 66 |
| Cristal violeta | 23 | 71 |
| Quinina | 17 | 81 |
| Fluoroscéina | 20 | 85 |
| Rosa bengala | 16 | 85 |
| Fenotiazina | 27 | 85 |
| Verteporfina (2 mg/mL) | 27 | 90 |
| Indigocarmina | 22 | 98 |
| FAD | 23 | 99 |
| Ftalocianina | 31 | 142 |

Ejemplo 18 (no forma parte del alcance reivindicado) - Inyección de proteína quelante y activa redox en el vítreo de ratones Abca4 (-/-).

- 5 Los ratones fueron tratados como en el ejemplo 14 con una inyección intravítrea con 2 μ l de una solución que contenía 20 mg/ml de una solución o una suspensión de la sustancia de ensayo. Una semana después de la inyección, los ojos fueron recuperados y analizados como en los ejemplos 11 y 12. Los resultados se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10: Concentración de A2E en ojos de ratón tratados con proteína quelante y activa redox

| Sustancia de ensayo | Concentración A2E (μ M) en el ojo tratado | % de A2E en relación con grupo de edad sin tratamiento |
|---------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Lactoferrina | 20 | 63 |
| Citocromo C | 18 | 81 |
| Transferrina (apo) | 15 | 82 |

- 10 El citocromo C comparte cierta actividad de una peroxidasa, por lo que se utilizó aquí como modelo de peroxidasa. Es un portador de electrones y es activo redox. La peroxidasa también es activa en la reducción de la lipofuscina. La transferrina y la lactoferrina son capaces de unir el hierro con alta afinidad. También se aceptan en las células a través de la endocitosis. Planteamos la hipótesis de que desestabilizarían la lipofuscina mediante la eliminación de hierro de los agregados.

- 15 **Ejemplo 19** (no forma parte del alcance reivindicado) - Moléculas pequeñas activas redox e inyección quelante en el vítreo de ratones Abca4 (-/-).

- 20 Los ratones fueron tratados como en el ejemplo 14 con una inyección intravítrea con 2 μ l de una solución que contenía 20 mg/ml de una solución o una suspensión de la sustancia de ensayo. A diferencia de ejemplos anteriores donde los ojos eran muestras después de 7 días, aquí los ojos se tomaron a las 16 horas después de la inyección, los ojos fueron recuperados y analizados por medio de HPLC MSMS como en los ejemplos 11 y 12. Los resultados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11: Concentración de A2E en ojos de ratón tratados con moléculas pequeñas activas Redox y quelante

| Sustancia de ensayo | Concentración A2E (μ M) en el ojo tratado | % de A2E en relación con grupo de edad sin tratamiento |
|--------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Solución salina (NaCl al 0.9%) | 52 | 102 |
| Soraprazán | 31 | 61 |
| PEG-EDTA | 43 | 85 |

ES 3 012 058 T3

| | | |
|--------------|----|----|
| Artemesinina | 38 | 75 |
|--------------|----|----|

Estos datos sugieren que los efectos también pueden tener lugar a corto plazo.

Ejemplo 20 - Calibración de la detección de A2E mediante HPLC MSMS a partir de ojos de ratón.

5 El A2E auténtico se disolvió en DMSO a una concentración de 10 μM y luego siguió diluyéndose en agua a partir de 100 μM a 15 nM en pasos de 3 veces. Las soluciones acuosas se diluyeron 1:3 con acetonitrilo y luego se sellaron en viales para inyección. Se inyectaron 6 μL de las soluciones de acetonitrilo y agua sobre una columna de HPLC derivada de fenilo de 2 x 50 mm (3 μm) y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo de 20% a acetonitrilo de 100% durante 4 minutos a un caudal de 500 $\mu\text{L}/\text{minuto}$. Las masas detectadas y las correspondientes áreas de pico se indican en la siguiente tabla. La relativa falta de sensibilidad de detección de A2E está relacionada con el hecho de que A2E se fragmenta fácilmente en muchas especies diferentes de
10 abundancia similar y baja. No hay fragmentos principales que predominen en el espectro de fragmentos.

| | | Área de pico | | |
|---------------|---------------------|--------------|---------|--------------|
| | | A2E | A2E | A2E -epóxido |
| | Ion molecular m/z+: | 592 | 592 | 608 |
| Estándar (nM) | Fragmentación: | 418 | 402 | 444 |
| 15 | | 1430 | 479 | 259 |
| 46 | | 2020 | 395 | 158 |
| 137 | | 3370 | 891 | 394 |
| 412 | | 10000 | 3860 | 2110 |
| 1235 | | 30400 | 8060 | 4560 |
| 3704 | | 130000 | 35000 | 19100 |
| 11111 | | 430000 | 119000 | 81500 |
| 33333 | | 996000 | 363000 | 409000 |
| 100000 | | 5310000 | 1440000 | 3060000 |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto para uso en el tratamiento de enfermedades oculares asociadas con la lipofuscina mediante degradación de la lipofuscina, en donde la enfermedad se selecciona de la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), la enfermedad de Stargardt, la enfermedad de Best y la retinosis pigmentaria, y en donde el compuesto es riboflavina.
2. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde el tratamiento consiste en administrar una inyección intravenosa o intravítrea del compuesto a un paciente con lipofuscinopatía retiniana.
3. El compuesto para uso según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el tratamiento comprende además una iluminación lumínica del ojo.
- 10 4. El compuesto para uso según la reivindicación 3, en donde el tiempo de iluminación está en el intervalo de 1 min a 72 h, preferiblemente en el intervalo de 2 min a 48 h, más preferiblemente en el intervalo de 3 min a 48 h.
- 15 5. El compuesto para uso según la reivindicación 3 o 4, en donde el resplandor de la luz de iluminación está en el intervalo de 0.001 a 1 W/cm², preferiblemente en el intervalo de 0.02 a 0.9 W/cm², más preferiblemente en el intervalo de 0.03 a 0.7 W/cm², del modo más preferible en el intervalo de 0.04 a 0.6 W/m².
6. El compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la luz tiene una longitud de onda en el intervalo de 380 nm a 800 nm, preferiblemente la luz tiene una longitud de onda en el intervalo de 380 nm a 650 nm, del modo más preferible, la luz para iluminación tiene una longitud de onda en el intervalo de 380 nm a 500 nm.
- 20 7. El compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde la luz es diferente de la luz láser.
8. El compuesto para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto se administra a una dosis por ojo en mg inferior a 1/10000, preferiblemente inferior a 1/2000, más preferiblemente inferior a 1/1000 de la dosis corporal total calculada en mg.
- 25

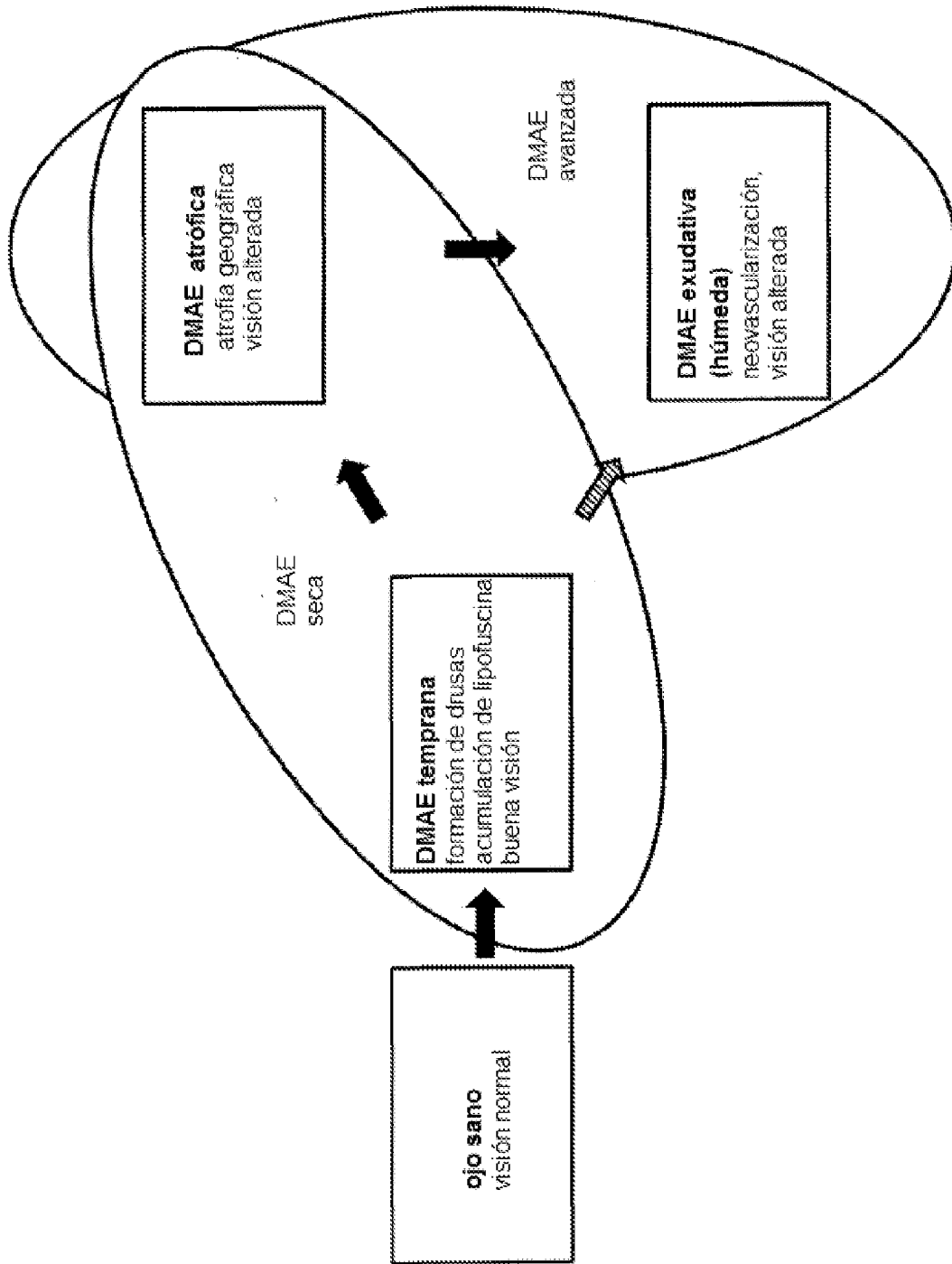
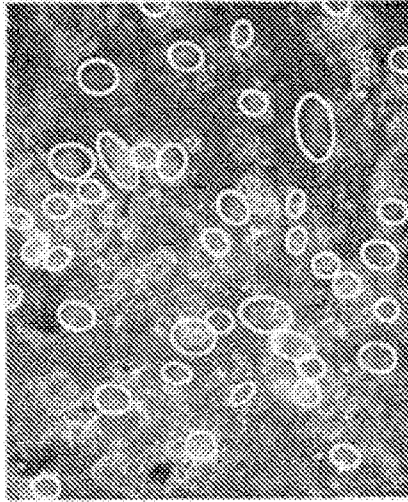


Fig. 1

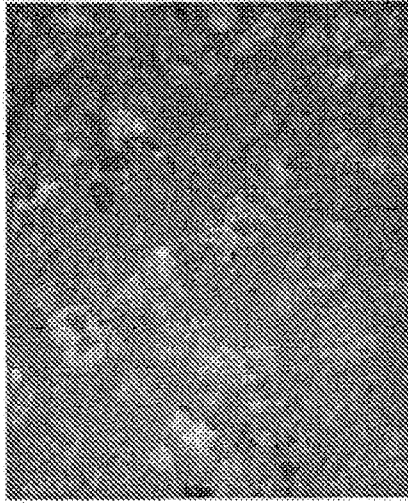
cultivo de células RPE humanas después de una semana

SAD 50microg/ml



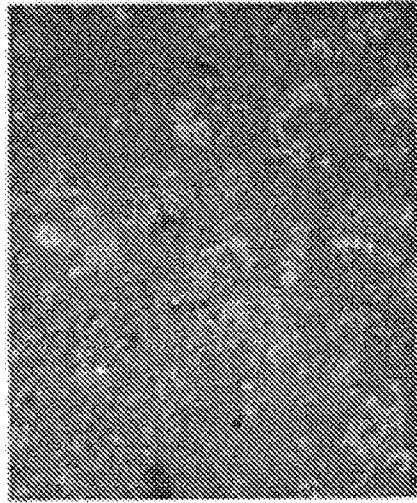
A

SAD + cardioxano 10 microM



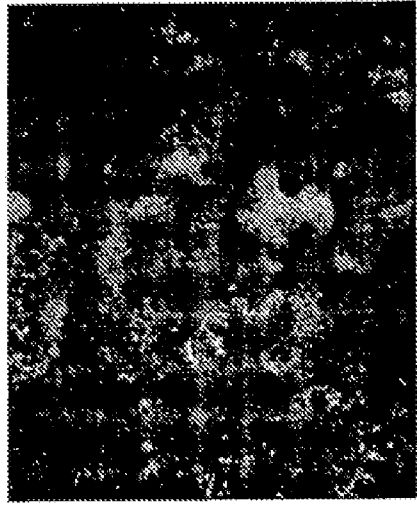
B

SAD + cardioxano 50 microM



C

SAD + cardioxano 100 microM



D

Fig. 2 A a D

cultivo de células hRPE después de una semana

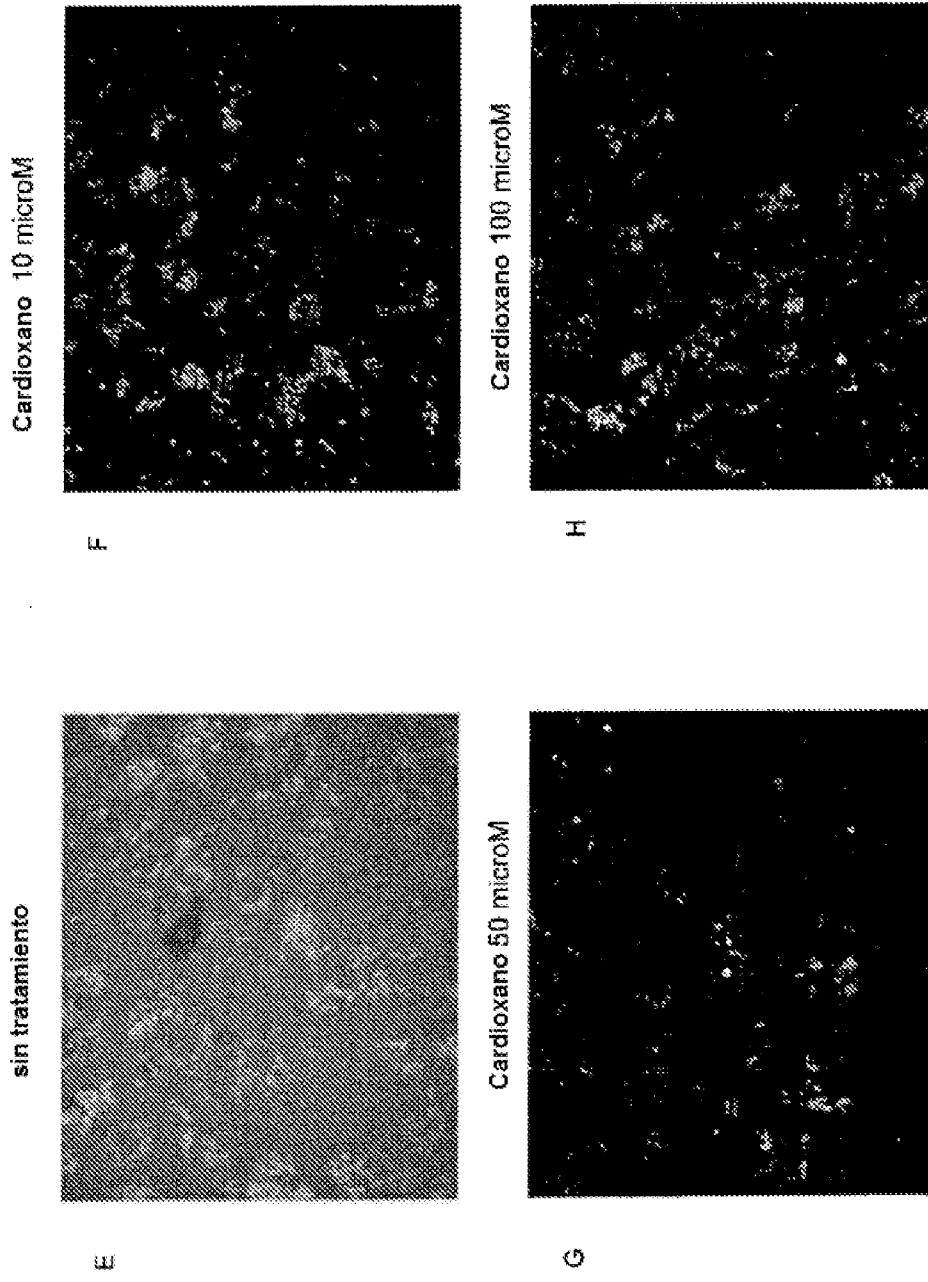


Fig.2 (continuación) E a H

A

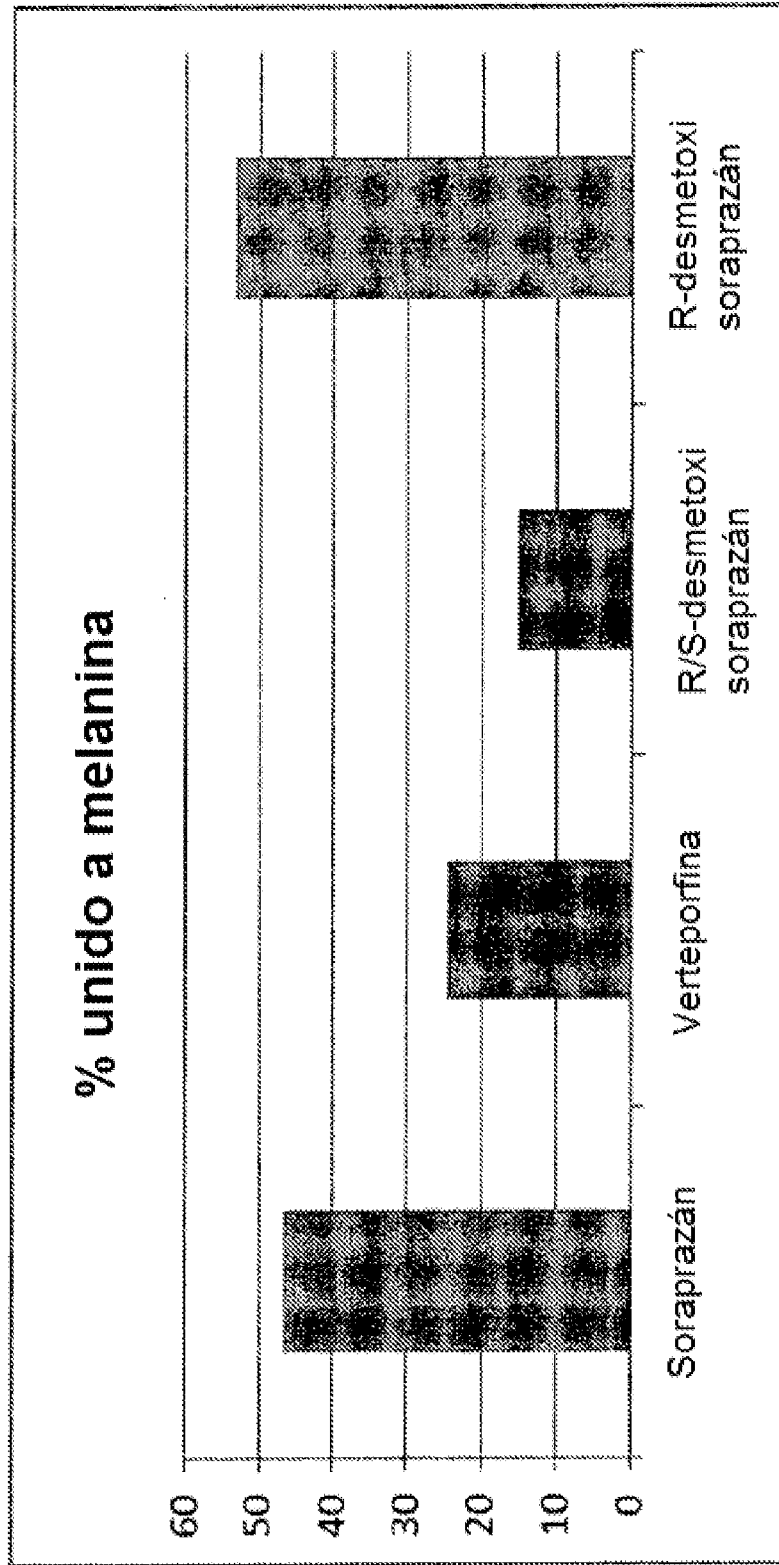


Fig. 3

B

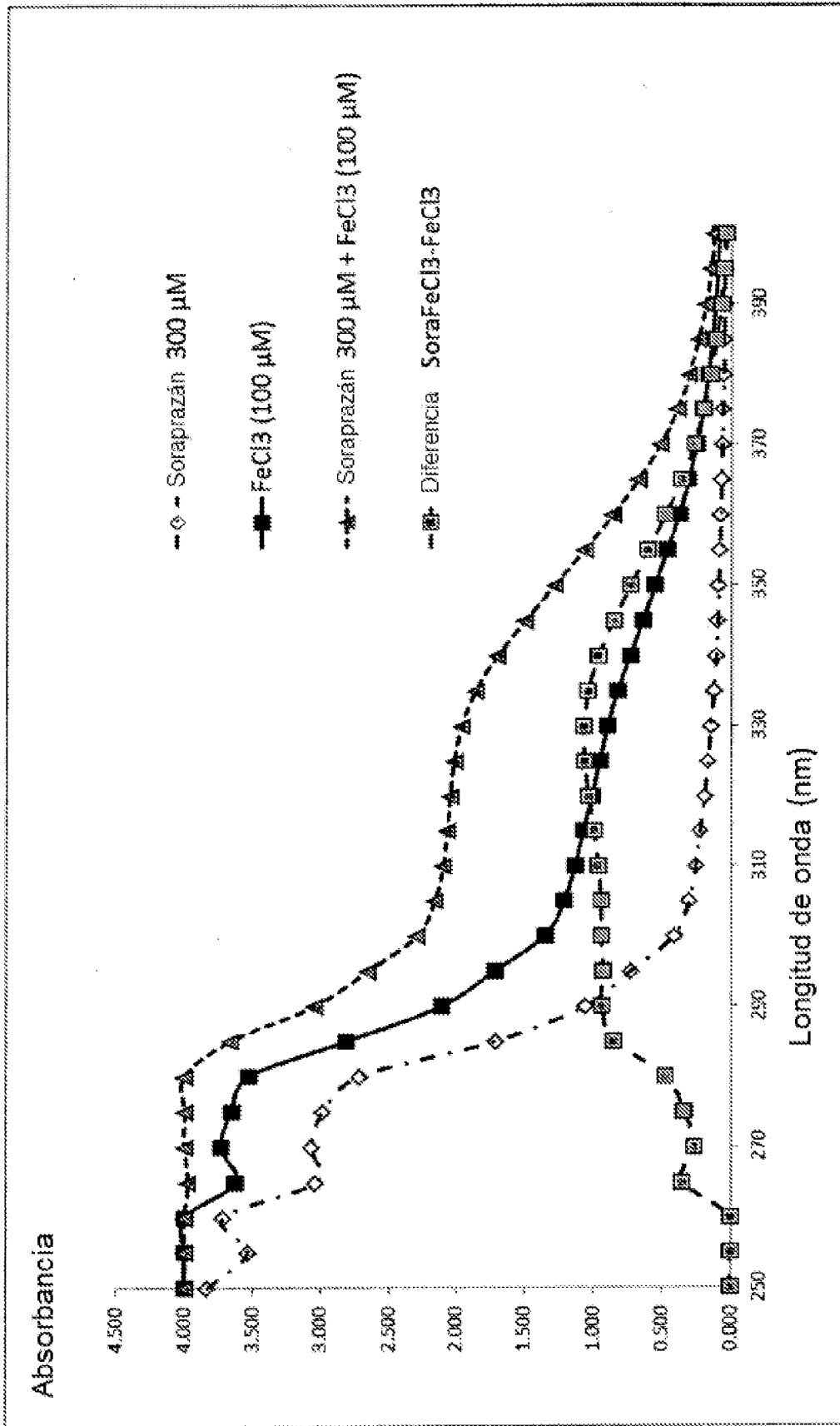


Fig. 3 (continuación)

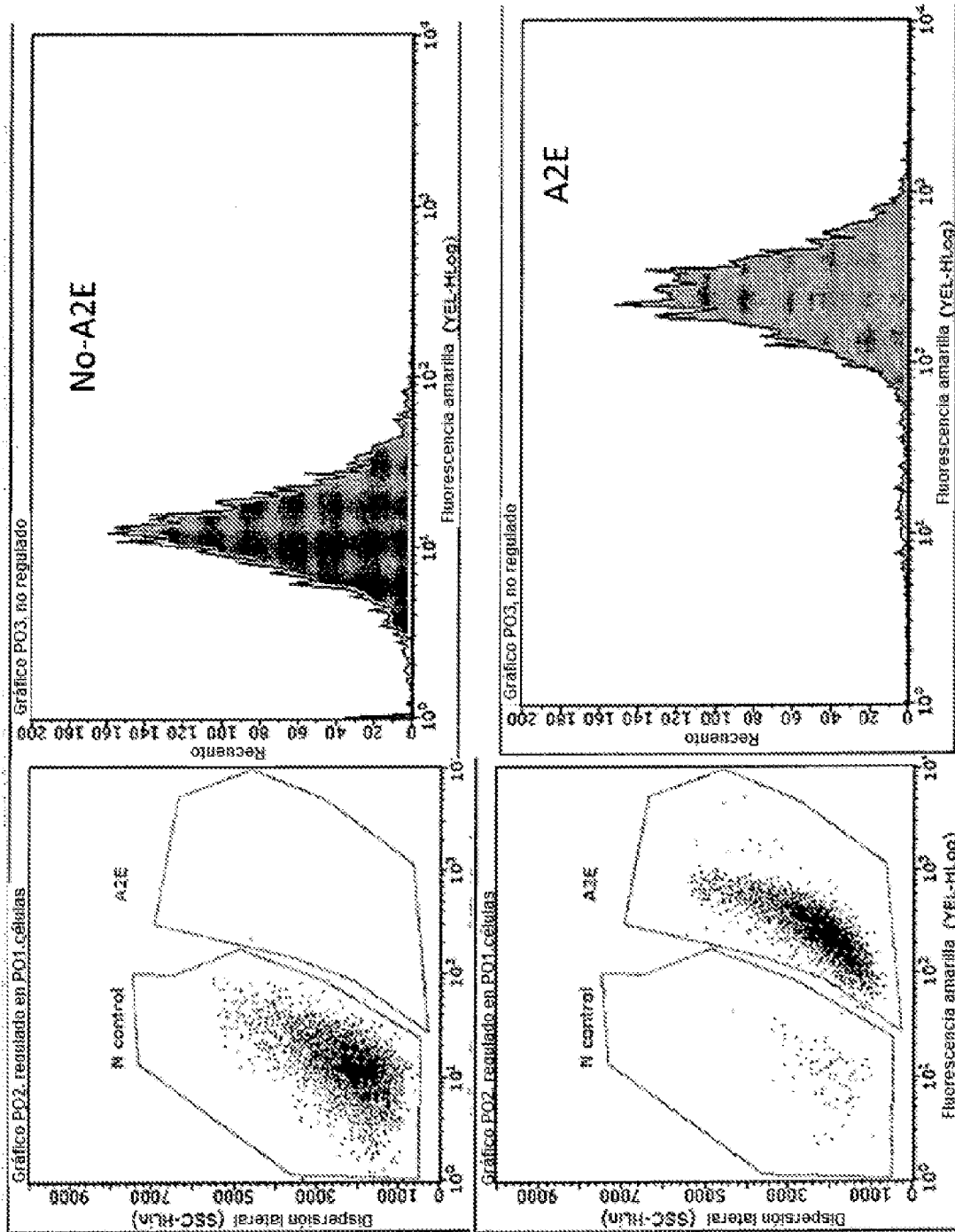


Fig. 4

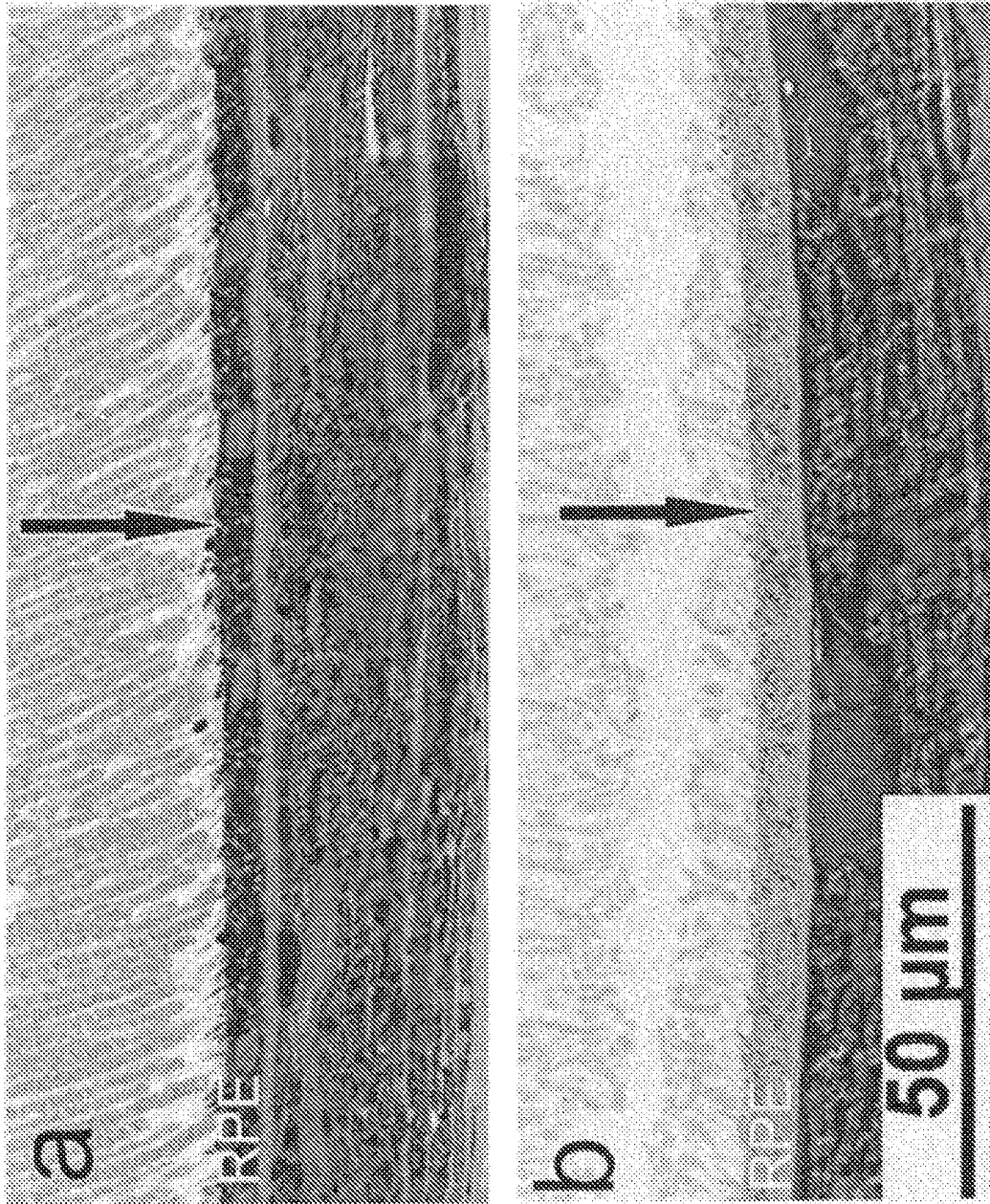


Fig. 5

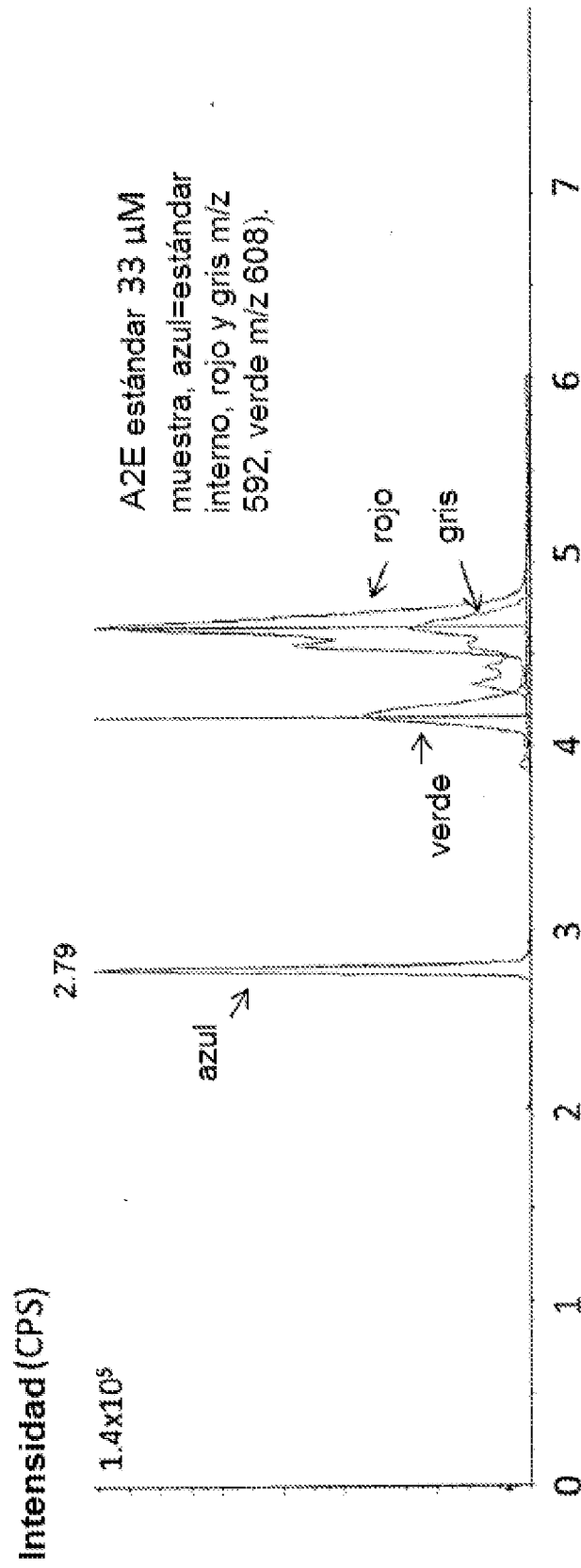


Fig. 6

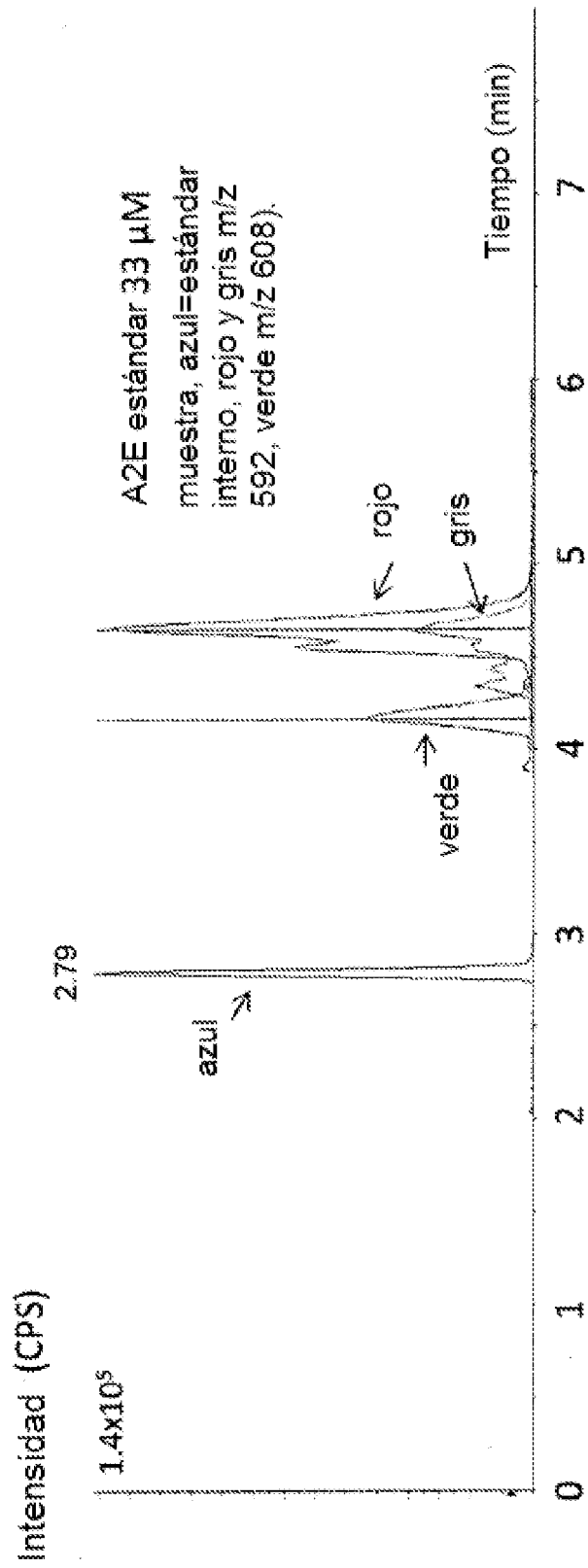


Fig. 7