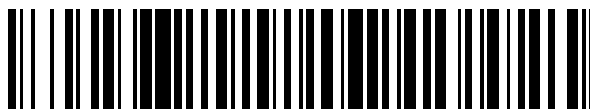


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 123**

51 Int. Cl.:

A61K 31/395 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2007** **E 11009733 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013** **EP 2428210**

54 Título: **Inhibidores de MAPK p38 para uso en el tratamiento de hipertensión ocular**

30 Prioridad:

22.12.2006 US 615454

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2013

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

CLARK, ABBOT F.;
MCNATT, LORETTA y
WANG, WAN-HENG

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 424 123 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

Inhibidores de MAPK p38 para uso en el tratamiento de hipertensión ocular

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere al campo del diagnóstico y tratamiento de la hipertensión ocular. Más específicamente, la invención proporciona usos para la hipertensión ocular.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 Existen una cantidad de condiciones oculares que son ocasionadas o agravadas por el daño a la parte superior del nervio óptico, degeneración de los tejidos oculares, y/o presión intraocular elevada. Por ejemplo, los "glaucomas" son un grupo de enfermedades que debilitan el ojo que son una causa principal de ceguera irreversible en los Estados Unidos y otras naciones desarrolladas. El Glaucoma primario de ángulo abierto ("POAG") es la forma más común de glaucoma. La enfermedad se caracteriza por la degeneración de la malla trabecular, que conduce a la obstrucción de la habilidad normal del humor acuoso para dejar el ojo sin cierre del espacio (por ejemplo, el

20 "ángulo") entre el iris y la córnea (Vaughan, D. et al., (1992)). Una característica de tal obstrucción en esta enfermedad es una presión intraocular incrementada ("IOP"), que trae como resultado una pérdida progresiva de la visión y ceguera si no es tratada de manera adecuada y de una forma oportuna. Se estima que la enfermedad afecta entre el 0,4% y el 3,3% de todos los adultos mayores de 40 años de edad (Leske, M. C. et al. (1986); Bengtsson, B. (1989); Strong, N. P. (1992)). Además, la prevalencia de la enfermedad se incrementa con la edad hasta más del 6% de las personas de 75 o mas años de edad (Strong, N. P., (1992)).

El glaucoma afecta tres tejidos separados en el ojo. La IOP elevada asociada con POAG se debe a cambios morfológicos y bioquímicos en la malla trabecular (TM), un tejido ubicado en el ángulo entre la córnea y el iris. La mayor parte del humor acuoso nutritivo se encuentra en el segmento anterior del ojo a través de la TM. La pérdida

30 progresiva de células de la TM y la acumulación de desechos extracelulares en la TM de ojos con glaucoma conduce a una mayor resistencia a la pérdida de agua, elevando de este modo la IOP. Una IOP elevada, así como otros factores tales como isquemia, ocasionan cambios degenerativos en la parte superior del nervio óptico (ONH) lo que conduce a una "escarificación" progresiva de la ONH y pérdida de las células y axones ganglionares de la retina. Se desconocen los mecanismos moleculares detallados responsables del daño glaucomatoso a la TM, la ONH, y las

35 células ganglionares retinales.

Hace veinte años, los efectos combinados de la hipertensión ocular, la isquemia y la distorsión mecánica de la parte superior del nervio óptico fueron ampliamente debatidos como los principales factores causantes del progreso de la pérdida del campo visual en el glaucoma. Desde entonces, otros factores incluyendo excitotoxicidad, óxido nítrico,

40 ausencia de factores neurotróficos vitales, anomalías en la interacción glial/neuronal y genética han sido implicados en el proceso degenerativo de la enfermedad. La consideración de elementos genéticos moleculares merece algo de discusión en la medida en que puede definir finalmente el mecanismo de muerte celular y proporcionar la distinción de las diferentes formas de glaucoma. Durante los últimos 10 años, se han mapeado más de 15 genes de glaucoma diferentes y se han identificado 7 genes de glaucoma. Estos incluyen seis genes mapeados (*GLC1A-GLC1F*) y dos

45 genes identificados (*MYOC* y *OPTN*) para el glaucoma primario de ángulo abierto, dos genes mapeados (*GLC3A-GLC3B*) y un gen identificado para glaucoma congénito (*CYP1B1*), dos genes mapeados para dispersión pigmentaria/glaucoma pigmentario, y una cantidad de genes para formas en desarrollo o sindrómicas de glaucoma (*FOXC1*, *P1TX2*, *LMX1B*, *PAX6*).

50 Por lo tanto, cada forma de glaucoma puede tener una patología única y en consecuencia se puede requerir de un enfoque terapéutico distinto para el manejo de la enfermedad. Por ejemplo, un fármaco que lleva a cabo la expresión de las enzimas que degradan la matriz extracelular de la parte superior del nervio óptico probablemente no evitaría la muerte RGC ocasionada por la excitotoxicidad. En el glaucoma, la muerte RGC se presenta a través de un proceso llamado apoptosis (muerte celular programada). Se ha especulado que diferentes tipos de agresiones que

55 pueden ocasionar la muerte pueden hacerlo de este modo al converger en unas cuantas rutas comunes. Si nos enfocamos mas abajo en una ruta común es una estrategia que puede ampliar la utilidad de un fármaco e incrementar la probabilidad de que pueda ser útil en el manejo de diferentes formas de la enfermedad. Sin embargo, es más probable que los fármacos que efectúan múltiples rutas produzcan efectos secundarios indeseables. Con el advenimiento de los kits de diagnóstico basados en genes para identificar formas específicas de glaucoma, se

60 pueden probar agentes neuroprotectores selectivos con el propósito de reducir el grado de variación acerca de la respuesta medida.

El glaucoma es actualmente diagnosticado con base en signos específicos de la enfermedad (cambios característicos de la parte superior del nervio óptico y pérdida del campo visual). Sin embargo, más de la mitad de la

65 población con glaucoma no están conscientes de que padecen esta enfermedad de pérdida de la vista y para el

momento en que son diagnosticados, han perdido ya de manera irreversible aproximadamente 30 - 50% de sus células ganglionares retinales. Por lo tanto, se necesitan métodos mejorados para el diagnóstico temprano del glaucoma.

La terapia actual del glaucoma está dirigida a reducir la IOP, un factor de riesgo importante para el desarrollo y avance del glaucoma. Sin embargo, ninguna de las terapias de reducción de la IOP realmente interviene en el proceso de la enfermedad glaucomatosa responsable por una IOP elevada y el daño progresivo del segmento anterior continúa. Esta es una posible razón por la cual la mayoría de los pacientes se vuelven "resistentes" a las terapias convencionales del glaucoma. Por lo tanto, lo que se necesita es un método terapéutico para alterar (mediante inhibición o incluso reversión) el proceso de la enfermedad.

Breve descripción de la invención

La presente invención supera estos y otros inconvenientes del estado de la técnica proporcionando agentes que inhiben la MAP quinasa p38 para el uso para el tratamiento de la hipertensión ocular, donde dichos agentes son para administración ocular tópica. En un aspecto, la presente invención proporciona un agente seleccionado del grupo que consiste de SB202190, SB203580, SB220025, PD 169316, SB239063, 3-(4-fluorofenil)-2-(piridin-4-il)-1H-pirrol-3,2-b]piridina, BIRB-796, CalBio506126, RO3201195 y R1487 para su uso en el tratamiento de la hipertensión ocular, en donde dicho agente es para administración ocular tópica.

Aquí se divulga una composición farmacéutica para el tratamiento de la hipertensión ocular que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor de la MAP quinasa p38 y un vehículo farmacéutico. El inhibidor contenido en la composición puede ser cualquiera de los compuestos identificados anteriormente.

La presente invención se define por medio de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar de manera adicional ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede ser comprendida de mejor forma haciendo referencia a estos dibujos en combinación con la descripción detallada de formas de realización específicas presentadas aquí.

FIGURA 1. Análisis QPCR de la expresión de SAA en 12 tejidos de glaucoma versus 11 tejidos de TM normal. NTM y GTM representan el nivel promedio de expresión del gen en grupos normales y de glaucoma, respectivamente.

FIGURA 2A. Análisis QPCR de la expresión de SAA en líneas de células de TM. NTM y GTM representan el nivel de expresión promedio del gen en grupos normal y de glaucoma, respectivamente.

FIGURA 2B. Análisis QPCR de la expresión de SAA en tejidos de la parte superior del nervio óptico. NTM y GTM representan el nivel de expresión promedio del gen en los grupos normal y de glaucoma, respectivamente.

FIGURA 3. Proteína SAA en tejidos de TM de donantes normales y de glaucoma (n = 6). Se observó un incremento significativo (3 veces) en SAA en tejidos de TM de glaucoma comparado con tejido normal (p = 0,05). Las barras muestran el promedio +/- s.e.m.

FIGURA 4. Proteína SAA determinada por medio de ELISA en humor acuoso humano de individuos normales y glaucomatosos. Los valores se expresan como el promedio de SAA en ng/ml de humor acuoso, +/- s.e.m. (p = 0,0001).

FIGURA 5. Secreción de IL-8 por parte de células HL-60 en respuesta a concentraciones crecientes de rhSAA.

FIGURA 6. Efecto de Adv.SAA2 en ratones con IOP por medio de inyección intravítrea. Se midió la IOP con los tonómetros de rebote TonoLab®.

FIGURA 7. Expresión de SAA en ojos de ratón de ratones Balb/c 28 días después de la inyección intravítrea. Se midió la SAA por medio de ELISA. Control: ojos inyectados con Adv.nula y ojos no inyectados (ojos contralaterales de ojos inyectados con Adv.SAA2; n = 16); ojos inyectados Adv.SAA:Adv.SAA2 (n = 17).

FIGURA 8A y FIGURA 8B. Efecto de una inyección intravítrea de Ad.SAA2 + anticuerpo anti-CD40L sobre IOP de ratón Balb/c (FIGURA 8A) e hiperemia de iris (FIGURA 8B). Los datos se presentan como la media y el SEM.

FIGURA 9. Efecto de Amiloide A en Suero humano recombinante (rhSAA, 1 µg/mL; tratamiento iniciado en el tiempo 0) sobre IOP de segmentos anteriores humanos perfundidos.

FIGURA 10. Efecto de Amiloide A en Suero humano recombinante (rhSAA, 1 µg/mL; tratamiento iniciado en el tiempo 0) sobre nivel de interleuquina 8 (IL-8) en el perfundido de segmentos anteriores humanos sometidos a perfusión.

- 5 FIGURA 11. Efecto de los inhibidores de la quinasa MAP p38 sobre la inducción de IL-8 por el tratamiento con SAA (1 µg/mL) en células de TM. A: Efecto de SB203580 (4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol). B: Efecto de 4-azaindol y BIRB-796 (1-(5-ter-butil-2-p-tolil-2H-pirazol-3-il)-3(4-(2-morfolin-4-il-etoxi)naftalen-1-il)urea) en una concentración de 50 µM. Se midió IL-8 en el medio por medio de ELISA.
- 10 FIGURA 12. Inhibición de la secreción de IL-8 estimulada por SAA por medio de SB203580 en células de TM y en células HL-60. Se trataron células NTM650-03, p9 o HL-60 en DMEM libre de suero durante 4 horas con 1 µg/mL de SAA y las concentraciones indicadas de SB202580. Se midió IL-8 en el medio por medio de ELISA. IC₅₀ calculado = 15 µM en células de TM y 25 µM en células HL-60.
- 15 FIGURA 13. Inhibición de la secreción de IL-8 estimulada por SAA por medio de los inhibidores de la quinasa MAP p38, 4-azaindol y BIRB-796 en células HL-60 tratadas en DMEM libre de suero durante 4 horas con 1 µg/mL de SAA y las concentraciones indicadas de inhibidores. Se midió la IL-8 en el medio por medio de ELISA. IC₅₀ calculado: 4 azaindol = 0,3 µM, BIRB-796 = 0,5 µM.

20 Descripción detallada

El glaucoma es un grupo heterogéneo de neuropatías ópticas que comparten ciertas características clínicas. La pérdida de la visión en el glaucoma se debe a la muerte selectiva de células ganglionares retíneas en la retina neural que se diagnostica clínicamente por los cambios característicos en el campo visual, defectos de la capa de la fibra nerviosa, y una escarificación progresiva de la ONH. Uno de los factores principales de riesgo para el desarrollo de glaucoma es la presencia de hipertensión ocular (presión intraocular elevada, IOP). La IOP también parece estar involucrada en la patogénesis de glaucoma de tensión normal donde los pacientes tienen lo que a menudo se considera que es una IOP normal. La IOP elevada asociada con glaucoma se debe a la elevada resistencia de la salida de flujo de humor acuoso en la malla trabecular (TM), un tejido especializado pequeño localizado en el ángulo corneal del iris de la cámara anterior ocular. Los cambios glaucomatosos de la TM incluyen una pérdida en las células de la TM y la deposición y acumulación de residuos extracelulares incluido material del tipo de la placa proteinácea. Además, existen también cambios que se presentan en la parte superior del nervio óptico glaucomatoso (ONH). En ojos glaucomatosos, existen cambios morfológicos y de movilidad en células de la gliales de la ONH. En respuesta a una IOP elevada y/o agresiones esquémicas transitorias, existe un cambio en la composición de la matriz extracelular de la ONH y alteraciones en las morfologías del axón de las celular ganglionares y de las célula gliales.

Los presentes inventores han descubierto que la expresión del ARNm y la proteína de Amiloide A en Suero (SAA) favorecen significativamente la expresión en los tejidos y células de la TM glaucomatosa. Los inventores han verificado la expresión diferencial de ARNm observada utilización chips del gen Affymetrix por medio de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (QPCR) y niveles incrementados de proteína SAA por medio de ELISA para SAA. Esta es la primera vez que se ha mostrado que SAA se expresa en la TM.

La SAA humana comprende una cantidad de apolipoproteínas diferencialmente expresadas codificadas por genes localizados sobre el brazo corto del cromosoma 11. Existen cuatro isoformas de las SAA. Las SAA1 se conocen como reactivos de la fase aguda, como la proteína reactiva C, es decir, se favorece dramáticamente su expresión por medio de citoquinas proinflamatorias. También se proveen las regiones promotoras 5'UTR de los genes SAA1 y SAA2. SAA3 es un pseudogen y SAA4 un gen constitutivamente expresado de bajo nivel que codifica SAA4 constitutivo. SAA2 tiene dos isoformas, SAA2α y SAA2β que se diferencian únicamente en un amino ácido. Las proteínas SAA1 y SAA2 son 93,5% idénticas a nivel de aminoácidos y estos genes son 96,7% idénticos a nivel de nucleótidos.

SAA es un reactivo de fase aguda cuyo nivel en la sangre se eleva aproximadamente 1000 veces como parte de la respuesta del cuerpo a diferentes lesiones, que incluyen trauma, infección, inflamación, y neoplasia. Como reactivo de fase aguda, se ha considerado que el hígado es el sitio primario de expresión. Sin embargo, se describió inicialmente la expresión de SSA extrahepática en tejidos de ratón y después en células de lesiones ateroscleróticas humanas (O'Hara et al., 2000). Posteriormente, se encontró ARNm de SAA ampliamente expresado en muchos tejidos humanos histológicamente normales. Se observó la expresión localizada en una variedad de tejidos, incluyendo mama, estómago, intestino grueso y delgado, próstata, pulmón, páncreas, riñón, amígdala, tiroides, pituitaria, placenta, epidermis de la piel, y neuronas cerebrales. Se observó también la expresión en linfocitos, células de plasma, y células endoteliales. Se ha reportado también la expresión de proteína SAA colocalizada con expresión de ARNm de SAA en tejidos extrahepáticos humanos histológicamente normales. (Liang et al., 1997; Urieli-Shoval et al., 1998).

Las isoformas de SAA son apolipoproteínas que se convierten en un componente principal de lipoproteína de alta densidad (HDL) en el plasma sanguíneo de mamíferos y desplaza A-I (ApoA-I) y fosfolípido de las partículas de HDL (Miida et al., 1999). SAA enlaza el colesterol y puede servir como una proteína transitoria de enlazamiento de colesterol. Además, la sobre-expresión de SAA1 o SAA2 conduce a la formación de fibrilos lineales en depósitos amiloides, lo que puede conducir a patogénesis (Uhlir y Whitehead 1999; Liang et al., 1997). SAA juega un papel importante en las infecciones, inflamación, y en la estimulación de la reparación de tejidos. La concentración de SAA puede incrementarse hasta 1000 veces después de una inflamación, infección, necrosis, y declina rápidamente después de la recuperación. Por lo tanto, se considera que la concentración de SSA en suero es un marcador útil con el cual se controla la actividad de enfermedad inflamatoria. Se favorece la expresión de la biosíntesis hepática de SAA por medio de citoquinas pro-inflamatorias, lo que conduce a una respuesta de fase aguda. Las concentraciones de SSA crónicamente elevadas son un prerrequisito para la patogénesis de amiloidosis secundaria, una enfermedad progresiva y en algunas veces fatal caracterizada por la deposición en los órganos principales de placas insolubles compuestas principalmente de SSA escindida en forma proteolítica. Este mismo proceso también puede conducir a aterosclerosis. Existe un requerimiento tanto por mecanismos de control positivos y negativos de SSA para mantener la homeostasis. Estos mecanismos permiten la rápida inducción de la expresión de SSA a fin de cumplir con las funciones protectoras del huésped; pero también deben garantizar que la expresión de SAA sea rápidamente retornada a los niveles de línea de base para evitar amiloidosis. Estos mecanismos incluyen modulación de la actividad promotora que involucran, por ejemplo, al factor nuclear inductor kB (NF-kB) y su IκB inhibidor, el favorecimiento de la expresión de factores de transcripción del factor nuclear para la familia de la interleucina-6 (NF-IL6) y represores transcripcionales tales como yin y yang 1 (YY1). La modulación post-transcripcional que involucra cambios en la estabilidad y en la eficiencia de la traducción del ARNm permite un control adicional que favorece o reduce la expresión de la síntesis de la proteína SAA que se va a alcanzar. En las últimas etapas de la respuesta de AP, se reduce la expresión en forma efectiva de SAA a través de la mayor producción de antagonistas de citoquina tales como el antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1Ra) y de receptores de citoquina solubles, lo que resulta en menos transducción de la señal dirigida por citoquinas proinflamatorias (Jensen y Whitehead 1998).

Existen diferentes receptores que sugieren que la amiloidosis primaria puede estar asociada con glaucoma. Por ejemplo, se encontró que se depositaba amiloide en diferentes tejidos oculares incluyendo el humor vítreo, la retina, la corioidea, el iris, el cristalino y la TM en los pacientes con amiloidosis sistémica primaria (Schwartz et al., 1982). Ermilov et al., (1993) reportaron que en 478 ojos de 313 pacientes, con edades comprendidas entre 25 y 90 años, con cataratas, glaucoma, y/o diabetes mellitus, 66 (14%) de los ojos contenían amiloide-amiloide pseudoexfoliativo (PEA). Krasnov et al., (1996) reportaron que 44,4% de 115 pacientes con glaucoma de ángulo abierto revelaron deposiciones extracelulares de amiloide. La amiloidosis se reveló en la esclerótica en 82% de los casos y en el iris en 70% de los casos. Una cantidad de condiciones clínicas, incluyendo enfermedad de Alzheimer, exhiben depósitos aberrante de tejido amiloide asociados con la enfermedad. Sin embargo, los amiloides son molecularmente heterogéneos y son codificados por diferentes genes para amiloide. Los reportes previos no son claros con respecto a cuál(es) amiloide(s) deben asociarse con glaucoma. Los presente inventores han demostrado, por primera vez, que la expresión del gen para SAA se eleva significativamente en tejidos de la TM glaucomatosos. El aumento de SSA puede estar involucrado en la generación de IOP elevada y daño del nervio óptico lo que conduce a pérdida de la visión en pacientes con glaucoma. La presente invención proporciona un agente seleccionado del grupo que consiste de SB202190, SB203580, SB220025, PD 169316, SB239063, 3-(4-fluorofenil)-2-(piridin-4-il)-1H-pirrol-3,2-b]piridina, BIRB-796, CalBio506126, RO3201195 y R1487 para uso en el tratamiento de hipertensión ocular, en donde dicho agente es para administración ocular tópica.

Diagnóstico de Glaucoma

Con base en el hallazgo de los inventores de que ciertos individuos con glaucoma tienen mayores niveles de expresión de SAA, se describen aquí una variedad de métodos para diagnosticar el glaucoma. Ciertos métodos de la invención pueden detectar mutaciones en secuencias de ácido nucleico que resultan en niveles inapropiadamente altos de proteína SAA. Estos diagnósticos se pueden desarrollar con base en las secuencia de ácido nucleico conocidos de SAA humana, o la secuencia de codificada aminoácido (véase Miller 2001). Se pueden desarrollar otros métodos con base en la secuencia genómica de SAA humana o la secuencia de genes que regulan la expresión de SAA. Incluso se pueden desarrollar otros métodos con base en un cambio en el nivel de expresión del gen para SAA a nivel ARNm.

También se describen aquí métodos que pueden detectar la actividad o el nivel de proteínas de señalización de SAA o genes que codifican proteínas de señalización de SAA. Por ejemplo, se pueden desarrollar métodos que detectan actividad de señalización de SAA inapropiadamente baja, que incluyen por ejemplo, mutaciones que resultan en un funcionamiento inapropiado de componentes de señalización de SAA, que incluyen inducción de SAA de IL-8. Además, se pueden utilizar técnicas con base en ácido no-nucleico para detectar alteración en la cantidad o en la actividad específica de cualquiera de estas proteínas de señalización de SAA.

Actualmente se encuentran disponibles una variedad de medios para la persona capacitada para detectar niveles aberrantes o actividades de genes y de productos génicos. Estos métodos son bien conocidos y se han vuelto

rutinarios para la persona capacitada en la técnica. Por ejemplo, se encuentran disponibles muchos métodos para detectar alelos específicos en loci polimórficos humanos. El método preferido para detectar un alelo polimórfico específico dependerá, en parte, de la naturaleza molecular del polimorfismo. Las diferentes formas alélicas del locus polimórfico puede diferir en un solo par de bases del ADN. Tales polimorfismos de nucleótido individual (o los SNP) son contribuyentes principales para la variación genética, que comprenden algo así como el 80% de todos los polimorfismos conocidos, y se estima que su densidad en el genoma humano es en promedio de 1 por 1,000 pares de base. Una variedad de métodos se encuentran disponibles para detectar la presencia de un alelo polimórfico de un solo nucleótido particular en un individuo. Los avances en el campo han proporcionado una determinación precisa, fácil y económica a gran escala del genotipo de SNP. Por ejemplo, véase la Patente de los Estados Unidos No. 4,656,127; la Patente Francesa 2,650,840; la Solicitud PCT No. WO91/02087; la Solicitud PCT. No. WO92/15712; Komher et al., 1989; Sokolov 1990; Syvanen et al., 1990; Kuppuswamy et al., 1991; Prezant et al., 1992; Ugozzoli et al., 1992; Nyren et al., 1993; Roest et al., 1993; y van der Lijjt et al., 1994).

Se puede utilizar cualquier tipo de célula o tejido para obtener muestras de ácido nucleico para uso en el diagnóstico descrito aquí. Como se describe en este documento, se obtiene la muestra de ADN de un fluido corporal, por ejemplo, sangre, obtenida por medio de técnicas conocidas (por ejemplo, punción de una vena), o células bucales. Las muestras para uso en los métodos de diagnóstico descritos aquí se obtendrán a partir de células de la sangre o bucales. Alternativamente, las pruebas de ácido nucleico se pueden llevar a cabo sobre muestras secas (por ejemplo, cabello o piel).

Los procedimientos de diagnóstico también se pueden llevar a cabo *in situ* directamente sobre secciones de tejido (fijadas y/o congeladas) de tejido de pacientes obtenido de biopsias o resecciones, de tal manera que no sea necesaria la purificación del ácido nucleico. Se pueden utilizar reactivos de ácido nucleico como sondas y/o cebadores para tales procedimientos *in situ* (véase, por ejemplo, Nuovo 1992).

Además de los métodos que se enfocan principalmente en la detección de una secuencia de ácido nucleico, se pueden evaluar también perfiles en tales esquemas de detección. Se pueden generar perfiles de huellas dactilares, por ejemplo, por medio de la utilización de un procedimiento de despliegue diferencial, Análisis tipo Northern y/o RT-PCR.

Un método preferido de detección es hibridación específica de alelos utilizando sondas que traslapan una región de al menos un alelo de un componente de señalización de SAA que es indicativo de glaucoma y que tiene aproximadamente 5, 10, 20, 25 o 30 nucleótidos contiguos alrededor de la mutación o región polimórfica. Como se describe aquí, varias sondas capaces de hibridar específica con otras variantes alélicas involucradas en glaucoma se unen a un soporte de fase sólida, por ejemplo, un "chip" (que puede soportar aproximadamente hasta 250,000 oligonucleótidos). Los oligonucleótidos pueden ser unidos a un soporte sólido por medio de una variedad de procesos, incluyendo litografía. El análisis de detección de mutación utilizando estos chips que contienen oligonucleótidos, también llamados "arreglos de sonda de ADN" se describe por ejemplo, en Cronin et al., (1996). En un aspecto, un chip que contiene todas las variantes alélicas de al menos una región polimórfica de un gen. Se pone en contacto luego el soporte en fase sólida con un ácido nucleico de prueba y se detecta la hibridación con las sondas específicas. En consecuencia, se puede identificar la identidad de numerosas variantes alélicas de uno o mas genes en un experimento de hibridación simple.

Estas técnicas pueden incluir además la etapa de amplificación del ácido nucleico antes del análisis. Las técnicas de amplificación son conocidas por todos aquellos capacitados en el arte e incluyen, pero no se limitan a, clonación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa de alelos específicos (ASA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), reacción en cadena de la polimerasa anidada, replicación de secuencia auto sostenida (Guatelli et al., 1990), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh et al., 1989), y Q-Beta Replicasa (Lizardi, et al., 1988).

Los productos de amplificación pueden ser analizados en una variedad de formas, incluyendo, análisis de tamaño, digestión de restricción seguido por análisis de tamaño, detección de iniciadores oligonucleótidos específicamente marcados en los productos de reacción, hibridación de oligonucleótidos específico para alelos (ASO), detección de 5' exonucleasa específica de alelos, secuenciación, hibridación SSCP, y similares.

Los medios de detección en base en una PCR pueden incluir amplificación múltiple de una pluralidad de marcadores simultáneamente. Por ejemplo, es bien conocido en el arte la selección iniciadores de PCR para generar productos PCR que no traslapan en tamaño y pueden ser analizados de manera simultánea. De manera alternativa, es posible amplificar diferentes marcadores con iniciadores que son etiquetados diferencialmente y por tanto cada uno puede ser detectado diferencialmente. Desde luego, los medios de detección con base en hibridación permiten la detección diferencial de múltiples productos PCR en una muestra. Se conocen otras técnicas en el arte para permitir análisis múltiples de una pluralidad de marcadores.

En una modalidad meramente ilustrativa, el método incluye las etapas de (i) recolectar una muestra de células de un paciente, (ii) aislar ácido nucleico (por ejemplo, genómico, ARNm o ambos) a partir de las células de la muestra, (iii)

poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más iniciadores los cuales hibridan de manera específica 5' y 3' con al menos un alelo de SAA que es indicativo de glaucoma bajo condiciones tales que se presentan hibridación y amplificación del alelo, y (iv) detectar el producto de amplificación. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si dichas moléculas están presentes en cantidades muy bajas.

En un aspecto del ensayo, los niveles o actividades aberrantes de SAA que son indicativos de glaucoma se identifican por medio de alteraciones en patrones de escisión con enzimas de restricción. Por ejemplo, el ADN de control y de la muestra se aíslan, amplifican (opcionalmente), se digieren con una o mas endonucleasas de restricción, y se determinan los tamaños de la longitud del fragmento por medio de electroforesis en gel.

Como se describe aquí, cualquiera de una variedad de reacciones de secuenciación conocidas en el arte pueden ser utilizadas para secuenciar de forma directa el alelo. Los ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen aquellas basadas en las técnicas desarrolladas por Maxim y Gilbert (1977) o Sanger (1977). Como se describe adicionalmente aquí, que se puede utilizar cualquiera entre una variedad de procedimientos de secuenciación automatizados cuando se realizan los ensayos en cuestión, incluyendo la secuenciación por medio de espectrometría de masas (véase, por ejemplo el documento WO94/16101; Cohen et al., 1996; Griffin et al., 1993). Será evidente para alguien ordinariamente capacitado en el arte, que, para ciertos aspectos, se requiere determinar la ocurrencia de únicamente uno, dos o tres de las bases de ácido nucleico en la reacción de secuenciación. Por ejemplo, se puede llevar a cabo, rastreo de A o similar, por ejemplo, cuando solamente se detecta un ácido nucleico.

En un aspecto adicional, se puede utilizar la protección de los agentes de escisión (tal como una nucleasa, hidroxilamina, o tetraóxido de osmio y con piperidina) para detectar las bases no coincidentes en heterodúplex de ARN/ARN o ARN/ADN o ADN/ADN (Myers et al., 1985b; Cotton et al., 1988; Saleeba et al., 1992). Como se describe aquí, el ADN o el ARN de control pueden ser marcados para detección.

Como se describe adicionalmente aquí, la reacción de escisión no coincidente emplea una o más proteínas que reconocen pares de base no coincidentes en ADN bicatenario (las llamadas enzimas de "reparación de ADN no coincidente"). Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* escinde A en G/A no coincidentes y la ADN glicosilasa de timidina de células HeLa escinde T y G/T no coincidentes (Hsu et al., 1994; Patente de los Estados Unidos No. 5.459.039).

Como se describe adicionalmente aquí, las alteraciones en la movilidad electroforética serán utilizadas para identificar niveles o actividades aberrantes de SAA que son indicativas de glaucoma. Por ejemplo, se puede utilizar el polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP) para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y de tipo silvestre (Orita et al., 1989; Cotton 1993; Hayashi 1992; Keen et al., 1991).

Como se describe adicionalmente aquí, el movimiento de los alelos en geles de poliacrilamida que contiene un gradiente de desnaturizante se analiza utilizando electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) (Myers et al., 1985a). En un aspecto adicional, se usa un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente de agente desnaturizante para identificar diferencias en la movilidad de ADN de control y de muestra (Rosenbaum y Reissner 1987).

Los ejemplos de otras técnicas para detectar alelos incluyen, pero no se limitan a, hibridación selectiva de oligonucleótidos, amplificación selectiva, o extensión selectiva del iniciador. Por ejemplo, se pueden preparar los iniciadores de oligonucleótido en los cuales se coloca la mutación conocida o la diferencia de nucleótidos (por ejemplo, en variantes alélicas) de manera central y luego hibrida con ADN objetivo bajo condiciones que permiten la hibridación únicamente si se encuentra una perfecta coincidencia (Saiki et al., 1986; Saiki et al., 1989). Tales técnicas de hibridación de oligonucleótidos específicos de alelos pueden ser utilizadas para analizar una mutación o región polimórfica por reacción cuando se hibridan oligonucleótidos con ADN objetivo amplificado con PCR o una cantidad de mutaciones diferentes o regiones polimórficas cuando se unen los oligonucleótidos con la membrana de hibridación e hibridan con ADN objetivo marcado.

De manera alternativa, se puede utilizar tecnología de amplificación específica para alelos que depende de la amplificación selectiva por PCR. Los oligonucleótidos utilizados como iniciadores para amplificación específica pueden transportar la mutación o región polimórfica de interés en el centro de la molécula (de tal manera que la amplificación depende de la hibridación diferencial) (Gibbs et al., 1989) o en al final del extremo 3' de un iniciador donde, bajo condiciones apropiadas, se puede evitar la falta de coincidencia, o reducir la extensión de la polimerasa (Prossner 1993). Además, puede ser deseable introducir un nuevo sitio de restricción en la región de la mutación a fin de crear detección con base en la escisión (Gasparini et al., 1992). Se puede llevar a cabo también la amplificación utilizando Taq ligasa para la amplificación (Barany 1991). En tales casos, el enlace ocurrirá solamente si hay una perfecta coincidencia en el extremo 3' de la secuencia 5' haciendo posible detectar la presencia de una mutación conocida en un sitio específico al buscar la presencia o ausencia de amplificación.

Como se describe adicionalmente aquí, se lleva a cabo la identificación de una variante alélica usando un ensayo de enlace de oligonucleótidos (OLA), como se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 4,998,617 y en Landegren et al., 1988). Nickerson et al., han descrito un ensayo de detección de ácido nucleico que combina atributos de PCR y OLA (Nickerson et al., 1990). En este método, se utiliza PCR para lograr la amplificación exponencial del ADN objetivo, el cual es detectado posteriormente utilizando OLA.

Se han desarrollado diferentes técnicas con base en este método OLA y pueden ser utilizadas para detectar niveles o actividades aberrantes de SAA que son indicativos de glaucoma. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,593,826 y Tobe et al., (1996), describen tales técnicas que son frecuentemente utilizadas.

En un aspecto, se puede formular fenofibrato, un agonista del receptor α activado por un proliferador de peroxisoma (PPAR α), en una composición farmacéuticamente aceptable y utilizarlo para tratar glaucoma por medio de la modulación de la expresión de SAA. Los estudios han demostrado que el tratamiento con fenofibrato y WY 14643 reducen la concentración de SAA en plasma (Yamazaki et al., 2002). Se cree que otros agonistas de PPAR α , tales como ciprofibrato, ácido 2-bromohexadecanoico, bezafibrato, ciprofibrato y ciglitizona pueden ser utilizados también para el tratamiento de glaucoma.

Como se describe aquí, se pueden utilizar inhibidores de la quinasa MAP p38 para tratar glaucoma o hipertensión ocular y para disminuir la presión intraocular en un paciente que sufre de presión intraocular elevada por medio de la modulación de la expresión inducida por SAA de IL-8 y eventos de señalización secuencia abajo. Los inventores demostraron que SAA estimula la secreción de IL-8 en células y tejidos de la malla trabecular. Una ruta para favorecimiento de la expresión de IL-8 es a través de la activación de las quinasas MAP. Los inventores demostraron adicionalmente que los inhibidores de quinasa MAP p38 bloquean la inducción de SAA de IL-8 en células de la TM, en ojos humanos sometidos a cultivo por perfusión, e *in vivo* en ojos de roedor. Se encontró que los compuestos que representan diferentes clases de inhibidores de MAPK en células de la TM son inhibidores efectivos de la expresión de IL-8 inducida SAA (Tabla 3). Los más potentes de estos fueron los inhibidores de MAPK p38, SB203580, 4-azaindol, y BIRB-796 (FIGURA 11). Las curvas de respuesta a la dosis para la inhibición de SB203580 de IL-8 inducido SAA generadas tanto en células de la TM como en células HL60 produjeron resultados similares (IC_{50} = 15 μ M en células de la TM y 25 μ M en células HL60, FIGURA 12). Las curvas de inhibición para 3-(4-fluorofenil)-2-(piridin-4-il)-1H-pirrol[3,2-b] piridina (también denominada aquí como 4-azaindol) y BIRB-796 llevadas a cabo en células HL60 mostraron que ambos compuestos eran aproximadamente 10 veces más efectivos que SB203580 (IC_{50} = 0,3 para 4-azaindol y 0,5 μ M para BIRB-796 (FIGURA 13).

Tabla 3. Clases de compuesto seleccionados para la inhibición de la secreción de IL-8 inducida por SAA en células de la TM

Compuesto	Objetivo	Selectividad	% de inhibición de la secreción de IL-8 inducida por SAA				
			100 μ M	50 μ M	25 μ M	10 μ M	1 μ M
SB203580	MAPK	quinasa MAP p38	98,7	73,5	61,0	38,1	16,3
SB202190	MAPK	quinasa MAP p38		38,2		43,3	17,2
BIRB-796	MAPK	quinasa MAP p38		78,1		28,9	
4-azaindol	MAPK	quinasa MAP p38		94,3		22,6	
PD98059	MAPK	MEK		34,0			
U0126	MAPK	MEK		53,0		50,6	30,9
Fenofibrato	SAA	agonista de PPAR α		57,2		52,7	59,9

Los nombres químicos para los compuestos identificados en Tabla 3 son los siguientes:

88203580: 4-(4-fluorofenil)-2-(4o-metilsuifinilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol;
 SB202190: 4-[4-(4-fluorofenil)-5-(4-piridinil)-1H-imidazol-2-il]fenol
 BIRB-796: 1-(5-ter-butil-Z-p-tolil-2H-pirazol-3-il)-3-(4-(2-morfolin-4-il-etoxi)naftalen-1-il)urea;
 4-azaindol: 3-(4-fluorofenil)-2-(piridin-4-il)-1H-pirrol[3,2-b] piridina;
 PD98059: 2'-amino-3'-metoxiflavona;
 U0126: 1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminofiniltio)butadieno;
 CalBio506126: 2-(4-clorofenil)-4-(4-fluorofenil)-5-piridin-4-il-1,2-dihidropirazol-3-ona

Los ensayos *in vitro* mostraron que varios inhibidores MAPK p38 bloquearon significativamente la inducción de IL-8 por parte de SAA. Se evaluó la 3-(4-fluorofenil)-2-(piridin-4-il)-1H-pirrol[3,2-b]piridina, uno de los más potentes inhibidores de MAPK p38 para disminuir la IOP en el ratón por medio de aplicación tópica de una suspensión al 1% después de inyección intravítrea de Ad.SAA2 (2×10^7 pfu/ojo) + anti-CD40L. Adv.SAA2, provocó una elevación significativa de la IOP, la cual alcanzó los niveles pico los días 10 - 12 con un incremento de 10 - 12 mm de Hg desde la línea base, seguido por una declinación lenta. El día 24, la IOP estaba 6 - 7 mm de Hg por encima de la línea de base. Se bloqueó la hipertensión ocular por medio de la administración tópica de 4-azaindol (1%; dos veces al día). Después se detuvo la administración de 4-azaindol el día 7, la IOP volvió al mismo nivel que el grupo inyectado con Ad.SAA2 tratado con vehículo. Cuando se reanudó la administración del fármaco el día 13, la IOP disminuyó nuevamente hasta la línea de base el días 3 (FIGURA 8). Se repitió este experimento y se obtuvieron

resultados similares. Los datos *in vivo* mostraron que el inhibidor de MAPK p38, 4-azaindol, puede contrarrestar la hipertensión ocular inducida por Ad.SAA2.

Los compuestos preferidos para uso en la presente invención son aquellas clases de compuestos enlistados en la Tabla 3, y se extiende a las clases adicionales de compuestos que exhiben propiedades inhibitoras para las quinasas MAP p38 como se describe en estos ejemplos e incluyen SB202190, SB203580, SB220025, PD 169316, SB239063, 4-azaindol, BIRB-796, CalBio506126, RO3201195, R1487.

Los presentes inventores postulan adicionalmente que los agentes que evitan la muerte celular inducida por amiloide pueden ser útiles para la protección de las células de la TM y otras células oculares en la úvea anterior y en la parte posterior del ojo, especialmente la retina y la parte superior del nervio óptico.

Los agentes y los compuestos de esta invención se administran en forma tópica. Los Compuesto de la presente invención se incorporan en formulaciones oftálmicas tópicas para suministro al ojo. Los Compuestos se pueden combinar con preservantes, tensoactivos, reforzadores de viscosidad, reforzadores de penetración, amortiguadores, cloruro de sodio y agua oftalmológicamente aceptables para formar una suspensión o solución oftálmica acuosa estéril. Las formulaciones de soluciones oftálmicas se pueden preparar disolviendo un Compuesto en un amortiguador acuoso isotónico fisiológicamente aceptable. Además, la solución oftálmica puede incluir un tensoactivo oftalmológicamente aceptable para ayudar a disolver el Compuesto. Además, la solución oftálmica puede contener un agente para incrementar la viscosidad, tal como, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, o similares, para mejorar la retención de la formulación en el saco conjuntival. También se pueden utilizar agentes gelificantes, incluyendo, pero sin limitarse a, gelano y goma xantana. Con el propósito de preparar formulaciones estériles de ungüento oftálmico, se combina el ingrediente activo con un preservante en un vehículo apropiado, tal como, aceite mineral, lanolina líquida, o petrolato blanco. Las formulaciones estériles de gel oftálmico se pueden preparar suspensión el Compuesto en una base hidrofilica preparada a partir de la combinación de, por ejemplo, carbopol-974, o similares, de acuerdo con las formulaciones publicadas para preparaciones oftálmicas análogas; se pueden incorporar agentes preservantes y de tonicidad.

Los Compuestos se formulan preferiblemente como suspensiones o soluciones oftálmicas tópicas, con un pH de aproximadamente 4 a 8. El establecimiento de un régimen de dosis específico para cada individuo se deja a la discreción de los médicos. Los Compuestos estarán contenidos normalmente en estas formulaciones en una cantidad de 0,01% hasta 5% en peso, pero preferiblemente en una cantidad de 0,05% hasta 2% y lo más preferible en una cantidad de 0,1 hasta 1,0% en peso. La forma de dosificación puede ser una solución, microemulsión en suspensión. Por lo tanto, para presentación tópica se suministraran 1 a 2 gotas de estas formulaciones a la superficie del ojo, 1 a 4 veces por día de acuerdo con el criterio del médico tratante.

Los Compuestos se pueden utilizar también en combinación con otros agentes para tratamiento del glaucoma, tal como, pero sin limitarse a, bloqueadores β , prostaglandinas, inhibidores de anhidrasa carbónica, agonistas de α_2 , mióticos, y neuroprotectores.

Ejemplos:

Ejemplo 1. Expresión incrementada de SAA1 y SAA2 en células y tejidos de la TM glaucomatosa.

Las combinaciones de ARN de tejidos de la TM de 13 donantes normales versus 9 donantes de glaucoma se utilizaron para determinar la expresión génica utilizando el juego de GeneChips de Affymetric (HG-U133). Se identificó la expresión de amiloide A2 para incrementar 4 veces en glaucoma comparado con aquella en tejidos normales de la TM. Para confirmar este resultado, se realizó una QPCR utilizando ARN individual de 12 tejidos de la TM con glaucoma y 11 normales. Cinco de los 12 tejidos de la TM con glaucoma (42%) mostraron un incremento significativo en la expresión de SAA 1/2. El promedio de expresión de SAA en los 12 de la TM con glaucoma fue 5,4 veces comparado con aquella en los 11 de la TM normal (FIGURA 1). Además, se observó una tendencia similar de expresión diferencial de SAA en células de la TM con glaucoma o de tejidos de la parte superior del nervio óptico con glaucoma. Hubo un incremento promedio de 5,4 veces en células de la TM con glaucoma (14 líneas de células de la TM con glaucoma versus 11 normales, FIGURA 2A) y 118 veces en tejidos de la parte superior del nervio óptico con glaucoma (14 con glaucoma versus 12 normales, FIGURA 2B) comparado con normales, respectivamente. El ELISA de SAA en tejidos de la TM de 6 donantes normales y 6 donantes con glaucoma mostró que la proteína SAA incrementó significativamente también en tejidos de la TM con glaucoma comparado con normales. Hubo una diferencia de 3 veces en la concentración de SAA en tejido glaucomatoso comparado con tejido normal (11,3 y 3,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína respectivamente). Estos datos se muestran en la FIGURA 3.

Se demostró adicionalmente una asociación de expresión incrementada de SAA con glaucoma en humor acuoso humano. Se midió la proteína SAA por medio de ELISA en humor acuoso de 16 individuos normales y 20 glaucomatosos. Se encontró que SAA era casi 3 veces más alto en humor acuoso glaucomatoso que en muestras normales (10,0 ng/ml versus 3,7 ng/ml respectivamente). Los resultados se muestran en la FIGURA 4.

Ejemplo comparativo 2. Formulación de Fenofibrato para aplicación tópica:

Suspensión de fenofibrato al 1% para aplicación tópica para disminuir SAA y disminuir la IOP en el ojo.

Descripción	Concentración	Unidades	Propósito
Fenofibrato, NOC	1%	%P/V	Ingrediente activo
Hidroxipropil metilcelulosa	0,5%	%P/V	Modificador de viscosidad (2910) (E4M), USP
Fosfato dibásico de sodio	0,2%	%P/V	Agente amortiguador (anhidro), USP
Cloruro de sodio, USP	0,75%	%P/V	Agente de tonicidad
EDTA disódico	0,01%	%P/V	Agente de quelación (edatato disódico), USP
Polisorbato 80, NF	0,05%	%P/V	Agente humectante
Cloruro de benzalconio, NF	0,01%	%P/V	Preservante
Hidróxido de sodio, NF	Cantidad suficiente de acuerdo al pH	%P/V	Ajuste de pH
Ácido clorhídrico, NF	Cantidad suficiente de acuerdo al pH	%P/V	Ajuste de pH
Agua purificada, USP	Cantidad suficiente hasta el 100%	%P/V	Vehículo

5

Ejemplo comparativo 3. Procedimiento para seleccionar e identificar compuestos que alteran la expresión del ARNm para SAA o las proteínas SAA

Un método que se puede ser utilizado para seleccionar los agentes que alteran la expresión y la función de SAA es para determinar los cambios en los niveles de la proteína SAA. Los kits para ensayo *in vitro* para la determinación cuantitativa de Amiloide A en Suero (SAA) en suero de animal o de humano, plasma, soluciones amortiguadas, medios de cultivo celular, y extractos de tejido o de células se encuentran comercialmente disponibles. El ensayo es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich en de fase sólida. Se ha colocado un anticuerpo monoclonal específico para SAA sobre las paredes de una placa de microtitulación. Las muestras, incluyendo los estándares de contenido conocido de SAA, o desconocido, se añaden a estos pozos junto con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa o peroxidasa alcalina. Los anticuerpos se construyen de tal manera que ninguno interfieran con el epítipo de enlazamiento del otro. El SAA es capturado en la placa por medio del anticuerpo inmovilizado y marcado con el segundo anticuerpo conjugado en un procedimiento de una sola etapa. Después del período de incubación, se lava la placa para remover todo el material no enlazado y se añade un sustrato (PNPP o peróxido). La intensidad del producto coloreado es proporcional a la concentración de SAA presente en la muestra desconocida.

Ejemplo comparativo 4. Inducción de SAA en líneas de célula cultivadas para la selección de compuestos que alteran la expresión del ARNm para SAA o la proteína.

La línea de célula de hepatoma humano, HepG2, es ampliamente utilizada para estudios sobre la inducción de SAA por parte de las citoquinas, para transfección con plásmidos y ensayos de reportero. La síntesis de ARNm para SAA y de proteína puede ser inducida por varias citoquinas en diferentes líneas de células de hepatoma humano incluyendo PCL/PRF/5, HepB y HepG2 (Uhlir y Whitehead 1999). La síntesis de SAA por parte de células de músculo liso aórtico humano (HASMC) se induce por medio de hormonas glucocorticoides y no por medio las citoquinas proinflamatorias, IL-1, IL-6, y TNF- α , que estimulan la producción de SAA por parte de los hepatocitos (Kumon et al., 2002b; Kumon et al., 2001; Thorn y Whitehead 2002). SAA estimuló la migración quimiotáctica de HASMC en una forma que dependiente de la dosis cuando se ensayó utilizando una cámara de cultivo Chemotaxicell (Kumon et al., 2002a). La expresión del ARNm para SAA y la producción de proteína se demostró en cultivos primarios de sinoviocitos de artritis reumatoide (O'Hara et al., 2000).

Ejemplo 5. Análisis funcional de SAA en células cultivadas.

Propiedades como la de la citoquina de SAA incluyen la inducción de la secreción de IL-8 por parte de los neutrófilos. (Furlaneto y Campa, 2002; He et al., 2003). Se identificó que las células HL-60, una línea de célula promielocítica, que responden a SAA con una mayor secreción de IL-8, y pueden ser usadas para ensayos *in vitro* de la función de SAA. Se trataron las células HL-60 durante cuatro horas con concentraciones crecientes de SAA humano recombinante, y se midió IL-8 en el medio por medio de ELISA. Se incrementó la secreción de IL-8 en una forma dependiente de la dosis (FIGURA 5). Las células HL-60 se pueden utilizar como una línea de célula sustituta para ensayos funcionales para identificar los agentes que alteran la función SAA y los niveles de expresión.

Ejemplo 6. La expresión de SAA mediada por adenovirus incrementa la IOP y el inhibidor de MAPK p38 disminuye la IOP inducida en el ratón

Se estudió la capacidad de la expresión favorecida de SAA a través de adenovirus para elevar la IOP y la eficacia de los inhibidores MAPK p38 en el bloqueo de la IOP inducida en ratones.

1. La expresión favorecida de SAA eleva la IOP en un ratón

Se inyectó en forma intravítrea un ojo de cada uno de los ratones Balb/c con Adv.SAA2 (tratamiento) o Adv.nulo (vehículo) con una dosis de 7×10^7 pfu/ojo/2ul. El ojo contralateral de cada animal no fue inyectado. Además de Adv, cada animal recibió una inyección IP de anti-CD40L (0,5 mg/inyección) los días -1, 0, 1, 2, 5, 9, y 14 para prolongar el período de expresión de la Adv.SAA2. Se midió la IOP del ratón por medio de un Tonolab en forma de máscara. Se obtuvo la media de la IOP para cada ojo a partir de 18 a 30 mediciones. La inyección intravítrea de Adv.SAA2 en ratones aumentó significativamente la IOP (49% o 5,8 mm de Hg, $n = 6 - 8$, $p < 0,05$) (FIGURA 6). La expresión de SAA fue significativamente mayor en todos los ojos tratados con Adv.SAA2 que aquellos ojos de control incluidos los ojos tratados con vehículo y los ojos contralaterales sin inyección ($p < 0,0001$; $n = 16$) (FIGURA 7). Estos resultados demostraron que la expresión favorecida de SAA puede incrementar la IOP del ratón, proporcionando evidencia del vínculo de SAA con la patogénesis del glaucoma.

2. El inhibidor de MAPK p38 disminuye la IOP inducida por Adv.SAA2 en un ratón

Después de establecer que el 4-azaindol, un inhibidor de MAPK p38 inhibe la expresión de IL-8 inducida por SAA *in vitro*, los inventores analizaron el efecto del compuesto sobre la IOP del ratón después de una inyección intravítrea de Adv.SAA2 (2×10^7 pfu) + anti-CD40L por medio de administración tópica de 5 μ L de 4-azaindol al 1% o vehículo en ambos ojos, dos veces al día, desde el día -1 hasta el día 7 y desde el día 13 hasta el día 17. Nuevamente, la inyección intravítrea de Adv.SAA2 aumentó significativamente la IOP de ratón desde los días 4 hasta 24 (grupo con vehículo). La dosificación tópica de 4-azaindol inhibió significativamente la IOP inducida por Adv.SAA2 durante el período de duración del tratamiento (días -1 hasta 7 y días 13 hasta 17). El 4-azaindol no afectó la IOP en los ojos no inyectados (FIGURA 8A). Se observó hiperemia del iris en todos los ojos inyectados con Adv.SAA2 después del día 4 y disminuyó lentamente durante la segunda semana después de la inyección (FIGURA 8B). El 4-azaindol no afectó la hiperemia en los ojos inyectados, indicando que el efecto reductor de la IOP del 4-azaindol no fue a través de la disipación de la hiperemia del iris. Estos resultados demuestran el potencial de los inhibidores de la MAPK p38 para el tratamiento de la hipertensión ocular.

Ejemplo 7. La SAA recombinante disminuyó la facilidad de la salida en ojos humanos sometidos a cultivo por perfusión

Se sometieron a perfusión cinco pares de ojos humanos con un medio que contenía o bien SAA recombinante (1 μ g/mL) (ojo experimental) o un volumen equivalente de vehículo (ojo de control). Al final del período de cultivo, se examinaron 4 cuadrantes de cada ojo por medio de microscopio electrónico de transmisión para determinar la viabilidad de tejido de la TM. Se recolectó el perfundido de cada ojo y se utilizó para la medición por ELISA del nivel IL-8. Todos los cinco tenían una IOP elevada dentro de las 24 horas de tratamiento (FIGURA 9). Todos los cinco tenían un nivel elevado de IL-8 (FIGURA 10). El cambio en la IOP se correlaciona con el incremento inducido por SAA en la interleuquina-8 en los perfundidos. Todos los cinco pares de ojos tenían puntajes aceptables de viabilidad de la TM después de la perfusión. Estos resultados demostraron que un mayor nivel de SAA puede elevar la IOP en ojos humanos cultivados por perfusión.

Referencias

- Furlenato, CJ, and Campa A, A novel function of serum amyloid A: α potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 beta, and interleukin-8 by human blood neutrophil, BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN 268: 405 - 408 (2002).
- He, R, Sang H, Ye, RD, Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R, BLOOD 101: 1572 - 1581 (2003).
- Jensen LE and Whitehead AS, BIOCHEM. J. 334: 489 - 503 (1998).
- Jordat MS, et al., PLANTA MED. 68: 667 - 71 (2002).
- Kane et al., J. NEUROCHEM., 72: 1939 - 1947 (1999).
- Kumon, Y., Hosokawa, T., Suehiro, T., Ideda, Y., Sipe, J.D., and Hashimoto, K., Acute-phase, but not constitutive serum amyloid A (SAA) is chemotactic for cultured human aortic smooth muscle cells, AMYLOID 9: 237 - 241 (2002a).
- Kumon, Y., Suehiro, T., Faulkes, D.J., Hosakawa, T., Ideda, Y., Woo, P., Sipe, J.D., and Hashimoto, K., Transcriptional regulation of Serum Amyloid A1 gene expression in human aortic smooth muscle cells involves CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP) and is distinct from HepG2 cells" SCAND. J. IMMUNOL. 56: 504 - 511 (2002b).
- Kumon, Y., Suehiro, T., Hashimoto, K., and Sipe, J.D., Dexamethasone, but not IL-1 alone, upregulates acute phase serum amyloid A gene expression and production by cultured human aortic smooth muscle cells, SCAND J. IMMUNOL. 53: 7 - 12 (2001).

- Lambert et al., PROC. NAT. ACAD. SCI. USA 95: 6448 - 6453 (1998).
- Liang, J. S., Sloane, J. A., Wells, J. M., Abraham, C. R., Fine, R. E., and Sipe, J. D., Evidence for local production of acute phase response apolipoprotein serum amyloid A in Alzheimer's disease brain, NEUROSCI. LETT. 225: 73 - 76 (1997).
- 5 Liu et al., J. NEUROCHEM. 69: 2285 - 2293 (1997).
- Miida T., Yamada, T., Yamadera, T., Ozaki, K., Inano, K., Okada, M., Serum amyloid A protein generates pre-beta 1 high-density lipoprotein from alpha-migrating high-density lipoprotein, BIOCHEM. 38(51): 16958 - 16962 (1999).
- Miller, Genome Biology 3(1):reviews 3001.1-3001.15 (2001) (also at <http://genomebiology.com/2001/3/1/reviews/3001.1>)
- 10 Nakagami et al., EUR. J. PHARMACOL. 457: 11 - 17 (2002a).
- Nakagami et al., BR. J. PHARMACOL., 137: 676 - 682 (2002b).
- O'Hara, R., Murphy, E. P., Whitehead, A. S., FitzGerald, O., and Bresnihan, B., Acute-phase serum amyloid A production by rheumatoid arthritis synovial tissue, ARTHRITIS RES. 2: 142 - 144 (2000).
- Pike et al., J. NEUROSCI. 13: 1676 - 1687 (1993).
- 15 Thorn, C. F. and Whitehead, A. S., Differential glucocorticoid enhancement of the cytokine-driven transcriptional activation of the human acute phase serum amyloid A genes, SAA1 and SAA, J. IMMUNOL. 169: 399 - 406 (2002).
- Uhlir, C. M., and Whitehead, A. S., Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant, EUR. J. BIOCHEM. 265: 501 - 523 (1999).
- Urieli-Shoval, S., Cohen, P., Eisenberg, S., and Matzner, Y., Widespread expression of serum amyloid A in histologically normal human tissue. Predominant localization to the epithelium, J. HISTOCHEM. CYTOCHEM. 46: 1377 - 1384 (1998).
- 20 Yamazaki et al., BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RES. COMM., 290: 1114 - 1122 (2002).
- Yankner et al., SCIENCE 250: 279 - 282 (1990)
- Zhang et al., NEUROSCI. LETT. 312: 125 - 128 (2001)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un agente inhibidor de la quinasa MAP p38 para la preparación de un medicamento para tratar hipertensión ocular, en donde dicho agente es para administración ocular tópica a un paciente que requiera del mismo.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, en donde el agente se selecciona del grupo que consiste de SB202190, SB203580, SB220025, PD 169316, SB 239063, 3-(-4-fluorofenil)-2-(piridin-4-il)-1H-pirrol-3,2-b]piridina, BIRB-796, CalBio506126, RO3201195 y R1487.
- 15 3. Un agente inhibidor de la quinasa MAP p38 para uso en el tratamiento de hipertensión ocular, en donde dicho agente es para administración ocular tópica a un paciente que requiera del mismo.
- 20 4. El agente para uso de la reivindicación 3, en donde el agente se selecciona del grupo que consiste de SB202190, SB203580, SB220025, PD 169316, SB 239063, 3-(-4-fluorofenil)-2-(piridin-4-il)-1H-pirrol-3,2-b]piridina, BIRB-796, CalBio506126, RO3201195 y R1487.
- 25 5. Uso de un agente inhibidor de la quinasa MAP p38 para la preparación de un medicamento para disminuir la presión intraocular en un paciente que tiene una presión intraocular elevada, en donde dicho agente es para administración ocular tópica.
6. El uso de la reivindicación 5, en donde dicho agente se selecciona del grupo que consiste de SB202190, SB203580, SB220025, PD 169316, SB 239063, 3-(-4-fluorofenil)-2-(piridin-4-il)-1H-pirrol-3,2-b]piridina, BIRB-796, CalBio506126, RO3201195 y R1487.
7. Un agente inhibidor de la quinasa MAP p38 para uso en la disminución de la presión intraocular en un paciente que tiene una presión intraocular elevada, en donde dicho agente es para administración ocular tópica.
- 30 8. El agente para uso de la reivindicación 7, en donde el agente se selecciona del grupo que consiste de SB202190, SB203580, SB220025, PD 169316, SB 239063, 3-(-4-fluorofenil)-2-(piridin-4-il)-1H-pirrol-3,2-b]piridina, BIRB-796, CalBio506126, RO3201195 y R1487.

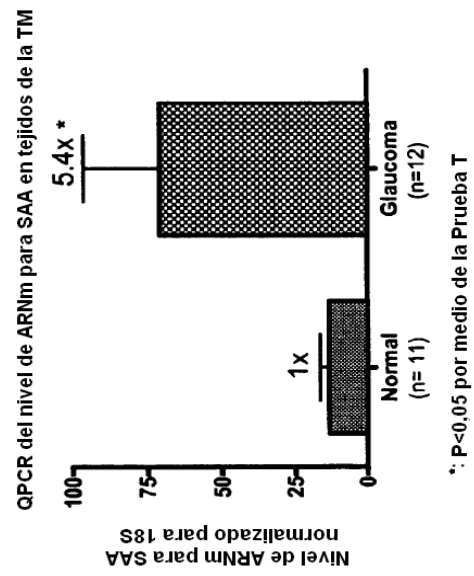


FIG. 1

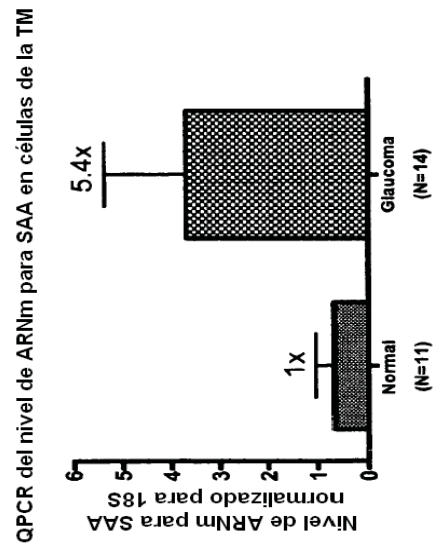


FIG. 2A

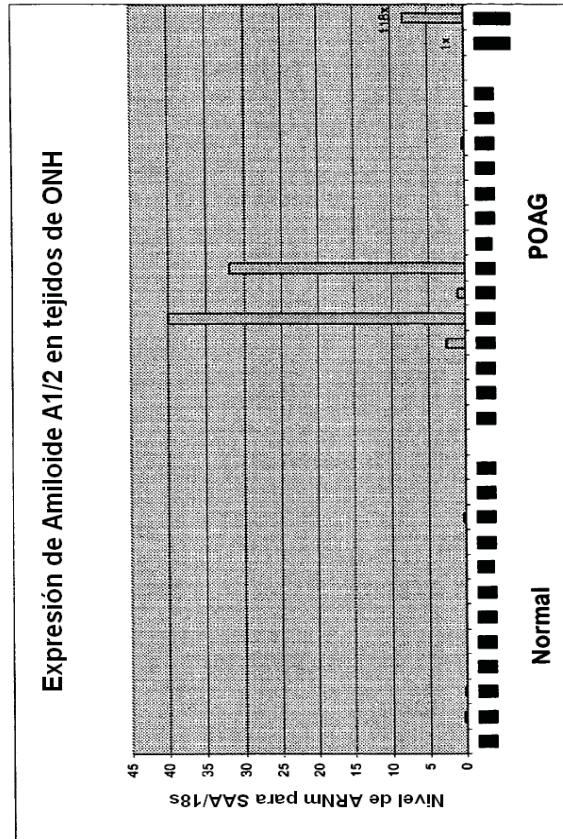


FIG. 2B

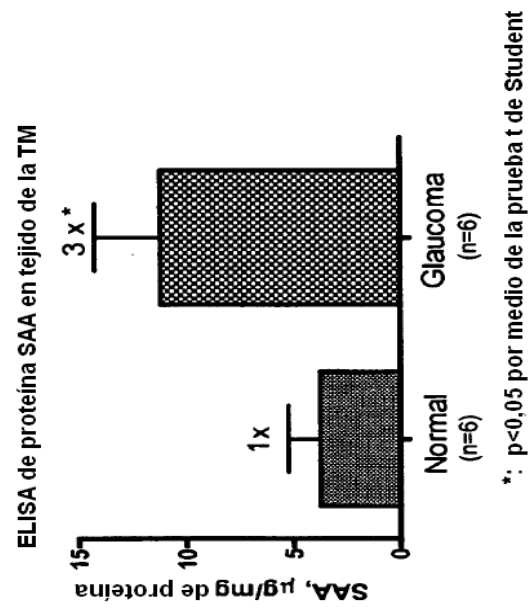


FIG. 3

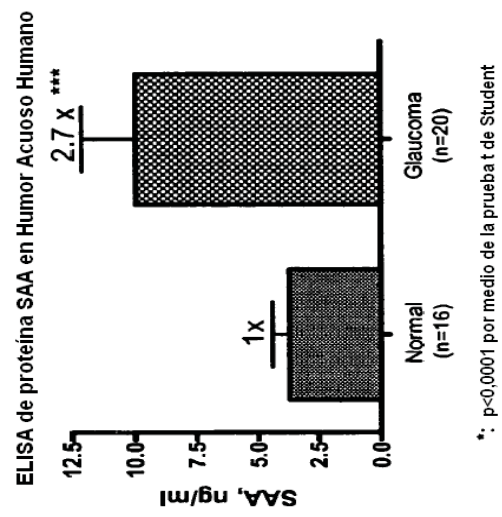


FIG. 4

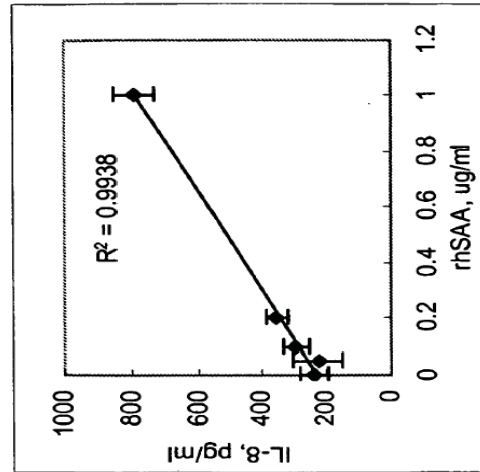
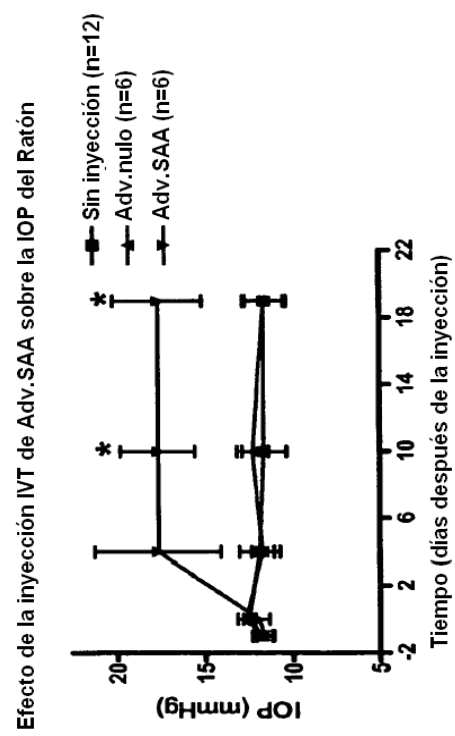
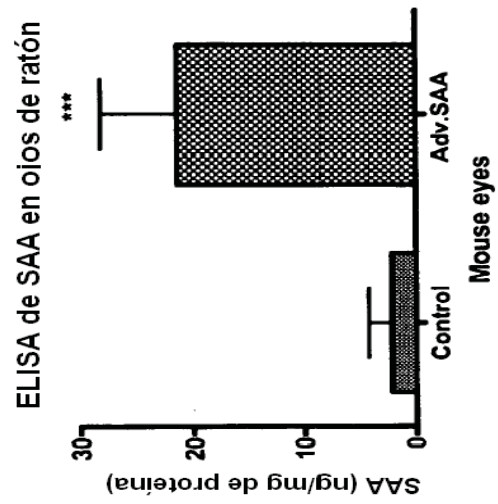


FIG. 5



*: $P < 0,05$ versus Adv.nulo o sin inyección en el mismo momento por un ANOVA de una sola vía

FIG. 6



***; $p < 0.0001$ versus control por medio de la prueba T (media con SEM; $n = 16 - 17$)

FIG. 7

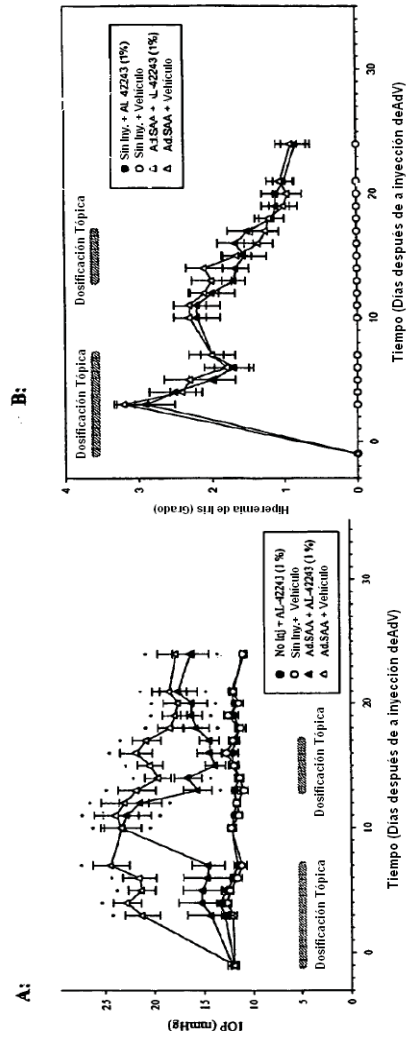


FIG. 8

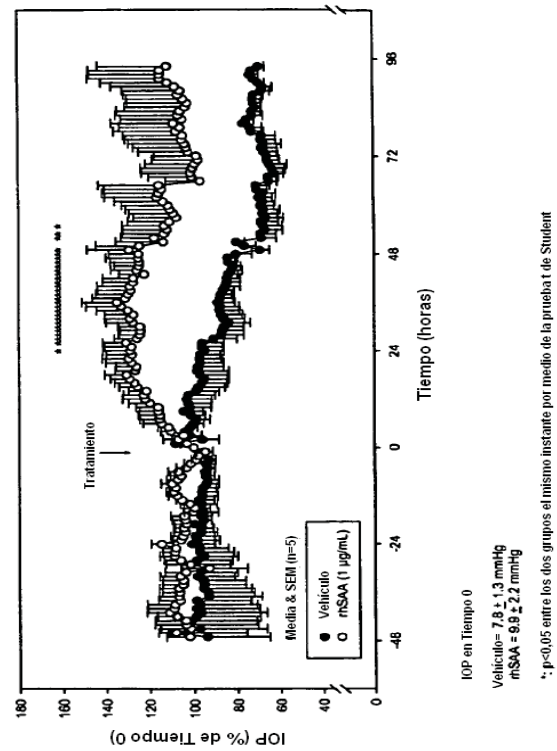
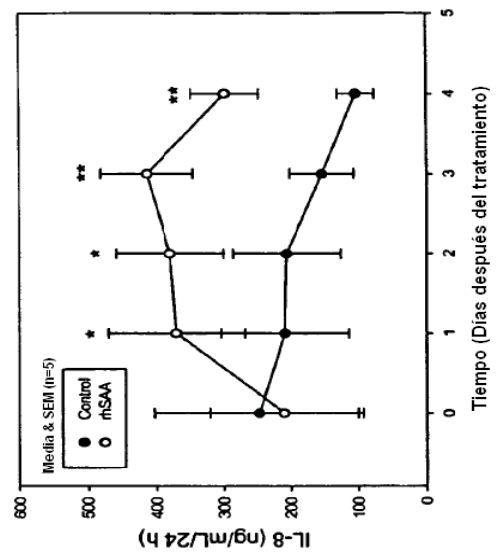
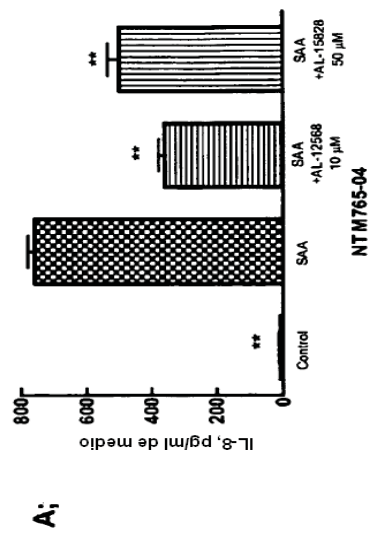


FIG. 9

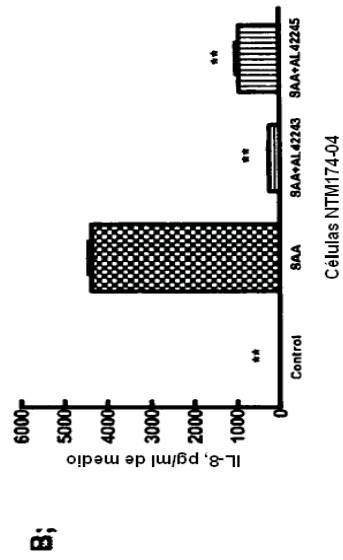


* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ entre los dos grupos del mismo momento por medio de la prueba t pareada

FIG. 10



**; $p < 0,01$ versus SAA por medio de ANOVA luego Prueba de Comparación Múltiple de Newman-Keuls



**; $p < 0,01$ versus SAA por medio de ANOVA luego Prueba de Comparación Múltiple de Newman-Keuls

FIG. 11

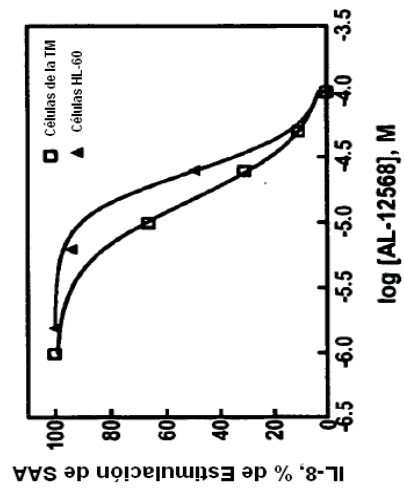


FIG. 12

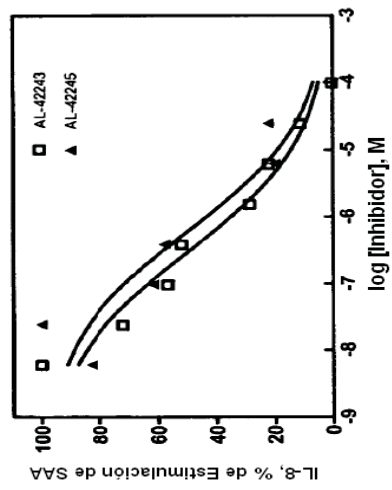


FIG. 13