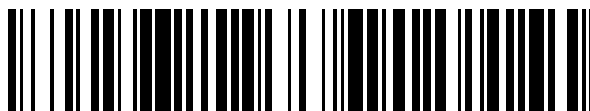


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 751**

51 Int. Cl.:  
**C07D 293/12** (2006.01)  
**A61K 9/06** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61K 9/16** (2006.01)  
**A61K 9/20** (2006.01)  
**A61K 9/48** (2006.01)  
**A61K 9/70** (2006.01)  
**A61K 31/41** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)  
**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08764549 .5**  
96 Fecha de presentación: **23.05.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2163548**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2010**

54 Título: **AGENTE PROFILÁCTICO O TERAPÉUTICO PARA LA DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD.**

30 Prioridad:  
**25.05.2007 JP 2007138519**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.12.2011**

73 Titular/es:  
**SANTEN PHARMACEUTICAL CO., LTD**  
**9-19, SHIMOSHINJO 3-CHOME**  
**HIGASHIYODOGAWA-KU**  
**OSAKA-SHI OSAKA 533-8651, JP**

72 Inventor/es:  
**HIRAI, Shin-ichiro y**  
**YOSHIDA, Atsushi**

74 Agente: **Aznárez Urbieta, Pablo**

ES 2 370 751 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

Agente profiláctico o terapéutico para la degeneración macular asociada a la edad

La presente invención se refiere a un agente profiláctico o terapéutico para la degeneración macular asociada a la edad que contiene 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona o una sal de la misma como ingrediente activo.

5 Actualmente en los países desarrollados la degeneración macular asociada a la edad (AMD) es una de las principales causas de ceguera legal y afecta esencialmente a personas mayores de 50 años o de mayor edad. La AMD es una enfermedad causada por cambios asociados a la edad en la mácula y en general se clasifica en formas exudativas y  
 10 10 atróficas. La AMD exudativa es una enfermedad en la que se producen nuevos vasos sanguíneos procedentes del crecimiento de la coroides en la mácula de las personas mayores, así como hemorragias o lesiones exudativas por debajo del epitelio del pigmento retiniano o de la retina, formándose finalmente tejido cicatricial. La AMD atrófica es una enfermedad asociada a la atrofia de la región macular o a la acumulación de drusas. Además, a la lesión precursora que conduce al desarrollo de AMD exudativa y atrófica se le denomina, en particular en ciertos casos, AMD temprana y se considera que esta lesión es una condición patológica de la AMD.

15 Una condición patológica básica de la AMD (en particular de la AMD exudativa) es la neovascularización coroidea, que se considera que se desarrolla debido a cambios asociados a la edad en las células epiteliales del pigmento retiniano macular, la membrana de Bruch y los vasos coroideos. Sin embargo, la mayor parte de las causas patogénicas y del mecanismo de neovascularización coroidea no se ha aclarado todavía y se espera que se desarrolle en el futuro.

20 Por otra parte, la 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona (nombre genérico: Ebselen, en adelante denominada "Ebselen") tiene un efecto antioxidativo y se ha indicado que es útil para la arteriosclerosis cerebral y la insuficiencia circulatoria cerebral crónica (documento no patente 1 y documento de patente 1). Además, se indica que el Ebselen es útil en los trastornos queratoconjuntivales, tales como ojo seco o queratopatía puntiforme superficial (documento de patente 2).

25 A modo de informe del estudio del efecto farmacológico del Ebselen sobre la neovascularización, el documento no de patente 2 informa que el Ebselen inhibía la neovascularización inducida por isquemia en tejido de la pata trasera de ratones y el documento no de patente 3 indica que el Ebselen inhibía la remodelación y neovascularización de la arteria carótida endógena inducida por peróxido de hidrógeno en ratones transgénicos p22phox.

30 Sin embargo, estos informes demuestran el efecto del Ebselen sobre tejidos tales como los vasos sanguíneos de la pata trasera y de las arterias carótidas. Es decir, estos informes (documentos no de patente 2 y 3) sólo sugieren el efecto del Ebselen sobre otros tejidos distintos a los tejidos oculares y no sugieren el efecto farmacológico del Ebselen sobre la neovascularización coroidea.

35 Además, el documento no de patente 4 informa del efecto farmacológico del Ebselen en la neovascularización; sin embargo, a diferencia de los informes descritos anteriormente (documentos no de patente 2 y 3), este documento indica que el Ebselen mejoró la progresión de la microangiopatía y restauró parcialmente la neovascularización. Específicamente, en el documento no de patente 4 se realizó un estudio con ratas ZDF (modelo diabético), indicándose que, en estos modelos, se inhibió la función vascular renal y disminuyó la densidad capilar alrededor del túbulo renal; sin embargo, mediante la administración repetida de Ebselen, se restauró la neovascularización renal. Es decir, el documento no de patente 4 reporta resultados contradictorios a aquellos de los informes descritos anteriormente (documentos no de patente 2 y 3) con respecto al efecto farmacológico en la neovascularización, aunque el estudio se elaboró utilizando distintos modelos de animales y no describe o no sugiere en absoluto la neovascularización coroidea.

40 Tal como se ha descrito anteriormente, la neovascularización coroidea ha llamado la atención como condición patológica básica de la AMD (en particular la AMD exudativa); sin embargo, la mayor parte de su mecanismo sigue siendo desconocida. Además, no existe ningún informe de estudio del efecto farmacológico del Ebselen sobre la neovascularización coroidea; en particular, no existe ningún informe que estudie el efecto profiláctico y de mejora del Ebselen sobre la AMD.

45 Por otra parte, también es sabido que el daño causado por el estrés oxidativo o similar sobre las células epiteliales del pigmento retiniano es una de las causas de desarrollo o progresión de la AMD, considerándose su contribución a la AMD temprana y atrófica importante (documento no de patente 5). En consecuencia, la protección de las células epiteliales del pigmento retiniano contra el daño celular se considera uno de los métodos más eficaces para la profilaxis o la terapia de la AMD (en particular la AMD temprana y atrófica). Sin embargo, no existe ningún informe que estudie dicho efecto protector del Ebselen sobre el daño celular.

Documento de patente 1: JP-A-2001-261555

Documento de patente 2: WO 2006/123676

Documento no de patente 1: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(13), 7919-7924 (2003)

Documento no de patente 2: Circulation, 111, 2347-2355 (2005)

Documento no de patente 3: Circulation, 109, 520-525 (2004)

Documento no de patente 4: Kidney International, 66, 2337-2347 (2004)

Documento no de patente 5: Progress in Retinal and Eye Research 19(2), 205-221, 2000

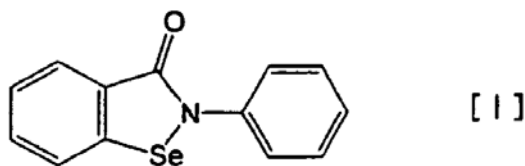
Es un tema interesante la investigación de un nuevo uso medicinal del Ebselen.

5 Los presentes inventores llevaron a cabo intensivos estudios para investigar un nuevo uso medicinal del Ebselen y descubrieron que el Ebselen, o una sal del mismo, tenían excelentes efectos inhibidores de la neovascularización coroidea en modelos de ratas de neovascularización coroidea inducida por láser, y así se llegó a la presente invención. Es decir, el Ebselen presenta efectos profilácticos o de mejora sobre la AMD (en particular la AMD exudativa).

10 Además, los presentes inventores descubrieron que el Ebselen tenía un efecto protector contra el daño celular inducido por peróxido de hidrógeno o 4-hidroxinonenal (HNE) en una línea celular epitelial del pigmento retiniano humano. Es decir, el Ebselen exhibe un efecto profiláctico o de mejora sobre la AMD (en particular la AMD temprana y atrófica). Por otra parte, se describe que la quercetina y la edaravona, bien conocidas por su actividad antioxidante, no poseen dicho efecto protector contra el daño celular, y por tanto, es sorprendente que el Ebselen sí tenga dicho efecto.

15 Así, la presente invención se refiere a un agente profiláctico o terapéutico para la AMD que comprende Ebselen o una sal del mismo como ingrediente activo. En particular, la presente invención se caracteriza porque éste puede ser un agente profiláctico o terapéutico en diversas condiciones patológicas de AMD, esto es AMD atrófica y exudativa, así como lesiones precursoras de la misma (AMD temprana).

El Ebselen es un compuesto heterocíclico condensado representado por la siguiente fórmula química estructural [1].



20 Además, la sales de Ebselen no están particularmente limitadas, siempre que se trate de sales farmacéuticamente aceptables, incluyéndose como ejemplos de la misma sales con ácidos inorgánicos como los ácidos clorhídrico, nítrico o sulfúrico; y sales con ácidos orgánicos como los ácidos acético, fumárico, maleico, succínico o tartárico. El Ebselen puede encontrarse en forma de solvato.

25 En la presente invención, la AMD incluye AMD exudativa, AMD atrófica y lesiones precursoras de la misma (AMD temprana). Tal como se ha descrito anteriormente, la AMD es una enfermedad causada por cambios maculares asociados a la edad y generalmente se clasifica como forma exudativa y atrófica. La AMD exudativa es una enfermedad en la que se desarrollan nuevos vasos sanguíneos de la coroides en la mácula de las personas mayores, igualmente se producen hemorragias o lesiones exudativas por debajo del epitelio del pigmento retiniano o retina, formándose finalmente tejido cicatricial. La AMD atrófica es una enfermedad asociada a la atrofia de la región macular o a la acumulación de drusas.

30 El Ebselen se puede formular en una única preparación o una preparación a combinar, con adición de un aditivo farmacéuticamente aceptable, según sea necesario y de acuerdo con las técnicas ampliamente utilizadas.

35 Cuando se utiliza el Ebselen para la profilaxis o la terapia de la enfermedad ocular mencionada anteriormente, se puede administrar a un paciente en forma oral o parenteral. Ejemplos de vías de administración incluyen la administración oral, administración tópica ocular (como administración por instilación, en el saco conjuntival, intravítrea, subconjuntival y sub-tenoviana), administración intravenosa y administración transdérmica. Además, se formula en una forma de dosificación adecuada para la administración junto con aditivos farmacéuticamente aceptables si es necesario. Ejemplos de formas de dosificación adecuadas para la administración oral incluyen tabletas, cápsulas, gránulos y polvos, y ejemplos de formas de dosificación adecuadas para la administración parenteral incluyen inyecciones, gotas oculares, pomadas oftálmicas, parches, geles e insertos. Éstos se pueden preparar mediante las técnicas habituales ampliamente utilizadas en este campo. Además, este compuesto se puede formular también en una preparación destinada al implante intraocular o como una preparación DDS (sistema de liberación de fármacos), tal como una microesfera, distinta de aquellas preparaciones.

45 Por ejemplo, se pueden preparar tabletas mediante la apropiada selección y utilización de excipientes tales como lactosa, glucosa, D-manitol, hidrogenofosfato de calcio anhidro, almidón o sacarosa; desintegrantes como carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio, croscarmelosa de sodio, crospovidona, almidón, almidón parcialmente pregelatinizado o hidroxipropilcelulosa poco sustituida; ligantes como hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa, goma arábiga, almidón, almidón parcialmente pregelatinizado, polivinilpirrolidona o polivinil alcohol; lubricantes como

estearato de magnesio, estearato de calcio, talco, dióxido de silicio hidratado o aceites hidrogenados; agentes de revestimiento tales como sacarosa purificada, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa o polivinilpirrolidona; correctores tales como ácido cítrico, aspartame, ácido ascórbico o mentol; o similares.

5 La inyección se puede preparar mediante selección y utilización de agentes de tonicidad tales como cloruro de sodio; tampones como fosfato de sodio; agentes tensioactivos como monooleato de polioxietilensorbitano; agentes de viscosidad tales como metilcelulosa; o similares, según sea necesario.

10 Las gotas oculares se pueden preparar por selección y utilización de agentes de tonicidad tales como cloruro de sodio o glicerina concentrada; tampones como fosfato de sodio o acetato de sodio; agentes tensioactivos como monooleato de polioxietilensorbitano, estearato de polioxil-40 o polioxietileno, aceite de castor hidrogenado de polioxietileno; estabilizadores como citrato de sodio o edetato de sodio; conservantes tal como cloruro de benzalconio o parabeno; o similares, según sea necesario. El pH de la gota ocular puede oscilar siempre que se encuentre en el rango aceptable como preparación oftálmica, en general se sitúa preferentemente en el rango de 4 a 8. Además, las pomadas oftálmicas se pueden preparar con una base de uso habitual como petrolato blanco o parafina líquida.

15 El inserto se puede preparar mediante pulverización y mezcla de polímeros biodegradables por ejemplo hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polímero carboxivinilo o ácidos poliacrílicos junto con el presente compuesto y mediante moldeo por compresión del polvo resultante. Si es necesario, se pueden utilizar excipientes, ligantes, estabilizantes o agentes de ajuste del pH. La preparación para el implante intraocular se puede preparar con un polímero biodegradable tal como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímero de ácido láctico-ácido glicólico o hidroxipropilcelulosa.

20 La dosis de Ebselen se puede variar adecuadamente dependiendo de la forma de dosificación, de la severidad de los síntomas, la edad o el peso corporal del paciente que necesita la administración, según la opinión médica y similares. En cuanto a la administración oral, en general se puede administrar a un adulto, de una sola vez o dividida en varias veces, una dosis de 0,01 a 5.000 mg, preferentemente de 0,1 a 2.500 mg, en particular de 0,5 a 1.000 mg al día. En cuanto a la inyección, en general se puede administrar a un adulto, en una sola vez o dividida en varias veces, una dosis de 0,0001 a 2.000 mg al día. Con respecto a las gotas oculares o insertos, en general se puede administrar una preparación que contiene el ingrediente activo en una cantidad del 0,000001 al 10% (peso/volumen), preferentemente del 0,00001 al 1% (peso/volumen), en particular del 0,0001 al 0,1% (peso/volumen), en una sola vez o varias veces al día. Además, en cuanto a los parches, se puede aplicar a un adulto un parche que contiene el ingrediente activo en una cantidad de 0,0001 a 2.000 mg, y en cuanto a una preparación para el implante intraocular, se puede implantar en el ojo de un adulto una preparación que contiene el ingrediente activo en una cantidad de 0,0001 a 2.000 mg.

35 Tal como se describe a continuación, cuando se realizaron las siguientes pruebas farmacológicas, se demostró que el Ebselen tenía un excelente efecto inhibitor de la neovascularización coroidea en modelos de ratas de neovascularización coroidea inducida por láser. Además, se demostró que el Ebselen tenía también un efecto protector contra el daño celular inducido por peróxido de hidrógeno y el daño celular inducido por HNE en una línea celular epitelial del pigmento retiniano humano. Es decir, el Ebselen es útil como agente profiláctico o terapéutico en diversas condiciones patológicas de la AMD.

A continuación, se muestran los resultados de las pruebas farmacológicas y los ejemplos de preparación. Sin embargo, estos ejemplos están destinados a bien entender la presente invención, y no implican una limitación del alcance de la presente invención.

#### 40 **Prueba Farmacológica 1**

Se evaluó la utilidad del Ebselen utilizando una neovascularización coroidea inducida por láser en un modelo de rata.

##### *Método de Producción para un Modelo de Neovascularización Coroidea Inducida por Láser de Kriptón en la rata*

45 Se aplicó a una rata una anestesia general mediante administración intramuscular de 1 ml/kg de una solución mixta de un 5% (peso/volumen) de una solución para inyección de clorhidrato de quetamina y un 2% de una solución para inyección de clorhidrato de xilazina (7:1), y se instiló en los ojos una solución oftálmica de un 0,5% (peso/volumen) de tropicamida-0,5% - clorhidrato de fenilefrina para provocar la midriasis; entonces se llevó a cabo la fotocoagulación con un aparato de fotocoagulación con láser de kriptón. La fotocoagulación se llevó a cabo en el fondo de ojo posterior, en ocho sitios cada ojo, enfocando la capa retiniana profunda y evitando los vasos sanguíneos retinianos gruesos (condiciones de coagulación: tamaño del sitio: 100µm, salida: 100 mW, tiempo de coagulación: 0,1 s). Después de la fotocoagulación, se fotografió el fondo ocular y se confirmó el lugar donde se irradió con láser.

##### *Método de Administración del Fármaco*

Se suspendió el Ebselen en una solución de metilcelulosa al 1% (peso/volumen) (preparada mediante disolución de metilcelulosa en agua purificada) para producir una concentración final de 1 mg/ml ó de 3 mg/ml, y cada una de las suspensiones resultantes se administró vía oral dos veces al día a una dosis de 5 mg/kg ó 15 mg/kg (10 mg/kg ó 30

mg/kg al día) empezando 5 días antes de la fecha de la cirugía de fotocoagulación durante 12 días, incluido el día de la cirugía.

*Método de Evaluación*

5 El día 7 después de la fotocoagulación, se aplicó a cada rata una anestesia general mediante administración intramuscular de 1 ml/kg de una solución mixta de solución para inyección de clorhidrato de quetamina al 5% (peso/volumen) y de una solución para inyección de clorhidrato de xilazina al 2% (7:1), y se instiló en los ojos una solución oftálmica de clorhidrato de fenilefrina al 0,5% - tropicamida al 0,5% (peso/volumen) para provocar la midriasis; entonces se inyectó 0,1 ml de una solución de fluoresceína al 10% en la vena de la cola y se realizó la fotografía del fondo de ojo por fluorescencia. En la fotografía del fondo de ojo por fluorescencia, se estimó negativo una mancha donde no se observaba pérdida de fluorescencia (ausencia de neovascularización) y se estimó positivo una mancha donde se observaba pérdida de fluorescencia. Cuando aparecen dos sitios de fotocoagulación en los que se observa una pequeña pérdida de fluorescencia, se estimaron positivos (presencia de neovascularización). Se calculó el índice de incidencia de neovascularización coroidea (%) a partir del número de manchas positivas con relación a los ocho puntos de irradiación láser de acuerdo con la Ecuación 1, y calculándose el índice de inhibición (%) del fármaco a evaluar de acuerdo con la Ecuación 2. Los resultados de la evaluación del Ebselen se muestran en la Tabla 1. El número de casos en cada grupo de administración es 8.

Ecuación 1

Índice de incidencia de neovascularización coroidea (%) = (Número de manchas positivas/número total de sitios de fotocoagulación) x 100

20 Ecuación 2

Índice de inhibición (%) = (A0 - AX) / A0 x 100

A0: Índice de incidencia de neovascularización coroidea del grupo de administración del vehículo

AX: Índice de incidencia de neovascularización coroidea del grupo de administración del fármaco

**Tabla 1**

Grupo	Índice de inhibición (%)
Cada dosis de Ebselen: 5 mg/kg, BID	26,9
Cada dosis de Ebselen: 15 mg/kg, BID	28,9

25

*Discusión*

30 Como se observa en la Tabla 1, se demuestra que el Ebselen inhibe la neovascularización coroidea en los modelos de rata con neovascularización coroidea inducida por láser. Es decir, se demuestra que el Ebselen tiene un excelente efecto inhibitor de la neovascularización en la coroides y un notable efecto profiláctico o de mejora sobre la AMD (en particular, la AMD exudativa).

**Prueba Farmacológica 2**

35 El estrés oxidativo causa disfunción epitelial del pigmento retiniano y se considera como una de las causas del desarrollo o la progresión de la AMD (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006; 103: 11282-11287). Por tanto, utilizando células ARPE-19 (línea celular epitelial de pigmento retiniano humano) se evaluó el efecto protector del Ebselen sobre el daño celular inducido por peróxido de hidrógeno. Además, al mismo tiempo se evaluaron los efectos de la quercetina y la edaravona, que son compuestos generalmente conocidos por tener actividad antioxidante, realizándose un estudio comparativo.

*Método Experimental*

40 Se sembraron células ARPE-19 en una placa de 96 pocillos a 5 x 10<sup>3</sup> células / pocillo y se cultivaron durante 24 horas en condiciones de 37°C bajo un ambiente de un 5% de CO<sub>2</sub> / 95% de aire. Como medio de cultivo para ARPE-19, se utilizó DMEM/F12 que contenía un 10% de suero fetal bovino, 2mM de L-glutamina y 100 U/ml de penicilina, así como 100 µg/ml de estreptomycin. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y se cambió por un medio de cultivo que contenía Ebselen, quercetina o edaravona, o un medio de cultivo vehículo. También se disolvió cada compuesto en DMSO y se diluyó hasta 1.000 veces con el medio de cultivo para preparar un medio de cultivo que contenía cada compuesto a 6,25 µM 12,5µM. Se preparó el medio de cultivo vehículo por dilución de DMSO sin contener el compuesto diluido hasta 1000 veces con el medio de cultivo. Después de cultivar las células durante 24 horas en condiciones de 37°C bajo un ambiente del 5% de CO<sub>2</sub> / 95% de aire, se eliminó el medio de cultivo y se cambió por un

medio de cultivo que contenía peróxido de hidrógeno (250µM). Después de cultivar las células otras 24 horas más en las condiciones mencionadas anteriormente, se midió la viabilidad celular. En la medida se utilizó el Kit-8 de Recuento Celular (Dojin Kagaku).

*Método de Evaluación*

5 Se expresó la media ± el error estándar (%) de la viabilidad celular de cada grupo tratado con el compuesto tomando como 100% el valor medio de la viabilidad celular de las células no tratadas. El número de casos en cada grupo es de 4.

*Resultados*

10 El efecto protector de cada compuesto sobre el daño celular inducido por peróxido de hidrógeno se muestra en la Tabla 2. La viabilidad celular de las células ARPE-19 tratadas con peróxido de hidrógeno se redujo al 7,2% con respecto al caso no tratado. Como se observa a partir de la Tabla 2, el Ebselen protegió fuertemente las células contra el daño celular inducido por peróxido de hidrógeno de una forma dependiente de la concentración y, particularmente a 12,5 µM, el Ebselen aumentó la viabilidad celular al 82,6%. Por otra parte, se descubrió que la quercetina y la edaravona no tenían efecto protector de las células a cualquier concentración.

**Tabla 2**

Compuesto	Concentración de compuesto (µM)	Viabilidad celular (%)
Medio de cultivo vehículo	-	7,2 ± 0,7
Ebselen	6,25	27,1 ± 1,7
Ebselen	12,5	82,6 ± 5,4
Quercetina	6,25	8,0 ± 0,1
Quercetina	12,5	3,8 ± 0,4
Edaravona	6,25	7,7 ± 0,7
Edaravona	12,5	7,5 ± 0,7

15

*Discusión*

A partir de los resultados anteriores se descubre que el Ebselen muestra un fuerte efecto protector sobre el daño celular epitelial del pigmento retiniano inducido por peróxido de hidrógeno. Por otra parte, debido al hecho de que otros compuestos con actividad antioxidante no muestran este efecto, es sorprendente descubrir que el Ebselen también posee dicho efecto protector sobre el daño celular. Es decir, se demuestra que el Ebselen tiene un efecto profiláctico o de mejora sobre la AMD (en particular la AMD temprana y atrófica).

20

**Prueba Farmacológica 3**

Es conocido que las especies reactivas de oxígeno favorecen la peroxidación lipídica de las membranas, lo que resulta en la producción de HNE (Exp. Eye. Res., 2006; 83: 165-175). El HNE forma un enlace covalente con una cadena lateral de cisteína, lisina o histidina de una proteína e inhibe la función normal de la proteína, teniendo por tanto alta actividad citotóxica (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2007; 48: 3469-3479). Se reporta que en las drusas por debajo de la retina está también presente una proteína modificada por HNE, lo que se considera como un depósito que induce AMD; se considera que provoca daño celular epitelial del pigmento retiniano y constituye una de las causas del desarrollo o de la progresión de enfermedades atribuidas al daño epitelial del pigmento retiniano (Mol. Vis., 2005; 11: 1122-1134, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2003; 44: 3663-3668, FEBS Lett., 2002; 528: 217-221). Por tanto, utilizando células ARPE-19 se evaluó el efecto protector del Ebselen sobre el daño celular inducido por HNE. Además, los efectos de la quercetina y la edaravona, que son compuestos bien conocidos su actividad antioxidante, se evaluaron también al mismo tiempo, realizándose un estudio comparativo.

25

30

*Método Experimental*

35 Se sembraron células ARPE-19 en una placa de 96 pocillos a 5 x 10<sup>3</sup> células/pocillo y se cultivaron durante 24 horas en condiciones de 37°C bajo un ambiente con un 5% de CO<sub>2</sub> / 95% de aire. Como medio de cultivo para ARPE-19, se utilizó un DMEM/F12 que contenía un 10% de suero fetal bovino, 2mM de L-glutamina y 100 U/ml de penicilina, así como 100 µg/ml de estreptomina. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y se cambió por un medio de cultivo que contenía Ebselen, quercetina o edaravona, o un medio de cultivo vehículo. Además, se disolvió cada compuesto en DMSO y se diluyó hasta 1.000 veces con el medio de cultivo para preparar un medio de cultivo que contenía cada compuesto a 12,5 µM. Se preparó el medio de cultivo vehículo mediante la dilución de DMSO sin contener el compuesto

40

diluido hasta 1.000 veces con el medio de cultivo. Después de cultivar las células durante 24 horas en condiciones de 37°C bajo un ambiente del 5% de CO<sub>2</sub> / 95% de aire, se eliminó el medio de cultivo y se cambió por un medio de cultivo que contenía HNE (100µM). Después de cultivar las células otras 24 horas más en las condiciones mencionadas anteriormente, se midió la viabilidad celular. En la medida se utilizó el Kit-8 de Recuento Celular (Dojin Kagaku).

#### 5 *Método de Evaluación*

Se calculó la media ± el error estándar (%) de la viabilidad celular de cada grupo tratado con el compuesto tomando como 100% el valor medio de la viabilidad celular de las células no tratadas. El número de casos en cada grupo es de 4.

#### *Resultados*

10 El efecto protector celular de cada compuesto sobre el daño celular inducido por HNE se muestra en la Tabla 3. La viabilidad celular de las células ARPE-19 tratadas con HNE se redujo al 21,9% con respecto al caso no tratado. Como se evidencia a partir de la Tabla 3, el Ebselen protegió fuertemente las células contra el daño celular inducido por HNE y aumentó la viabilidad celular al 92,9%. Por otra parte, se descubrió que la quercetina y la edaravona no tenían un efecto protector celular.

**Tabla 3**

Compuesto	Concentración de compuesto (µM)	Viabilidad celular (%)
Medio de cultivo vehículo	-	21,9 ± 2,0
Ebselen	12,5	92,9 ± 2,2
Quercetina	12,5	28,6 ± 0,9
Edaravona	12,5	24,5 ± 1,1

15

#### *Discusión*

A partir de los resultados anteriores se infiere que el Ebselen muestra un fuerte efecto protector sobre el daño celular epitelial del pigmento retiniano inducido por HNE. Por otra parte, debido al hecho de que otros compuestos con actividad antioxidante no tienen este efecto, es sorprendente descubrir que el Ebselen también posee dicho efecto protector sobre el daño celular. Es decir, se demuestra que el Ebselen tiene un efecto profiláctico o de mejora sobre la AMD (en particular la AMD temprana y atrófica).

20

#### **Prueba Farmacológica 4**

Un modelo de daño producido por luz es un modelo de animal en el que el daño ha sido inducido por irradiación luminosa, principalmente en las células fotorreceptoras y en la capa celular epitelial del pigmento retiniano, siendo esencialmente utilizado como modelo de animal de degeneración retiniana (por ejemplo por AMD, AMD particularmente atrófica o retinosis pigmentaria) (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2005; 46: 979-987).

25

#### *Método de Producción para un Modelo de Rata de Daño producido por la luz*

Tras instilar una solución oftálmica de tropicamida al 0,5% (peso/volumen) - clorhidrato de fenilefrina al 0,5% en los ojos de una rata para provocar midriasis, se irradió luz (por ejemplo iluminancia: 2.000 lux, tiempo de irradiación: 48 horas) con un aparato para inducir daño por luz, induciendo así un daño producido por luz.

30

#### *Método de Evaluación*

Se disolvió el Ebselen en un vehículo adecuado y se administró a cada rata antes de la irradiación de luz. Al finalizar la irradiación de luz, en una sala oscura se llevó a cabo la adaptación a la oscuridad durante 4 horas. Se aplicó a la rata anestesia general mediante administración intramuscular de 1 ml/kg de una solución mixta de una solución para inyección de quetamina al 5% (peso/volumen) y una solución para inyección de clorhidrato de xilazina al 2% (7:1), y se instiló una solución oftálmica de tropicamida al 0,5% (peso / volumen) - clorhidrato de fenilefrina al 0,5% en los ojos para provocar midriasis. Entonces se midió el electroretinograma (ERG) y se calcularon las amplitudes de las ondas a- y b- a partir de las formas de onda obtenidas. Calculando el índice de inhibición (%) del Ebselen contra la disminución en las amplitudes de las ondas a- y b- (daño de las células fotorreceptoras) provocada por la irradiación luminosa, se puede evaluar el efecto profiláctico o de mejora del Ebselen sobre la AMD (en particular la AMD atrófica). Además, en el ojo después de la medición del ERG, el número de núcleos en la capa nuclear externa se cuenta patológicamente. Calculando también el índice de inhibición (%) del Ebselen contra la disminución del número de núcleos en la capa nuclear externa debida a la irradiación de luz, el efecto profiláctico o de mejora del Ebselen sobre la AMD (en particular la AMD atrófica) se puede evaluar de manera similar.

35

40

**Ejemplos de Preparación**

Los productos farmacéuticos de la invención se describen de forma más específica con referencia a ejemplos de preparación, sin embargo, la invención no se limita sólo a dichos ejemplos.

**Ejemplo de Formulación 1: Gotas oculares****en 100 ml**

Ebselen	10 mg
Cloruro de sodio	900 mg
Polisorbato 80	q.s.
Hidrogenofosfato de disodio	q.s.
Dihidrogenofosfato de sodio	q.s.
Agua estéril purificada	q.s.

- 5 Se añaden Ebselen y los demás ingredientes mencionados anteriormente a agua estéril purificada y se mezclan bien, preparándose gotas oculares. Cambiando la cantidad de Ebselen se puede preparar una gota ocular que contiene Ebselen a una concentración del 0,05% (peso/volumen), 0,1% (peso/volumen), 0,5% (peso/volumen) ó 1% (peso/volumen).

**Ejemplo de Formulación 2: Pomada oftálmica****en 100 g**

Ebselen	0,3 g
Parafina líquida	10,0 g
Petrolato blanco	q.s.

- 10 Se añade Ebselen a petrolato blanco y parafina líquida uniformemente fundidos, se mezclan bien estos ingredientes y se enfría progresivamente la mezcla resultante, con ello se prepara una pomada oftálmica. Cambiando la cantidad de Ebselen se puede preparar una pomada oftálmica que contiene Ebselen a una concentración del 0,05% (peso/volumen), 0,1% (peso/volumen), 0,5% (peso/volumen), 1% (peso/volumen) ó 3% (peso/volumen).

**Ejemplo de Formulación 3: Tabletas****en 100 mg**

Ebselen	1 mg
Lactosa	66,4 mg
Almidón de maíz	20 mg
Carboximetilcelulosa de calcio	6 mg
Hidroxipropilcelulosa	6 mg
Estearato de magnesio	0,6 mg

15

Se mezclan en un mezclador Ebselen y lactosa, se añaden a carboximetilcelulosa de calcio e hidroxipropilcelulosa y se granula la mezcla resultante. Los gránulos obtenidos se secan, seguidamente se dimensionan. Entonces se añade estearato de magnesio, se mezcla con los gránulos dimensionados y la mezcla resultante se transforma en tabletas mediante una máquina formadora de tabletas. Cambiando la cantidad de Ebselen se puede preparar una tableta que contiene Ebselen en una cantidad de 0,1 mg, 10 mg ó 50 mg en 100 mg de tableta.

20



**Ejemplo de Preparación 4: Inyección**  
**en 10 ml**

Ebselen	10 mg
Cloruro de sodio	90 mg
Polisorbato 80	q.s.
Agua estéril purificada	q.s.

5

Se disuelven Ebselen y cloruro de sodio en agua estéril purificada, preparándose una inyección. Cambiando la cantidad de Ebselen se puede preparar una inyección que contiene Ebselen en una cantidad de 0,1 mg, 10 mg ó 50 mg en 10 ml de inyección.

Aplicación Industrial

10

El Ebselen tiene un excelente efecto inhibidor sobre la neovascularización coroidea y también tiene un efecto protector contra el daño celular inducido por peróxido de hidrógeno y contra el daño celular inducido por HNE en una línea celular epitelial de pigmento retiniano humano. En consecuencia, el Ebselen es útil como agente profiláctico o terapéutico en diversas condiciones patológicas de degeneración macular asociada a la edad.

**REIVINDICACIONES**

1. Agente para su utilización en la profilaxis o terapia de la degeneración macular asociada a la edad, que comprende 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona o una sal de la misma como ingrediente activo.
- 5 2. Agente según la reivindicación 1, caracterizado porque la vía de administración es administración por instilación, administración intravítrea, administración subconjuntival, administración en el saco conjuntival, administración sub-tenovial o administración oral.
3. Agente según la reivindicación 1, caracterizado porque la forma de dosificación es como gota ocular, pomada oftálmica, inserto, parche, inyección, tableta, gránulo fino o cápsula.