

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 150**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/135** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2008 E 08830106 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2187880**

54 Título: **Compuestos y métodos para tratar la degeneración muscular**

30 Prioridad:

**12.09.2007 US 993379 P**

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

**18.03.2014**

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN  
THE CITY OF NEW YORK (100.0%)  
OFFICE OF THE GENERAL COUNSEL, 412 LOW  
LIBRARY MAIL CODE 4308 535 WEST 116TH S  
NEW YORK, NY 10027, US**

72 Inventor/es:

**WASHINGTON, ILYAS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 449 150 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Compuestos y métodos para tratar la degeneración muscular

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a compuestos, composiciones, y métodos para hacer más lenta la formación/acumulación de lipofuscina con el objetivo de tratar o aliviar un trastorno oftalmológico, tales como, por ej., degeneración macular, sin, o con efectos visuales adversos, reducidos. Más particularmente, la presente invención se refiere a compuestos y composiciones que pueden usarse para tratar o aliviar un trastorno oftalmológico, tales como, por ej., degeneración macular, al hacer más lenta o limitar la acumulación de pigmentos de la edad o lipofuscina en las células del epitelio de pigmento de la retina ("RPE") de la retina. La presente invención se refiere además a composiciones para usar en el tratamiento o alivio de un trastorno oftalmológico, tales como, por ej., degeneración macular, en un mamífero.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La mácula está ubicada en la parte posterior del ojo en el centro de la retina. Cuando los millones de células en el tejido de múltiples capas, sensible a la luz, se deterioran, se pierde la visión central junto con la capacidad de realizar tareas tales como leer, escribir, conducir o ver colores. Esta "degeneración macular" principalmente afecta a los ancianos y tiene una prevalencia de aproximadamente 3% en poblaciones entre 75-79 años de edad y aproximadamente 12% para poblaciones de más de 80 años de edad.(1) En poblaciones más jóvenes, se encuentra degeneración macular en individuos con alteraciones genéticas, tales como Stargardt, Vitelliform o Best (VMD), Distrofia del Fondo de Sorsby y Malattia Leventinese (Doyme Honeycomb o Dominant Radial Drusen). La enfermedad de Stargardt es la más forma común de degeneración macular juvenil heredada, que afecta aproximadamente 1 cada 10.000 niños.

20 No existen tratamientos actualmente disponibles para la degeneración macular relacionada con la edad genética o seca (no neo vascular). Se ha demostrado que los suplementos de vitaminas tales como antioxidantes, y cambios en la dieta, tales como dietas con bajo contenido de grasas, hacen más lenta la progresión de la enfermedad en algunos estudios clínicos. Sin embargo, para la mayoría de los pacientes, al diagnóstico le sigue la pérdida progresiva de la visión central. (2-4)

25 Las distrofias maculares enumeradas anteriormente están marcadas todas por la acumulación de lipofuscina, depósitos fluorescentes, en la capa celular del epitelio del pigmento retiniano (RPE) (5-11). Los únicos compuestos que se han caracterizado hasta la fecha a partir de RPE lipofuscina, A2E (N-retinilideno-N-retiniletanolamina) y dímero ATR (dímero all-trans-retinal), derivan de las reacciones de all-trans-retinal, un isómero de 11-cis-retineano, el cromóforo de los pigmentos visuales (12, 13). Estos dímeros retinianos tóxicos han demostrado causar muerte de las células de RPE, lo cual se piensa que conduce a la degeneración de células foto receptoras y pérdida de la visión (2, 14-22). Se ha demostrado que la reducción del ciclo visual con el uso de antagonistas de RPE 65 (23-25) o el retraso de la administración de vitamina A (retinol) al RPE al, por ej., limitar la ingesta dietaria de vitamina A (26) o bloquear las proteínas que se unen al retinol sérico (27) impiden o abolen la formación de lipofuscina del RPE en modelos animales. Por el contrario, el aumento de la cantidad de all-trans-retinal en segmentos externos, tales como ocurre con las mutaciones en *abcr*<sup>1</sup> (responsable de la enfermedad de Stargardt recesiva), conduce a la rápida acumulación de pigmentos de lipofuscina (8).

30 La evidencia citada anterior conduce a la conclusión de que la lipofuscina y/o A2E y dímero ATR en células RPE puede alcanzar niveles que contribuyen a una declinación en la función celular seguida de pérdida de la visión y que la vitamina A cumple una función importante en la formación de lipofuscina ocular. (28)

35 Se ha demostrado que varios análogos de la vitamina A limitan la formación de lipofuscina en un modelo de ratón al disminuir el ciclo visual. El modelo de ratón *ABCR*<sup>-/-</sup> se ha usado para evaluar metodologías para limitar la formación de lipofuscina de RPE. Los ratones que carecen del gen *ABCR* (también conocido como *ABCA4*) que codifica un transportador del cassette que codifica el trifosfato de adenosina específico del foto receptor (ATP), carecen de la capacidad de trasladar apropiadamente la vitamina A (en la forma de retiniana) en el ojo. Los ratones *ABCR*<sup>-/-</sup> se desarrollaron como modelo animal de la Enfermedad de Stargardt recesiva (8). Como ocurre con los humanos con enfermedad de Stargardt recesiva, los ratones *ABCR*<sup>-/-</sup> acumulan grandes depósitos de lipofuscina en células de RPE de sus ojos, como se muestra en la FIG. 1, y finalmente experimentan retraso de la adaptación a la oscuridad. La acumulación de lipofuscina y pérdida de la visión observada en este modelo de ratón también se considera relevante para la degeneración macular relacionada con el proceso de envejecimiento (AMD) y otras distrofias maculares.

40 En intentos por disminuir el ciclo visual, se han buscado enzimas del ciclo visual. En dichos métodos, se han propuesto pequeñas moléculas como antagonistas para las enzimas del ciclo visual. En esta metodología, la droga (con frecuencia un derivado de la vitamina A) se une a las proteínas del ciclo visual, que bloquea la participación de las proteínas en el ciclo visual, y hace más lento el ciclo visual. Otra metodología para disminuir el ciclo visual incluye impedir la administración de vitamina A de la sangre al ojo.

- Los candidatos farmacológicos para la inhibición de la formación de lipofuscina al disminuir el ciclo visual se han evaluado por su capacidad de causar adaptación tardía a la oscuridad (un efecto colateral de un ciclo visual perjudicado) y su capacidad de impedir la acumulación de lipofuscina en el ojo relacionada con el proceso de envejecimiento según se mide por la concentración de A2E y otros sub-productos del ciclo visual, por ej., dímero ATR.
- 5 Algunos ejemplos de dichos candidatos farmacológicos y sus correspondientes mecanismos de acción para disminuir el ciclo visual se resumen a continuación:
- Se cree que el ácido 13 *cis*-retinoico (Acutano o isotretinoína) inhibe las enzimas deshidrogenasa de 11-*cis*-retinol y RPE65 involucradas en el ciclo visual. (19, 24) Cuando se administra, se ha demostrado que el ácido 13 *cis*-retinoico causa retraso en la adaptación a la oscuridad. Cuando se administró a ratones knock-out ABCR de 3 meses de vida (n=3) ácido 13 *cis*-retinoico a 40 mg/kg/día durante un mes, los ratones mostraron una reducción en la formación de A2E a razón de aproximadamente 40-50% cuando se compara con ratones knock-out ABCR de control (n=3).(24) En forma adicional, cuando se administró a ratones knock-out ABCR de 2 meses de vida ácido 13 *cis*-retinoico a 20 mg/kg/día durante dos meses, los ratones también mostraron una reducción en la formación de lipofuscina en la capa de células de RPE según lo determinado por microscopio electrónico.
- 10 Se cree que la (12E,16E)-13,17,21-trimetildocosa-12,16,20-trien-11-ona (TDT) inhibe RPE65.(23) Cuando se administra TDT a ratones, se observa retraso en la adaptación a la oscuridad. Cuando los ratones knock-out ABCR de 2 meses de vida (n=2) recibieron TDT a 50 mg/kg dos veces por semana durante dos meses, mostraron una reducción en la formación de A2E a razón de aproximadamente 50-85% cuando se compara con ratones knock-out ABCR de control (n=2).(23)
- 15 También se piensa que la (2E,6E)-N-hexadecil-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienamina (TDH) inhibe RPE65 y cuando se administra a ratones, produce retraso en la adaptación a la oscuridad.(23) Cuando ratones knock-out ABCR de 2 meses de vida (n=2) recibieron TDH a 50 mg/kg dos veces por semana durante dos meses, mostraron una reducción en la formación de A2E a razón de aproximadamente 50% cuando se compara con ratones knock-out ABCR de control (n=2).(23)
- 20 Se cree que la all-*trans*-retinilamina (Ret-NH<sub>2</sub>) inhibe RPE65 y cuando se administra a ratones produce retraso severo en la adaptación a la oscuridad. Cuando se administra a ratones knock-out ABCA4 de 1 mes de vida Ret-NH<sub>2</sub> a 40 mg/kg dos veces por semana durante dos meses, mostraron una reducción en la formación de A2E a razón de aproximadamente 50% cuando se compara con ratones knock-out ABCA4 de control. (25)
- 25 La N-(4-hidroxifenil) retinamida (Fenretinida) hace más lento el flujo de retinol en los ojos al reducir los niveles de vitamina A unida a la proteína que se une al retinol sérico. De este modo, el tratamiento con Fenretinida disminuye los niveles de vitamina A en el ojo lo cual conduce a retraso en la adaptación a la oscuridad. Cuando ratones knock-out ABCA4 de 2 meses de vida (n=3) recibieron una dosis de Fenretinida a 20 mg/kg/día durante un mes, mostraron una reducción en la formación de A2E a razón de aproximadamente 40-50% cuando se compara con ratones knock-out ABCA4 de control (n=3).(27)
- 30 De este modo, los métodos terapéuticos recientemente propuestos para limitar la formación de lipofuscina se basan en la disminución del ciclo visual (1, 10, 11, 12). Existen, sin embargo, desventajas para disminuir el ciclo visual como medio para impedir la formación de lipofuscina con el fin de prevenir, por ej., la degeneración macular. Cuatro de estas desventajas se detallan a continuación.
- 35 Una desventaja inmediata de disminuir el ciclo visual es que conduce al retraso en la adaptación a la oscuridad y visión deficiente en la luz tenue o a la noche. La visión nocturna deficiente (Disfunción escotópica) ya es un marcador funcional en la maculopatía precoz relacionada con el proceso de envejecimiento (ARM), y se ha relacionado con la ocurrencia de caídas y choques de vehículos. (29, 30) Se espera que una disminución adicional del ciclo visual empeore la visión nocturna en pacientes que ya sufren de visión nocturna deficiente.
- 40 Segundo, con el fin de impedir en forma suficiente la formación de lipofuscina, se tendría que disminuir el ciclo visual durante un período de tiempo prolongado. Pero, la disminución a largo plazo del ciclo visual conduce a muerte de las células foto receptoras y pérdida de la visión. (31, 32) De hecho, la deficiencia del ciclo visual es la causa de varias enfermedades de la retina tales como enfermedad de Stargardt, retinitis pigmentosa, Amaurosis Congénita de Lebers, Fundus Albipunctatus, degeneración macular relacionada con el proceso de envejecimiento y Ceguera Nocturna Fija Congénita.
- 45 Tercero, la metodología anterior con frecuencia usa análogos de la Vitamina A para impedir el procesamiento de proteínas involucradas en la vitamina A en el ojo. Sin embargo, los análogos de la Vitamina A de diversas estructuras, perfiles farmacológicos, afinidades del receptor, y actividades biológicas han demostrado ser tóxicos. Así, se ha demostrado que numerosos análogos de la Vitamina A en modelos en animales experimentales, modelos celulares, datos epidemiológicos y ensayos clínicos inhiben o retrasan varias funciones biológicas tales como, por ejemplo, crecimiento óseo, reproducción, división celular, diferenciación celular y regulación del sistema inmunológico. (33-37). De este modo, también se espera que la inhibición del procesamiento de la vitamina A en el ojo retrase algunas de estas funciones corporales básicas, lo cual puede conducir a efectos colaterales adversos significativos.
- 50
- 55

5 Por ejemplo, los análogos de la Vitamina A que se usan actualmente para tratar ciertos cánceres y/o psoriasis tales como, por ej., Bexaroteno (Targretin), Etretinato (Tegison) Acitretina (Soriatano), Fenretinida (*N*-(4-hidroxifenil) retinamida o 4-HPR) y ácido 13 *cis*-retinoico (Accutane o isotretinoína) tienen efectos colaterales, que incluyen, por ej.,

10 nariz seca, sangrados de la nariz, labios partidos, llagas bucales, aumento de la sed, lengua con ampollas, encías sangrantes, boca seca, úlceras frías, ojos secos o irritados, piel seca, piel con descamación o escamosa, pérdida de cabello, facilidad de sufrir moretones, dolores musculares, náusea, malestar estomacal, resfrío o hinchazón de las manos o pies, problemas de visión, dolor de pecho, rigidez del pecho, pulso anormal, mareos, vómitos, cefalea severa y ojos/piel amarillentos (ictericia). (38-40)

15 Cuarto, en modelos animales, los medicamentos candidatos para limitar la formación de lipofuscina han demostrado ser efectivos solamente en dosis relativamente altas. Por ejemplo, los estudios realizados en modelos de ratón normalmente usan dosis de aproximadamente 11-40 mg/kg/día. Pero, los análogos actuales de la Vitamina A se usan normalmente en la clínica en dosis de 1-3 mg/kg/día para minimizar los efectos colaterales. Los regímenes de dosificación más grandes conducirán a aumento de los efectos colaterales.

20 Por ejemplo, Fenretinida (*N*-(4-hidroxifenil) retinamida o 4-HPR) se usa actualmente para tratar el cáncer y se encuentran en progreso ensayos clínicos para AMD. Los efectos adversos más comunes informados entre 1.432 pacientes que se sometieron al tratamiento con esta droga a una dosis de 200 mg/día durante un período de cinco años fueron: adaptación de la reducción a la oscuridad, incidencia acumulativa (16%) y trastornos dermatológicos (16%). Los efectos más comunes fueron síntomas gastrointestinales (8%) y trastornos de la superficie ocular (8%). (41) Con esta dosis relativamente baja en la demora en la adaptación a la oscuridad, una evaluación de la efectividad de una droga para impedir la formación de lipofuscina, sólo se observó en el 16% de los pacientes. En otro estudio cuando los

25 pacientes recibieron una dosis de dosis orales más elevadas de 600 o 900 mg/m<sup>2</sup> bid en ciclos de 6 semanas, se informaron efectos adversos leves a moderados en 43 (95%) de los 45 pacientes que posiblemente se relaciona con Fenretinida. Estos efectos colaterales incluyeron: fatiga, cefalea, cambios en la piel (piel seca, prurito, erupción) y síntomas del tracto digestivo (dolor abdominal, calambres, diarrea, estomatitis, y xerostomía). Las toxicidades de grado 2 informadas como posiblemente relacionadas con el tratamiento con Fenretinida incluyeron convulsiones y confusión. (42)

30 Un paciente con un astrocitoma anaplásico que había recibido tratamiento con Fenretinida a la dosis de 600 mg/m<sup>2</sup> bid por un ciclo se presentó con cefaleas, náusea, y vómitos, y se encontró que tenía una pequeña hemorragia intra-craneal en la región de los ganglios basales. Se recuperó sin deficiencias y continuó el tratamiento sin otros eventos. Otro paciente, que también se sometió a tratamiento con la posología de 600 mg/m<sup>2</sup> bid y recibía anticoagulantes orales con warfarina para trombosis venosa profunda, murió después de desarrollar un sangrado nasal incontrolable (proporción normalizada internacional > 6,0). De los cuatro pacientes tratados con la dosis de 900 mg/m<sup>2</sup> bid, uno tuvo vómitos 3, impedimento del habla grado 2, e impedimentos de la memoria grado 1, los cuales mejoraron sin síntomas residuales.(42)

35 Una dosis típica de ácido 13 *cis*-retinoico (Accutane o isotretinoína) para el tratamiento del acné es 0,5 a 1 mg/kg/día para niños y 2,0 mg/kg/día para adultos durante catorce días seguidos, seguido de un descanso de 14 días. Este período de veintiocho días usualmente se repite cinco veces más. (40) Estas dosis son aproximadamente 10 a 80 veces menos que se usó en ratones para impedir la formación de A2E. (24) Para dosis más grandes de ácido 13 *cis*-retinoico usado para tratar el cáncer, los efectos colaterales que ocurren en más del 30% de los usuarios incluyen cefalea, fiebre, piel seca, membranas mucosas secas (boca, nariz), dolor de huesos, náusea y vómitos, erupción, llagas bucales, comezón, sudoración y cambios en la vista. (43, 44)

40 Los efectos colaterales que ocurren en 10-29% de los usuarios de ácido 13 *cis*-retinoico incluyen dolor de espalda, dolor de músculos y articulaciones, reacción alérgica, dolor abdominal, poco apetito, mareos, somnolencia, insomnio, ansiedad, adormecimiento, hormigueo de manos y pies, debilidad, depresión, pérdida de cabello (afinamiento), ojos secos, sensibilidad a la luz (ver problemas oculares), reducción de la visión nocturna, la cual puede persistir luego de interrumpir el tratamiento, hinchazón de pies o tobillos, y recuentos bajos en sangre. (44) Además, se ha observado que los glóbulos blancos y rojos y plaquetas pueden reducirse temporariamente, lo cual puede poner al paciente ante un mayor riesgo de sufrir infección, anemia y/o hemorragia. Los efectos colaterales también incluyen análisis anormales de sangre: aumento de triglicéridos, colesterol y/o niveles de azúcar en sangre.

45 Las desventajas anteriores hacen de la disminución del ciclo visual una metodología difícil para adaptar sola para el tratamiento clínico de trastornos oftalmológicos, por ej., degeneración macular.

La WO 2007/019503 divulga que una droga puede usarse en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno oftalmológico, en donde la droga inhibe, antagoniza, o produce un cortocircuito del ciclo visual en una etapa del ciclo visual que ocurre fuera del disco de una célula foto receptora de varilla.

50 La WO 2005/087210 divulga compuestos capaces de inhibir el ciclo visual y/o la adaptación a la oscuridad y su uso para el tratamiento y la prevención de enfermedades no degenerativas de la retina, con énfasis específico en la prevención y el tratamiento de la retinopatía diabética, retinopatía de la pre madurez, oclusión de la vena ramificada de la retina, oclusión de la vena central de la retina, glaucoma de ángulo abierto, glaucoma veovascular, y otras enfermedades del

nervio óptico y/o de la retina donde un desequilibrio entre la demanda metabólica y el suministro de sangre contribuyen al desarrollo de este daño tisular.

**COMPENDIO DE LA INVENCION**

5 Como consecuencia, sería ventajoso proporcionar tratamientos para trastornos oftalmológicos, por ej., degeneración macular, que no tienen, o limitan uno o más de, los efectos colaterales resumidos anteriormente. En particular, sería ventajoso proporcionar compuestos, composiciones, y métodos para impedir o detener la acumulación de lipofuscina o pigmentos de la edad en las células del RPE de la retina sin disminuir, o disminuir en forma mínima, el ciclo visual.

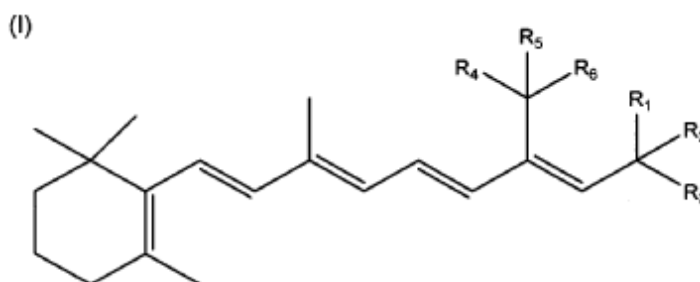
10 En este aspecto, una realización de la presente invención es una composición de fórmula I para usar en el retraso de la formación de un pigmento de lipofuscina en la retina. Puede usarse un retinoide C<sub>20</sub> en una cantidad suficiente para reducir la acumulación de un pigmento de lipofuscina en la retina.

Otra realización de la presente invención es una composición de fórmula I para usar en el tratamiento o el alivio de los efectos de una enfermedad caracterizada por una acumulación de un pigmento de lipofuscina in a retina.

15 Una realización adicional de la presente invención es una composición de fórmula I para usar en el retraso o la prevención de la formación de A2E. Este uso preferiblemente incluye la etapa de reemplazar un sustrato all-*trans*-retinal (ATR) con un sustrato C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-retinoide en condiciones suficientes para impedir la formación de A2E.

Una realización adicional de la presente invención es una composición para el retraso de la formación de un pigmento de lipofuscina en la retina que contiene un Retinoide C<sub>20</sub> sustituido de la fórmula I y vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

20 Una realización adicional de la invención es una composición que comprende un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico y un compuesto de acuerdo con la fórmula I:



en donde:

R<sub>1</sub> es oxo o H;

R<sub>2</sub> es H o nada;

25 R<sub>3</sub> es hidroxí u oxo o CHR<sub>7</sub> donde R<sub>7</sub> forma un carotenoide y

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, y R<sub>6</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en <sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H, <sup>3</sup>H, halógeno, y alquilo C<sub>1-8</sub>, en donde R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> no son cada uno <sup>1</sup>H.

**BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS**

30 La FIG. 1 muestra perfiles de HPLC y UV-vis de pigmentos de lipofuscina extraídos de los cuencos de los ojos (seis de ellos menos la retina) de ratones ABCR<sup>-/-</sup> de 5,5-6 meses de vida. Los pigmentos de lipofuscina tales como dímero A2E y ATR, representados por los picos 2, 3 y 4 se han caracterizado y derivan del all-*trans*-retinal. Otros pigmentos de lipofuscina tales como picos 1 y 5 también derivan de all-*trans*-retinal, sin embargo, no se han caracterizado completamente. Los pigmentos anteriores también se encuentran en humanos y se considera que contribuyen a la degeneración macular.

35 La FIG. 2 es un esquema de reacción que muestra la biosíntesis de A2E y dímero ATR de all-*trans*-retinal y una amina biológica.

40 La FIG. 3A muestra los perfiles de HPLC de mezclas de reacción de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal y all-*trans*-retinal con etanolamina para la formación de A2E. La FIG. 3B es una vista expandida de FIG. 3A. La formación de A2E se monitoreó con el paso del tiempo mediante la medición del aspecto de los picos que comienzan a aproximadamente 15 min. Ambas trazas de HPLC se midieron aproximadamente 30 horas en las reacciones. Para all-*trans*-retinal, una cantidad considerable de A2E se ha formado, como también, un compuesto no identificado con un tiempo de retención a aproximadamente 14,5 min como se observa en la vista expandida. Por otro lado, para C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal la

formación de A2E es mucho más lenta y el pico a 14,5 min está casi ausente. La FIG. 3C es un gráfico de la formación de A2E con el paso del tiempo para las reacciones anteriores. C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal forma A2E alrededor de 7 veces más lento que all-*trans*-retinal.

5 La FIG. 4 muestra los perfiles de HPLC de mezclas de reacción de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal (A) y all-*trans*-retinal (B) con prolina para la formación de dímero ATR. La formación del dímero ATR se monitoreó con el paso del tiempo mediante la medición del aspecto de los picos que comienzan a aproximadamente 8 min. Ambas trazas de HPLC se midieron aproximadamente 1 hora en las reacciones. Para all-*trans*-retinal, se ha formado una cantidad considerable de dímero ATR. Por otro lado, para C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal la formación del dímero ATR es mucho más lenta. La FIG. 4C es un gráfico de la formación del dímero ATR con el paso del tiempo para las reacciones anteriores. C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal forma A2E aproximadamente 14 veces más lento que all-*trans*-retinal.

10 La FIG. 5 muestra los perfiles de HPLC de pigmentos de lipofuscina extraídos de los cuencos de los ojos (seis de ellos menos la retina) de ratones ABCR<sup>-/-</sup> de 5,5-6 meses de vida mantenidos en una dieta de cualquiera de acetato de retinol (traza A (FIG. 5A)) o acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol (traza B (FIG. 5B)). Los ratones mantenidos con acetato de retinol muestran acumulación considerable de pigmentos de lipofuscina como se muestra por los picos de HPLC. Por otro lado, los pigmentos de lipofuscina fueron indetectables en los ratones mantenidos con la dieta de acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol. La FIG. 5C muestra gráfico de las concentraciones de retinol total y éster de retinol o D<sub>3</sub>-retinol y éster de retinol D<sub>3</sub> en los ratones anteriores mantenidos con dietas de acetato de retinol o acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol, respectivamente. Ambos grupos tenían apenas la misma cantidad de retinol en el ojo, a pesar de tener diferentes concentraciones de pigmentos de lipofuscina.

15 La FIG. 6 muestra micrográficos electrónicos de capas de RPE de ratones ABCR<sup>-/-</sup> de 5,5-6 meses de vida mantenidos con una dieta de cualquiera de acetato de retinol (FIGs. 6A y 6B) o acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol (FIGs. 6C y 6D). Debido a la incertidumbre en la distinción de lipofuscina de los cuerpos de melanina. Se realizaron comparaciones entre los números de todos los cuerpos densos electrónicos, oscuros encontrados en el RPE entre ratones a dieta con acetato de retinol versus aquellos a dieta con acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol. Además de los cuerpos de melanina y lipofuscina densos electrónicos, también se encuentran presentes fagosomas de RPE, mitocondria, y gotitas de lípidos pero aunque fueron ultra-estructuralmente distintos. Los ratones mantenidos con la dieta el acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol tienen considerablemente menos cuerpos electrónicos densos (es decir, cuerpos de lipofuscina) cuando se compara con los ratones mantenidos con la dieta de acetato de retinol.

20 La FIG. 7A muestra A2E total, según se mide por medio del área pico de HPLC a 445 nm, para ratas (tres hembras por grupo) tratadas/ mantenidas con cualquiera de retinal, C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-retinal, retinal más Fenretinida (FEN) o retinal más TDH. Los animales tratados con retinal tenían la cantidad más grande de A2E-lipofuscina (normalizada al 100%). Mientras tanto, los animales tratados con C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-retinal o retinal más Fenretinida o el antagonista de RPE65, TDH, mostraron menos lipofuscina A2E. La FIG. 7B muestra la totalidad de los cuatro grupos de animales tenían apenas la misma cantidad de retinol ocular. La FIG. 7C muestra que los niveles de all-*trans*-retinal ocular aumentaron en el grupo tratado con C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-retinal.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente invención, se presenta una discusión de los métodos para disminuir la formación de lipofuscina que no se basan en disminuir el ciclo visual o pequeñas moléculas que inhiben el ciclo visual (es decir, antagonistas del ciclo visual). De este modo, muchas de las desventajas, tales como, retraso en la adaptación a la oscuridad, pigmento visual sin forma, que pueden conducir a deterioro y pérdida de la visión, dosis altas de droga, y los efectos colaterales potencialmente adversos de métodos anteriores se evitan.

40 Más particularmente, se discuten métodos para reemplazar selectivamente átomos sobre la vitamina A con el fin de obstaculizar su reactividad intrínseca para formar pigmentos de lipofuscina derivados de la vitamina A, tales como, A2E y dímero ATR, mientras que al mismo tiempo se preserva la estructura química de la vitamina A de manera que la participación en el ciclo visual (unión a las proteínas del ciclo visual) se modifica mínimamente. Debido a que dichos cambios a la estructura de la vitamina A de no interferir con el metabolismo o función normal de la vitamina A, una de las utilidades de la presente invención es que se evitan muchos efectos colaterales potenciales. En forma adicional, debido a que los compuestos de la presente invención (divulgados a continuación en mayor detalle) no compiten con los retinoides naturales para la unión a la proteína (porque, por ej., pueden realizar el trabajo de los retinoides naturales), se necesitan dosis más pequeñas para el tratamiento de por ej., degeneración macular, cuando se compara con tratamientos anteriores que utilizan, por ej., antagonistas del ciclo visual.

45 En la presente invención, cuando los hidrógenos C<sub>20</sub> de all-*trans*-retinoides se reemplazan por átomos de flúor (F<sub>3</sub>), la formación de A2E se elimina, según se mide por medio de monitoreo de la desaparición de C<sub>20</sub>-F<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal y la ausencia de del correspondiente A2E fluorado por HPLC. Se cree que A2E y el dímero ATR se forman in vivo en una secuencia de reacción de múltiples etapas que involucran dos moléculas de all-*trans*-retinal, como se muestra en la FIG. 2. En la primera etapa, all-*trans*-retinal se condensa con una amina biológica para formar la imina. Se considera que esta imina luego sufre una derivación de hidrógeno [1,5] que involucra un átomo de hidrógeno en el carbono C<sub>20</sub> (etapa 2). La reacción posterior (etapa 3) con otra molécula de retinal ya sea por adición 1,2- o 1,4 seguido de ciclaciones

(etapa 4) produce precursores de A2E o dímero ATR, respectivamente. A2E se forma posteriormente después de la oxidación espontánea en el aire, y dímero ATR, después de la eliminación (etapa 4).

Se ha encontrado que reemplazar ciertas uniones de C-H con uniones de C-F en el retinal (es decir, C<sub>20</sub>-F<sub>1-3</sub>-retinal) obstaculiza la reactividad de *all-trans*-retinal, y, de este modo hace más lenta o elimina la formación de A2E in vitro. Mediante el reemplazo de los átomos de hidrógeno en C<sub>20</sub> con flúor, la etapa de derivación de hidrógeno [1,5] se bloquea. Como consecuencia, se espera que C<sub>20</sub>-F<sub>1-3</sub>-retinal disminuya apreciablemente la biosíntesis de A2E y dímero ATR.

Se espera que un pequeño cambio en la velocidad de reacción de *all-trans*-retinal para formar sus dímeros tóxicos se traduzca en una gran reducción en la formación de lipofuscina de RPE de por vida. Los métodos discutidos en la presente memoria disminuirán la formación de los pigmentos tóxicos y no disminuirán (o no disminuirán significativamente) la cinética del ciclo visual, porque la regeneración de 11-*cis*-retinal no involucra la ruptura de la unión de hidrógeno C<sub>20</sub>. Por lo tanto, el tratamiento con un C<sub>20</sub>-F<sub>1-3</sub>-retinoide (que puede transformarse en C<sub>20</sub>-F<sub>1-3</sub>-retinal en el cuerpo) será de particular utilidad al impedir la formación de lipofuscina en humanos que sufren de Enfermedad de Stargardt u otras enfermedades o afecciones asociadas con la formación de lipofuscina y/o degeneraciones maculares.

El C<sub>20</sub>-D<sub>1-3</sub>-retinoide de acuerdo con la presente invención también será útil como terapia para tratar o aliviar la degeneración macular sin efectos visuales adversos (o significativamente adversos). Cuando los hidrógenos C<sub>20</sub> se reemplazan por deuterios, la formación de A2E es aproximadamente siete veces más lenta (FIG. 3) y la formación del dímero ATR es aproximadamente 15 veces más lenta (FIG. 4). Este efecto de isótopo cinético disminuirá la formación del A2E y dímero ATR in vivo. La vitamina A deuterada se usa ampliamente en humanos y no muestra toxicidad (45, 46). De este modo, un tratamiento con el uso de C<sub>20</sub>-D<sub>1-3</sub>-retinoide debe ser una terapia efectiva y no tóxica para tratar o aliviar la degeneración macular sin efectos visuales adversos.

En vista de lo que antecede, una realización de la presente invención es una composición como se reivindica en las reivindicaciones 1-8 para usar en el retraso de la formación de un pigmento de lipofuscina en la retina. Este uso puede incluir administrar a un paciente que lo necesita un Retinoide C<sub>20</sub> sustituido en una cantidad suficiente para reducir la acumulación de un pigmento de lipofuscina en la retina. Preferiblemente, el Retinoide C<sub>20</sub> sustituido se selecciona del grupo que consiste en a C<sub>20</sub>-D<sub>1-3</sub>-retinoide y un C<sub>20</sub>-F<sub>1-3</sub>-retinoide. Preferiblemente, el pigmento de lipofuscina se selecciona del grupo que consiste en A2E, dímero *all-trans*-retinoide (ATR), y combinaciones de los anteriores.

Preferiblemente, el retinoide C<sub>20</sub> sustituido es parte de una composición farmacéutica o nutracéutica. Preferiblemente, el retinoide sustituido C<sub>20</sub> es una forma de dosificación unitaria.

En la presente invención, el paciente puede ser un mamífero, preferiblemente un humano. En esta realización, el retinoide sustituido C<sub>20</sub> es un compuesto o combinación de compuestos divulgados en la presente memoria, preferiblemente compuestos de Formula I, que incluyen las Fórmulas Ic-le y Formula II, las cuales se definen a continuación.

En esta realización, una cantidad suficiente para reducir la acumulación de un pigmento de lipofuscina en la retina variará por paciente y el retinoide C<sub>20</sub> sustituido particular que se utilice. Típicamente, dicha cantidad será de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 300 mg/día, que incluye, por ej., 0,5-50, 1-25, y 3-10 mg/día.

Otra realización de la presente invención una composición como se reivindica en las reivindicaciones 1-6 para usar en el tratamiento o el alivio de los efectos de un trastorno oftalmológico, tales como, por ej. una enfermedad caracterizada por una acumulación de un pigmento de lipofuscina in a retina. Este uso puede incluir administrar a un paciente que lo necesita un retinoide C<sub>20</sub> sustituido en una cantidad suficiente para reducir la acumulación de un pigmento de lipofuscina en la retina. Preferiblemente, el retinoide sustituido C<sub>20</sub> se selecciona del grupo que consiste en C<sub>20</sub>-D<sub>1-3</sub>-retinoides y C<sub>20</sub>-F<sub>1-3</sub>-retinoides. Preferiblemente, el pigmento de lipofuscina se selecciona del grupo que consiste en A2E, dímero ATR, y combinaciones de los anteriores.

Preferiblemente, el retinoide C<sub>20</sub> sustituido es parte de una composición farmacéutica o nutracéutica. Preferiblemente, el retinoide C<sub>20</sub> sustituido es una forma de dosificación unitaria.

En esta realización, la enfermedad puede seleccionarse del grupo que consiste en Stargardt, Vitelliform o Best (VMD), Distrofia del Fondo de Sorsby, degeneración macular relacionada con el proceso de envejecimiento, y Malattia Leventinese. Preferiblemente, la enfermedad es degeneración macular.

Una etapa de administración puede incluir reemplazar un componente de la dieta del paciente que contiene retinoide(s) o Vitamina A con un componente que contiene un retinoide C<sub>20</sub> sustituido. Por "reemplazar un componente de la dieta de un paciente" se entiende que una parte de la dieta que contiene vitamina A o sus precursores (que incluyen, aunque no se limitan a carotenoides) se reemplaza con un componente que contiene un retinoide C<sub>20</sub> sustituido. Preferiblemente, de aproximadamente 1% a aproximadamente 95%, que incluye, por ej., de aproximadamente 5-75%, 10-50%, o 20-30%, del retinoide(s) en la dieta del paciente se reemplaza con un retinoide C<sub>20</sub> sustituido. El reemplazo puede ser a través de, por ej., administrar alimentos que contienen retinoide C<sub>20</sub> sustituido o a través del tratamiento con

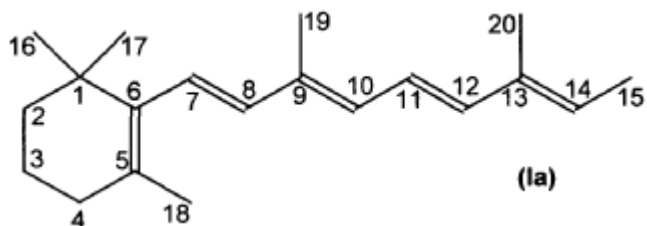
composiciones de la presente invención, que incluyen productos farmacéuticos o nutracéuticos, en lugar de consumir alimentos que contienen retinoide o Vitamina A que se consumirían de otro modo.

5 Una realización adicional de la presente invención es una composición para el retraso de la formación de un pigmento de lipofuscina en la retina, cuya composición contiene un retinoide C<sub>20</sub> sustituido y un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Preferiblemente, el retinoide C<sub>20</sub> sustituido se selecciona del grupo que consiste en C<sub>20</sub>-D<sub>1-3</sub>-retinoide y C<sub>20</sub>-F<sub>1-3</sub>-retinoide. Preferiblemente, la composición está en una forma de dosificación unitaria. Preferiblemente, la composición es un suplemento de vitamina o una formulación farmacéutica.

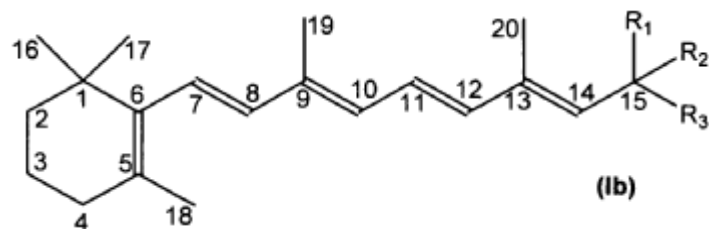
10 Una realización adicional de la presente invención una composición de las reivindicaciones 1-6 para usar en el retraso de la formación de un pigmento de lipofuscina seleccionado del grupo que consiste en un A2E, un dímero ATR, y combinaciones de los anteriores. Este método comprende reemplazar un sustrato all-*trans*-retinal (ATR) con un sustrato C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-retinoide condiciones suficientes para impedir la formación de A2E, dímero ATR, o ambos, o un A2E y/o un derivado del dímero ATR. Como se usa en la presente invención, "condiciones suficientes para impedir la formación de A2E, dímero ATR, o ambos se conocen bien en la técnica o pueden determinarse empíricamente, si se desea. La etapa de reemplazar en esta realización se describe a continuación en mayor detalle.

15 Una realización adicional de la presente invención es una composición de las reivindicaciones 1-6 para usar en el retraso de la formación de A2E. Este método incluye la etapa de reemplazar un sustrato all-*trans*-retinal (ATR) con un sustrato C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-retinoide en condiciones suficientes para impedir la formación de A2E. La etapa de reemplazar en las dos últimas realizaciones puede lograrse con el uso de un método conocido, que incluye los métodos divulgados con anterioridad. Por ejemplo, el reemplazo del sustrato puede tener lugar en el ojo del paciente, por ej., el sustrato puede administrarse directamente al ojo por medio de gotas oftálmicas, ungüento o inyección. Alternativamente, el sustrato puede administrarse sistémicamente por medio de, por ej., ingestión de una píldora o una cápsula o absorción a través de un parche o por inyección.

25 En la presente invención, el "retinoide C<sub>20</sub> sustituido" incluye todos los retinoles, acetatos de retinol, ésteres de retino, ácidos retinoicos como se define a continuación así como sus sales farmacéuticas y sus metabolitos. Para los fines de la presente invención, el esquema numérico indicado en la fórmula la para los retinoides será el que se usará:



De este modo, retinol, acetato de retinol, palmitato de retinol, ácido retinoico, y beta-caroteno tienen las siguientes estructuras:



30 en donde

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, y R<sub>6</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en <sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H, <sup>3</sup>H, halógeno, y alquilo C<sub>1-8</sub>, en donde R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> no son cada uno <sup>1</sup>H;

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son ambos H y R<sub>3</sub> es OH (retinol); o

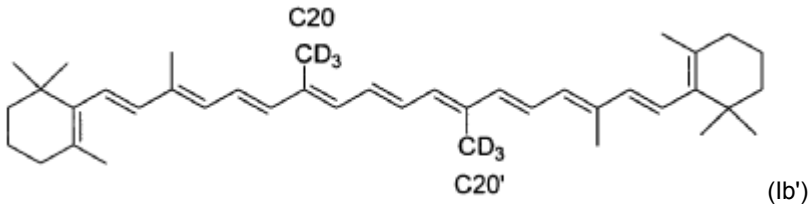
35 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son ambos H y R<sub>3</sub> es OCOCH<sub>3</sub> (acetato de retinol); o

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son ambos H y R<sub>3</sub> es OCOR (éster de retinol tales como, por ej., palmitato de retinol) o

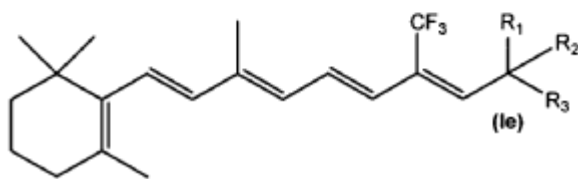
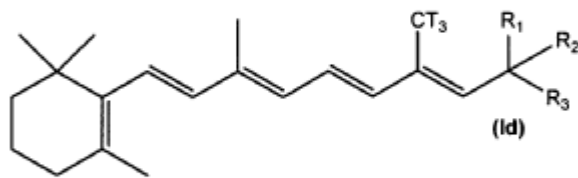
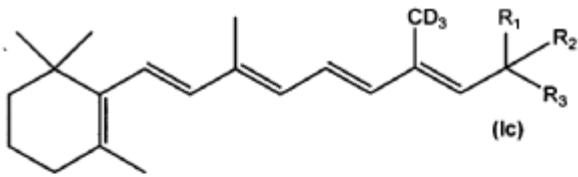
R<sub>1</sub> es = 0, R<sub>2</sub> es nada y R<sub>3</sub> es OH (ácido retinoico) o



R<sub>1</sub> es H, R<sub>3</sub> es nada, y R<sub>2</sub> es = CH-R<sub>7</sub>, donde R<sub>7</sub> forma un carotenoide. En esta realización, R<sub>7</sub> junto con el resto del compuesto forma, por ej., un beta-caroteno u otro carotenoide pro-vitamina A tales como el beta-caroteno deuterado que se muestra en las fórmulas Ib' a continuación:

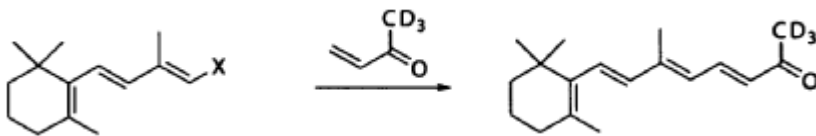


5 Los compuestos ejemplificativos de retinoide C<sub>20</sub> sustituido que pueden usarse en las composiciones de la presente invención incluyen los siguientes (compuestos Ic-le):

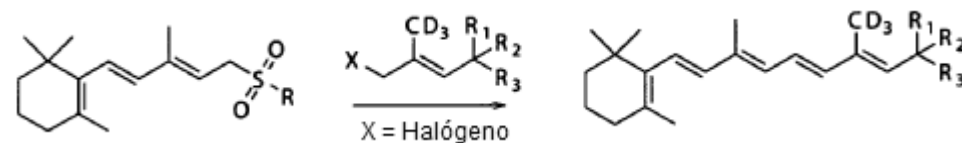
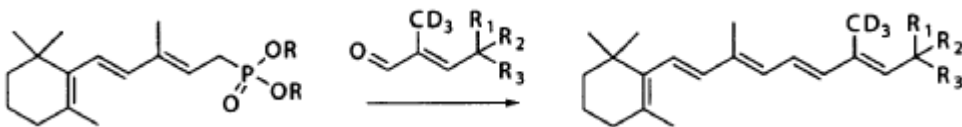


en donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, y R<sub>3</sub> son como se los define en la Fórmula Ib.

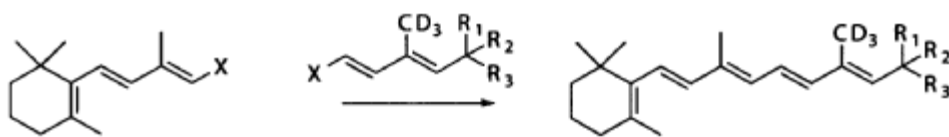
10 Los métodos y esquemas de reacción ejemplificativos para hacer compuestos de retinoide C<sub>20</sub> de acuerdo con la presente invención se indican a continuación:



X = halógeno



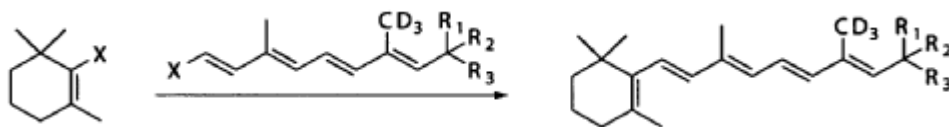
15



X = halógeno, S nR<sub>3</sub> (donde r = alquilo),

B(OH)<sub>2</sub>, OTf

5

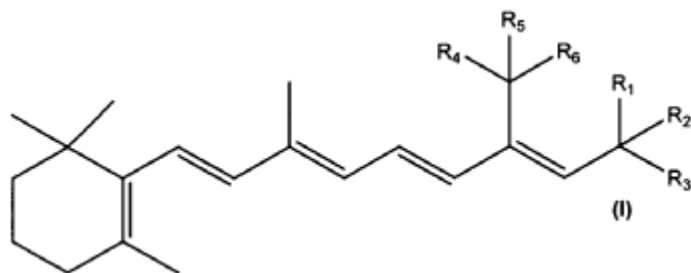


X = halógeno, S nR<sub>3</sub> (donde r = alquilo),

B(OH)<sub>2</sub>, OTf

10

En otra realización, la invención es una composición que comprende un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico y un compuesto de acuerdo con la fórmula I:



en donde:

R<sub>1</sub> es oxo o H;

R<sub>2</sub> es H o nada;

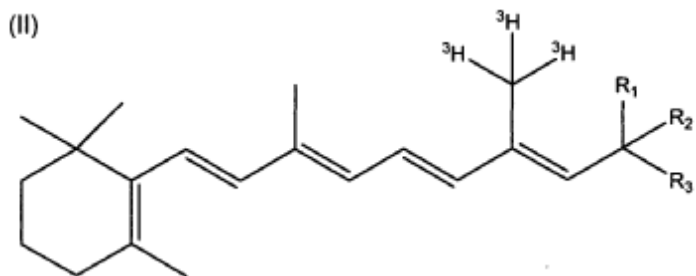
15

R<sub>3</sub> es hidroxí u oxo o =CH-R<sub>7</sub>, donde R<sub>7</sub> forma un carotenoide; y R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, y R<sub>6</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en <sup>2</sup>H (D), <sup>3</sup>H (T), halógeno, y alquilo C<sub>1-8</sub>. Preferiblemente, el halógeno es flúor (F).

En esta realización, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, y R<sub>6</sub> también pueden seleccionarse en forma independiente de H en tanto que R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, y R<sub>6</sub> no sean cada uno <sup>1</sup>H. También se discute en la presente memoria un sustituyente que hace más lento la formación de lipofuscina, un sustituyente que hace más lento la formación de al menos uno de formación de A2E o dímero ATR, o un sustituyente que hace más lenta la abstracción de hidrógeno o migración en la posición C<sub>20</sub> cuando se compara con a retinoide que no está sustituido en la posición C<sub>20</sub>, por ej. un retinoide C<sub>20</sub>-H<sub>3</sub> retinoide.

20

Preferiblemente, en la composición de la presente invención el compuesto tiene la estructura de la fórmula II:



en donde:

R<sub>1</sub> es oxo o H;

R<sub>2</sub> es H o nada; y

25

R<sub>3</sub> es hidroxilo u oxo o =CH-R<sub>7</sub>, donde R<sub>7</sub> forma un carotenoide.

En la presente invención, las composiciones pueden comprender además un suplemento. Algunos ejemplos representativos, no limitativos de un suplemento de acuerdo con la presente invención son los antagonistas del ciclo visual, moléculas que inhiben el flujo de un retinoide en el ojo, o combinaciones de los anteriores.

5 Los antagonistas ejemplificativos, no limitativos del ciclo visual de acuerdo con la presente invención incluyen TDH, TDT, ácido 13 *cis*-retinoico, ret-NH<sub>2</sub>, y combinaciones de los anteriores. Un antagonista ejemplificativo, no limitativo, del ciclo visual de acuerdo con la presente invención es Fenretinida. Otros antagonistas del ciclo visual dentro del alcance de la presente invención incluyen aquellos divulgados en R. Rando, Solicitud de Patente de EE. UU. Nro. de Serie 11/199.594 presentada el 8 de agosto de 2005.

10 En la presente invención, pueden incluirse uno o más aditivos en las composiciones. Los aditivos ejemplificativos, no limitativos que pueden incluirse en las composiciones de la presente invención incluyen zinc, vitamina E, vitamina D, y combinaciones de los anteriores.

15 Los aditivos de zinc, vitamina E, y vitamina D pueden estar presentes en las composiciones de la presente invención en cantidades que son efectivas para, por ej., potenciar la biodisponibilidad de los compuestos de retinoide sustituido C<sub>20</sub> de la presente invención, que incluyen la Fórmula I, Fórmulas Ic-e, y Fórmula II. De este modo, en la presente invención, el zinc puede estar presente en la composición a entre aproximadamente 3 a aproximadamente 80 mg, preferiblemente entre aproximadamente 3 a aproximadamente 10 mg o entre aproximadamente 10 a aproximadamente 80 mg. La vitamina E puede estar presente en la composición a entre aproximadamente 3 a aproximadamente 3.000 mg, preferiblemente entre aproximadamente 3 a aproximadamente 15 mg o entre aproximadamente 15 a aproximadamente 3.000 mg. Vitamina D puede estar presente en la composición a entre aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,1 mg, preferiblemente entre aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,015 mg o entre aproximadamente 0,015 a aproximadamente 0,1 mg.

25 Las composiciones de la presente invención también pueden incluir uno o más aditivos adicionales, que incluyen, por ejemplo, antioxidantes oftálmicos, minerales, fosfolípidos de carga negativa, carotenoides, y combinaciones de los anteriores. El uso de anti-oxidantes ha demostrado beneficiar a los pacientes con degeneraciones maculares y distrofias. Véase, por ej., Arch. Ophthalmol., 119: 1417-36 (2001); Sparrow, et al., J. Biol. Chem., 278:18207-13 (2003). Algunos ejemplos de antioxidantes apropiados que podrían usarse en una composición de la presente invención en combinación con un compuesto de fórmulas I, que incluyen las fórmulas Ic-le y II, incluyen vitamina C, vitamina E, beta-caroteno y otros carotenoides, coenzima Q, OT-551 (Othera Pharmaceuticals Inc.), 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-óxido (también conocido como Tempol), hidroxitolueno butilado, resveratrol, un análogo de trolox (PNU-83836-E), extracto de bilberry, y combinaciones de los anteriores.

30 El uso de ciertos minerales también ha demostrado que beneficia a pacientes con degeneraciones maculares y distrofias. Véase, por ej., Arch. Ophthalmol., 119: 1417-36 (2001). De este modo, la presente invención contempla la inclusión opcional de uno o más de dichos minerales. Algunos ejemplos de minerales apropiados que podrían usarse en una composición de la presente invención incluyen minerales que contienen cobre, tales como óxido cúprico (solamente a modo de ejemplo); minerales que contienen zinc, tales como óxido de zinc (solamente a modo de ejemplo); y compuestos que contienen selenio, y combinaciones de los anteriores.

35 El uso de ciertos fosfolípidos con carga negativa también ha demostrado que beneficia a pacientes con degeneraciones maculares y distrofias. Véase, por ej., Shaban & Richter, Biol. Chem., 383:537-45 (2002); Shaban, et al., Exp. Eye Res., 75:99-108 (2002). Algunos ejemplos de fosfolípidos con carga negativa apropiados que podrían usarse opcionalmente en una composición de la presente invención incluyen cardiolipina, fosfatidilglicerol, y combinaciones de los anteriores. Los fosfolípidos de carga positiva y/o neutra también pueden beneficiar a pacientes con degeneraciones maculares y distrofias cuando se usan en combinación con una composición de la presente invención.

40 El uso de ciertos carotenoides se ha correlacionado con el mantenimiento de la fotoprotección necesaria en células fotorreceptoras. Los carotenoides son pigmentos naturales de amarillo a rojo del grupo terpenoide que pueden encontrarse en plantas, algas, bacterias y ciertos animales, tales como aves y moluscos. Los carotenoides son una clase extensa de moléculas en las cuales más de 600 carotenoides naturales se han identificado. Los carotenoides incluyen hidrocarburos (carotenos) y sus derivados alcohólicos, oxigenados (xantófilos). Estos incluyen actinoeritrol, astaxantina, cantaxantina, capsantina, capsorubina, beta-8'-apo-carotenal (apo-carotenal), beta-12'-apo-carotenal, alfa-caroteno, beta-caroteno, "caroteno" (una mezcla de alfa- y beta-carotenos), gamma-carotenos, beta-cirptoxantina, luteína, licopeno, violeritrina, zeaxantina, y sus miembros que contienen ésteres de hidroxilo o carboxilo. Muchos de los carotenoides ocurren en la naturaleza como formas *cis*- y *trans*-isoméricas, mientras que los compuestos sintéticos son con frecuencia mezclas racémicas.

45 En los humanos, la retina acumula selectivamente principalmente dos carotenoides: zeaxantina y luteína. Se considera que estos dos carotenoides ayudan en la protección de la retina porque son poderosos antioxidantes y absorben la luz azul. Algunos ejemplos de carotenoides apropiados para el uso opcional en una composición de la presente invención incluyen luteína y zeaxantina, así como cualquiera de los carotenoides mencionados con anterioridad y combinaciones de los anteriores.

Las formas de dosificación efectivas, modos de administración y cantidades de dosificación, además de las divulgadas con anterioridad, pueden determinarse empíricamente, y la realización de dichas determinaciones se encuentra dentro de la habilidad en la técnica. Aquellas personas con experiencia en la técnica comprenden que la cantidad de dosificación variará con la vía de administración, el índice de excreción, la duración del tratamiento, la identidad de cualquier otra droga administrada, la edad, el tamaño y la especie del mamífero, por ej., paciente humano y factores similares conocidos en la técnica de la medicina y medicina veterinaria. En general, una dosis apropiada de un compuesto de acuerdo con la invención será esa cantidad del compuesto, que es la dosis más baja efectiva para producir el efecto deseado. Por ejemplo, un compuesto de la invención está presente en la composición a un nivel suficiente para administrar aproximadamente 0,1 a aproximadamente 90 mg/día a un paciente. La dosis efectiva de un compuesto puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis, administradas separadas en intervalos apropiados durante el día.

Un compuesto de la presente invención puede administrarse en cualquier forma deseada o efectiva: como composiciones farmacéuticas para ingestión oral, o como ungüento o gota para administración local a los ojos, o para administración parenteral u otra, en cualquier forma apropiada tales como intraperitoneal, subcutánea, tópica, intradérmica, inhalación, intrapulmonar, rectal, vaginal, sublingual, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratecal, o intralinfática. Además, un compuesto de la presente invención puede administrarse en conjunción con otros tratamientos. Un compuesto o composición de la presente invención pueden encapsularse o protegerse de otro modo contra las secreciones gástricas u otras, si se desea.

Mientras que es posible que un compuesto de la invención se administre solo, se prefiere administrar el compuesto como formulación farmacéutica (composición) o un suplemento vitamínico o nutracéutico. Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la invención comprenden uno o más compuestos como principio activo mezclado con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, uno o más de otros compuestos, drogas, ingredientes y/o materiales. Sin importar la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención se formulan en forma de dosificación farmacéuticamente aceptable por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ej., Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.).

Los vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico se conocen bien en la técnica (véase, por ej., Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.) y The National Formulary (American Pharmaceutical Association, Washington, D.C.)) y incluyen azúcares (por ej., lactosa, sacarosa, manitol, y sorbitol), almidones, preparaciones de celulosa, fosfatos de calcio (por ej., fosfato de dicalcio, fosfato de tricalcio y fosfato ácido de calcio), citrato de sodio, agua, soluciones acuosas (por ej., solución salina, inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, e inyección de cloruro de sodio, solución de Ringer con lactato), alcoholes (por ej., alcohol etílico, alcohol propílico, y alcohol bencílico), polioles (por ej., glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol), ésteres orgánicos (por ej., oleato de etilo y triglicéridos), polímeros biodegradables (por ej., poliláctido-poliglicólido, poli(ortoésteres), y poli(anhídridos)), matrices elastoméricas, liposomas, microesferas, aceites (por ej., de maíz, germen, oliva, rcino, sésamo, semilla de algodón y nuez), manteca de cacao, ceras (por ej., ceras de supositorio), parafinas, siliconas, talco, silicilato, etc. Cada vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico usado en una composición farmacéutica de la invención debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación y no perjudiciales para el sujeto. Los vehículos apropiados para una forma de dosificación seleccionada y la vía pretendida de administración se conocen bien en la técnica, y los vehículos apropiados para una forma de dosificación elegida y un método de administración pueden determinarse con el uso de habilidad usual en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas o suplementos vitamínicos o nutracéuticos de la invención pueden, opcionalmente, contener ingredientes adicionales y/o materiales comúnmente usados en las composiciones farmacéuticas o suplementos vitamínicos o nutracéuticos. Estos componentes o materiales se conocen bien en la técnica e incluyen (1) rellenos o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, glicolato almidón de sodio, carboximetilcelulosa de sodio entrecruzada y carbonato de sodio; (5) agentes retardadores de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, y lauril sulfato de sodio; (10) agentes de suspensión, tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, sorbitol de polioxietileno y ésteres sorbitanos, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto; (11) agentes reguladores del pH; (12) excipientes, tales como lactosa, azúcares de la leche, polietilenglicoles, grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, manteca de cacao, almidones, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicol, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco, salicilato, óxido de zinc, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio, y polvo de poliamida; (13) diluyentes inertes, tales como agua u otros solventes; (14) conservantes; (15) agentes activos en la superficie; (16) agentes dispersantes; (17) agentes de control de liberación y retraso de absorción, tales como hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, polímeros biodegradables, liposomas, microesferas, monoestearato de aluminio, gelatina, y ceras; (18) agentes opacantes; (19) adyuvantes; (20) agentes humectantes; (21) agentes de suspensión y emulsionantes; (22), agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceite de semilla de

algodón, nuez moscada, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol de tetrahidrofurilo, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitan; (23) propelentes, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano; (24) antioxidantes; (25) agentes que toman la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido, tales como azúcares y cloruro de sodio; (26) agentes espesantes; (27) materiales de recubrimiento, tales como lecitina; y (28) agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes. Cada uno de dichos ingredientes o materiales deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros componentes de la formulación y no perjudiciales para el sujeto. Los ingredientes y materiales apropiados para una forma de dosificación seleccionada y vía pretendida de administración se conocen en la técnica, y los materiales y componentes aceptables para la forma de dosificación el método de administración pueden determinarse con el uso de habilidad usual en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas o suplementos vitamínicos o nutracéuticos apropiados para administración oral pueden estar en la forma de cápsulas, bolsas, píldoras, comprimidos, polvos, gránulos, una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, una emulsión de aceite en agua o agua en aceite, un elixir o jarabe, una pastilla, un bolo, un supositorio vaginal o una pasta. Estas formulaciones pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica, por ej., por medio de procesos convencionales de recubrimiento en sartén, mezclado, granulación o liofilización.

La forma de dosificación sólida para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares) puede prepararse mezclando el(los) principios activos con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, uno o más rellenos, extendedores, aglutinantes, humectantes, agentes desintegrantes, agentes retardadores de solución, aceleradores de absorción, agentes humectantes, absorbentes, lubricantes, y/o agentes colorantes. Las composiciones sólidas de un tipo similar pueden emplearse como rellenos en cápsulas de gelatina con relleno duro y blando con el uso de un excipiente apropiado. Un comprimido puede realizarse por compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más agentes accesorios. Los comprimidos pueden prepararse con el uso de un aglutinante apropiado, lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante, agente dispersante o activo en la superficie. Los comprimidos moldeados pueden realizarse por moldeado en una máquina apropiada. Los comprimidos, y otras formas de dosificación sólidas, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden opcionalmente ranurarse o prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos conocidos en la técnica de formulaciones farmacéuticas. También pueden formularse para proporcionar liberación lenta o controlada del principio activo que incluyen. Pueden esterilizarse por, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacantes y pueden ser de una composición tal que liberen el principio activo solamente, o en forma preferencial, en cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, en un modo demorado. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada.

La forma de dosificación líquida para administración oral incluye emulsiones, microemulsiones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. La forma de dosificación líquida puede contener diluyentes inertes apropiados usados comúnmente en la técnica. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes de suspensión y emulsionantes, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes. Las suspensiones pueden contener agentes de suspensión.

Las composiciones farmacéuticas para administración rectal o vaginal pueden presentarse como supositorio, el cual puede prepararse por mezclado de uno o más principio(s) activo(s) con uno o más vehículos no irritativos apropiados que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a la temperatura del cuerpo y, por lo tanto, se fundirán en el recto o la cavidad vaginal y liberarán el compuesto activo. Las composiciones farmacéuticas que son apropiadas para administración vaginal también incluyen supositorios vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol que contienen dichos vehículos farmacéuticamente aceptables que son conocidos en la técnica porque son apropiados.

La forma de dosificación para la administración tópica o transdérmica incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches, gotas e inhaladores. El compuesto activo puede mezclarse en las condiciones estériles con un vehículo apropiado farmacéuticamente apropiado. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener excipientes. Los polvos y aerosoles pueden contener excipientes y propelentes.

Las composiciones farmacéuticas apropiadas para administraciones parenterales comprenden uno o más compuestos en combinación con una o más soluciones no acuosas o acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles inmediatamente antes de usar, las cuales pueden contener antioxidantes apropiados, buffers, solutos que toman la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido, o agentes de suspensión o espesamiento. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y por el uso de agentes tensioactivos. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes apropiados, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. También puede ser deseable que incluyan agentes isotónicos. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse por la inclusión de agentes que demoran la absorción.

En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de una droga (por ej., formulación farmacéutica o suplemento vitamínico o nutracéutico), se desea disminuir su absorción a partir de inyección intramuscular o subcutánea. Esto puede acompañarse del uso de una suspensión líquida de material amorfo o cristalino que tiene poca solubilidad en agua.

5 El índice de absorción de una droga entonces depende de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción demorada de una droga administrada en forma parenteral puede lograrse por disolución o suspensión de la droga en un vehículo oleoso. La forma de depósito inyectable puede hacerse por formación de matrices de microcápsulas del principio activo en polímeros biodegradables. Dependiendo de la proporción del principio activo a polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, el índice de liberación del principio activo puede controlarse. Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando la droga en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal. Los materiales inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias.

15 Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitarias o dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada que requiere solamente la incorporación del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de usar. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito con anterioridad.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar en forma adicional los métodos de la presente invención.

## EJEMPLOS

### 20 EJEMPLO 1

El reemplazo de los hidrógenos C<sub>20</sub> de *all-trans*-retinal con deuterios hace más lenta la formación de A2E in vitro

El C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-retinal se preparó de acuerdo con el procedimiento de la bibliografía (47) y su capacidad in vitro para formar A2E cuando se compara con *all-trans*-retinal se midió por medio de HPLC.

25 La FIG. 3A grafica la formación de *all* A2E para dos mezclas de reacción que contienen cualquiera de *all-trans*-retinal o C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-*all-trans*-retinal (16 mg), etanolamina (0,5 equivalentes) y ácido acético (1,2 equivalentes). Una traza de HPLC típica se muestra en la FIG. 3B para las mezclas de reacción de *all-trans*-retinal y C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-*all-trans*-retinal. El área bajo la curva corresponde a la cantidad de A2E: cuanto mayor es el área más hay de A2E. Las concentraciones de A2E en las dos mezclas de reacción se midieron aproximadamente cada 8 horas durante 50 horas. Las concentraciones en cada momento se graficó y los puntos de datos se adaptan a la línea para cada mezcla de reacción. Una comparación de las pendientes de las dos líneas para las dos reacciones revelaron que la formación de A2E ocurrió 7 veces más rápido para *all-trans*-retinal cuando se compara con C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-*all-trans*-retinal. No se observó intercambio de deuterio hidrogenado durante la reacción con el retinal rotulado, según se mide por medio de espectrometría de masa de la mezcla de reacción después de 50 horas, la cual mostró claramente la presencia del retinal tri-deuterado, hidroxilamina de retinal tri-deuterado, base de Schiff y A2E tetra-deuterado.

### 35 EJEMPLO 2

El reemplazo de los hidrógenos C<sub>20</sub> de *all-trans*-retinal con deuterios hace más lenta la formación de dímero ATR in vitro

40 El C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-*all-trans*-retinal se preparó como se describe en el Ejemplo 1 y su capacidad in vitro para formar dímero ATR cuando se compara con *all-trans*-retinal se midió por medio de HPLC. *All-trans*-retinal o C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-*all-trans*-retinal (10 mg) y prolina (2 equivalentes) en etanol se mezclaron, y a la reacción le siguió la HPLC, los resultados de la cual se muestran en la FIG. 4A. Una traza de HPLC típica se muestra en la FIG. 4B para las mezclas de reacción del *all-trans*-retinal y C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-*all-trans*-retinal en los mismos momentos de medición. Las concentraciones de dímero ATR en las dos mezclas de reacción se midieron aproximadamente cada 15 min durante 3 horas. La concentración en cada momento se graficó y los puntos de datos se adaptan a la línea para cada mezcla de reacción. Una comparación de las pendientes de las dos líneas mostró que el C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-*all-trans*-retinal formó el dímero ATR 15 veces más lento que el retinal no marcado como se muestra en la FIG. 4C.

### EJEMPLO 3

El reemplazo de los hidrógenos C<sub>20</sub> de *all-trans*-retinal con deuterios hace más lenta la formación de A2E-lipofuscina en ratones CD-1 (ICR)

50 El C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-*all-trans*-retinal se administró a ratones con el fin de medir su capacidad para formar A2E en el ojo cuando se compara con *all-trans*-retinal. Nueve ratones CD-1 (ICR) de 8 semanas de vida (de Charles River, Wilmington, MA) se dividieron en hasta dos grupos de cinco y se les administró 1,5 mg de *all-trans*-retinal de éter o C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-*all-trans*-retinal por inyección intraperitoneal (IP) en una solución al 10% de Tween-20 en solución salina dos veces por semana durante 6 semanas. Al final de este período de seis semanas, a cada ratón se le administró un total de 60.000 I. U. (18 mg) o

aproximadamente 28 veces la cantidad original de vitamina A en el cuerpo del ratón. La administración masiva con C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal reemplaza rápidamente reservas normales de vitamina A con el análogo C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>. Y, el retinal inyectado se acumula rápidamente en el ojo (segmentos externos en la varilla), donde a concentraciones lo suficientemente altas reaccionará para formar pigmentos de lipofuscina. Esto es similar a la acumulación de all-*trans*-retinal en los ratones ABCR<sup>-/-</sup> y en pacientes con enfermedad de Stargardt.

Al final del período de seis semanas, los ojos se diseccionaron, las retinas y las cuencas de los ojos se agruparon en grupos de 4 o 5, y se homogenizaron con 50 µl de etanol. El homogenato se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos y 40 µl del sobrenadante se extrajo y se analizó para determinar la presencia de A2E-lipofuscina por HPLC. El retinol y los ésteres de retinol se analizaron a 325 nm y la A2E-lipofuscina se midió a 445 nm. A los ratones a los que se administró C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal (n = 5) tenían 68% menos de A2E-lipofuscina cuando se compara con los ratones a los que se administró all-*trans*-retinal (n = 4). Ambos grupos de ratones tenían escasamente las mismas concentraciones de retinol y ésteres de retinol.

#### EJEMPLO 4

El reemplazo de los hidrógenos C<sub>20</sub> de all-*trans*-retinal con deuterios reduce la formación de A2E en ratones ABCR<sup>-/-</sup>

El C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-acetato de retinol se preparó de acuerdo con el procedimiento de la bibliografía (47) y se administró a ratones ABCR<sup>-/-</sup> (48, 49) con el fin de medir su capacidad de conducir a lipofuscina cuando se compara con la de acetato de all-*trans*-retinol. Ocho ratones ABCR<sup>-/-</sup> de 2 meses de vida, mantenidos con una dieta estándar para roedores luego recibieron una dieta que contiene 20.000 U. I./kg de cualquiera de acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol o all-*trans*-acetato de retinol durante 3 meses. En esta dieta cada ratón apenas recibió la cantidad diaria recomendada de vitamina A o la misma cantidad de la droga de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-vitamina A, la cual era de menos de aproximadamente 1 mg/kg/día.

Al final del período de 5 meses, los ojos se diseccionaron, las cuencas oculares se agruparon en grupos de seis y se homogenizaron con 80 µL de etanol. El homogenato se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min y 30 µL del sobrenadante se extrajo y se analizó para determinar la presencia de A2E-lipofuscina por HPLC. La A2E-lipofuscina se midió a 445 nm. Los ratones a dieta durante 3 meses que contiene acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol tenían 44-58% menos de A2E-lipofuscina cuando se compara con ratones a dieta con acetato de all-*trans*-retinol. Este porcentaje de reducción de A2E está en el mismo orden de magnitud observado en estudios similares en ratones ABCR<sup>-/-</sup> con el antagonista del ciclo visual TDH, TDT, Ret-NH<sub>2</sub>, ácido 13-*cis*-retinoico y Fenretinida. Sin embargo, en este ejemplo, la reducción de A2E se logra con dosis de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-acetato de retinol que son 11 a 40 veces menos.

#### EJEMPLO 5

Los ratones ABCR<sup>-/-</sup> mantenidos exclusivamente con una dieta de acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol muestran cantidades no detectables de pigmentos extraíbles de lipofuscina y reducidos depósitos de lipofuscina.

Como en el Ejemplo 4, dos grupos de cuatro ratones ABCR<sup>-/-</sup> se mantuvieron indistintamente con dietas que contienen acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol o all-*trans*-acetato de retinol. Sin embargo, En este ejemplo, los ratones eran crías de madres con la misma dieta, y de este modo se mantuvieron sólo con sus respectivos análogos de la Vitamina A. A los 5,5-6 meses de vida los ratones se sacrificaron y las copas de los ojos se analizaron para determinar la presencia de pigmentos de lipofuscina como se describe en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en la FIG 5. Mientras que ambos ratones contenían la misma cantidad de retinol ocular y pigmentos de ésteres de retinol (FIG 5C) de lipofuscina fueron indetectables en los ratones mantenidos con la dieta de acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol (FIG 5B) pero fueron detectables en los ratones mantenidos con la dieta con acetato de all-*trans*-retinol (FIG 5A).

Con el fin de medir la cantidad de gránulos de lipofuscina en los ojos de los ratones anteriores en una dieta normal versus la dieta que contiene acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol, las copas de los ojos de ambos grupos de ratones (2 de cada grupo) se evaluaron por microscopio electrónico. Los ratones con la dieta de acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol tenían menos depósitos de lipofuscina densa electrónica que cuando se compara con los ratones en dieta de acetato de all-*trans*-retinol como se muestra en la FIG. 6.

#### EJEMPLO 6

El C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal hace más lenta A2E-la formación de lipofuscina así como Fenretinida y/o TDH en ratas de tipo salvaje.

Las ratas CD IGS hembra, de 45-50 días de vida (Charles River, Wilmington, MA) se dividieron en hasta cuatro grupos de tres. Tres de estos grupos recibieron una dosis de all-*trans*-retinal y el grupo uno recibió inyección de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal (inyección IP en una solución al 10% de Tween-20 en solución salina) a 3 mg, dos o tres veces por semana durante 8 semanas (20 inyecciones de 3 mg en total). De este modo, al final del período de 8 semanas los animales recibieron apenas 20 veces sus reservas originales de vitamina A, como retinal o C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal. La administración masiva con C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal reemplaza rápidamente reservas normales de vitamina A con el análogo C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>. De los tres grupos que recibieron all-*trans*-retinal, un grupo recibió Fenretinida (50) y otro TDH (23), en

dosis de apenas 1,5 mg/día/animal (ambas provistas en el agua potable emulsionada con 1 g/L de Nu-rice (RIBUS, Inc, St. Louis, MO)).

Al final de las 8 semanas, RPE, A2E-lipofuscina se evaluó en cada grupo para los cuatro grupos por HPLC como se describe en el Ejemplo 3 y en la FIG. 7. Los A2E-pigmentos de lipofuscina fueron los más altos en los animales que recibieron *all-trans*-retinal (el grupo de control). Mientras que los animales que reciben C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-*all-trans*-retinal tuvieron 35% menos A2E-lipofuscina que los animales que recibieron *all-trans*-retinal. Del mismo modo, los animales que recibieron Fenretinida o TDH tuvieron 49% y 31% menos A2E-lipofuscina cuando se compara con animales que sólo recibieron *all-trans*-retinal.

#### DOCUMENTOS CITADOS

Los siguientes documentos se han citado con anterioridad:

1. Friedman, D.S.; O'Colmain, B.J.; Muñoz, B.; Tomany, S.C.; McCarty, C.; DeJong, P.T.V.M.; Nemesure, B.; Mitchell, P.; Kempen, J.; Congdon, N. Prevalence of age related macular degeneration in the United States. *Arch. Ophthalmol.* 2004, 122, 564-572.
2. Rattner, A.; Nathans, J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006, 7, 860-872.
3. Jong, P.T.V.M.d. Age-related macular degeneration. *N. Engl J Med* 2006, 355, 478-485.
4. Fine, S. L.; Berger, J.W.; Maguire, M. G.; Ho, A.C. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2007, 342, 483-492.
5. Jarc-Vidmar, M.; Kraut, A.; Hawlina, M. Fundus autofluorescence imaging in Best's vitelliform dystrophy. *Klinische Monatsblätter Fur Augenheilkunde* 2003, 220, 861-867.
6. Capon, M.; Marshall, J.; Krafft, J.; Alexander, R.; Hiscott, P.; Bird, A. Sorsby's fundus dystrophy: a light and electron microscopic study. *Ophthalmology* 1989, 95, 1969-1977.
7. Chong, N.; Alexander, R.; Gin, T.; Bird, A.; Luthert, P. TIMP-3 collagen, and elastin immunohistochemistry and histopathology of Sorsby's fundus dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, 41, 898-902.
8. Alikmets, R.; Singh, N.; Sun, H.; Shroyer, N. F.; Hutchinson, A.; Chidambaram, A.; Gerrard, B.; Baird, L.; Stauffer, D.; Peiffer, A.; Rattner, A.; Smallwood, P.; Li, Y.; Anderson, K.L.; Lewis, R.A.; Nathans, J.; Leppert, M.; Dean, M.; R., L.J. A Photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* 1997, 15, 236-246.
9. Haralampus-Grynawski, N. M.; Lamb, L.E.; Clancy, C.M.R.; Skumatz, C; Burke, J. M.; Sarna, T.; Simon, J. D. Spectroscopic and morphological studies of human retinal lipofuscin granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100.
10. Marmorstein, A.D.; Marmorstein, L.Y.; Sakaguchi, H.; Hollyfield, J. G. Spectral Profiling of Autofluorescence Associated with Lipofuscin, Bruch's Membrane, and Sub-RPE Deposits in Normal and AMD Eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002, 43, 2435-2441.
11. Smith, R.T.; Chan, J. K.; Busuocic, M.; Sivagnanavel, V.; Bird, A.C.; Chong, N.V. Autofluorescence characteristics of early, atrophic, and high-risk fellow eyes in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006, 47, 5495-5504.
12. Sakai, N.; Decatur, J.; Nakanishi, K.; Eldred, G. E. A2-E<sup>+</sup>: An Unprecedented Pyridinium Bisretinoid. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 1559-1560.
13. Fishkin, N. E.; Sparrow, J. R.; Allikements, R.; Nakanishi, K. Isolation and characterization of retinal pigment epithelial cell fluorophore: An *all-trans*-retinal dimer conjugate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005, 100, 7091-7096.
14. Sparrow, J. S.; Nakanishi, K.; Parish, CA. The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000, 41, 1981-1989.
15. Suter, M.; Reme, C. E.; Christian Grimm; Wenzel, A.; Jaattela, M.; Esser, P.; Kociok, N.; Leist, M.; Richter, C. Age-related Macular Degeneration: The lipofuscin component *n*-retinyl-*n*-retinylidene ethanolamine detaches proapoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells. *J. Bio. Chem.* 2000, 275, 39625-39630.
16. Finnemann, S.; Leung, L.W.; Rodriguez-Boulan, E. The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99, 3842-3847.



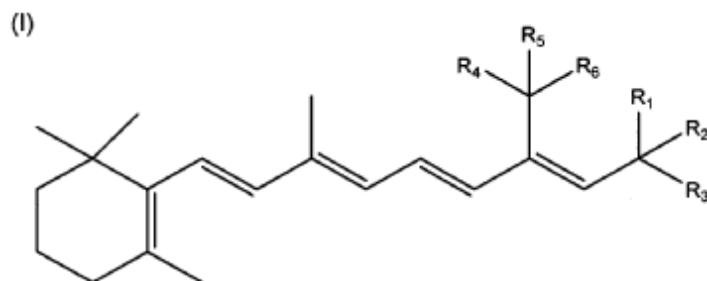
17. De, S.; Sakmar, T.P. Interaction of A2E with model membranes. Implications to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *J Gen Physiol.* 2002, 120, 147-157.
18. Bergmann, M.; Schütt, F.; Holz, F.G.; Kopitz, J. Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J.* 2004, 18, 562-564.
19. Radu, R.A.; Mata, N. L.; Bagla, A.; Travis, G. H. Light exposure stimulates formation of A2E oxiranes in a mouse model of Stargardt's macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101, 5928-5933.
20. Ben-Shabat, S.; Parish, C.A.; Hashimoto, M.; Liu, J.; Nakanishi, K.; Sparrow, J. R. Fluorescent pigments of the retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration. *Bioorg Med Chem Lett.* 2001, 11, 1533-1540.
21. Schutt, F.; Bergmann, M.; Holz, F.G.; Dithmar, S.; Volcker, H.-E.; Kopitz, J. Accumulation of A2-E in mitochondrial membranes of cultured RPE cells. 2007, 245, 391-398.
22. Schutt, F.; Davies, S.; Kopitz, J.; Holz, F.G.; Boulton, M.E. Photodamage to human RPE cells by A2-E, a retinoid component of lipofuscin. 41 2000, 2303- 2308.
23. Maiti, P.; Kong, J.; Kim, SA; Sparrow, J.S.; Allikmets, R.; Rando, R.R. Small molecule RPE65 antagonists limit the visual cycle and prevent lipofuscin formation. *Biochemistry* 2006, 45, 852-860.
24. Radu, R.A.; Mata, N. L.; Nusinowitz, S.; Liu, X.; Sieving, P.A.; Travis, G. H. Treatment with isotretinoin inhibits lipofuscin accumulation in a mouse model of recessive Stargardt macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 4742-4747.
25. Golczak, M.; Maeda, A.; Bereta, G.; Maeda, T.; Kiser, P.D.; Hunzelmann, S.; Lintig, J. V.; Blaner, W.S.; Palczewski, K. Metabolic Basis of Visual Cycle Inhibition by Retinoid and Nonretinoid Compounds in the Vertebrate Retina. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 9543-9554.
26. Katz, M. L.; Drea, CM.; Robison, W.G. Relationship between dietary retinol and lipofuscin in the retinal pigment epithelium. *Mech. Age. Dev.* 1986, 35, 291-305
27. Radu, R.A.; Han, Y.; Bui, T.V.; Nusinowitz, S.; Bok, D.; Lichter, J.; Widder, K.; Travis, G. H.; Mata, N. L. Reductions in serum vitamin A arrest Accumulation of toxic retinal fluorophores: A potential therapy for treatment of lipofuscin based retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005, 46, 4393-4401.
28. Wassell, J.; Boulton, M. A role for vitamin A in the formation of ocular lipofuscin. *Br J Ophthalmol* 1997, 81, 911-918.
29. Owsley, C; Jackson, G. R. Aging and scotopic dysfunction. *Perception* 2000, 29, Abstract Supplement.
30. Owsley, C; Jackson, G. R.; White, M.; Feist, R.; Edwards, D. Delays in rod- mediated dark adaptation in early age-related maculopathy. *Ophthalmology* 2001, 108, 1196-1202.
31. Baehr, W.; Wub, S. M.; Birdc, A.C.; Palczewski, K. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Research* 2003, 43, 2957-2958.
32. Maeda, A.; Maeda, T.; Golczak, M.; Imanishi, Y.; Leahy, P.; Kubota, R.; Palczewski, K. Effects of potent inhibitors of the retinoid cycle on visual function and photoreceptor protection from light damage in mice. *Mol. Pharmacol.* 2006, 70, 1220-1229.
33. Hong, W.K.; Itri, L.M. *Retinoids and human cancer*, Second Edition Ed.; Raven Press Ltd: New York, 1994.
34. Gudas, L.J.; Sporn, M. B.; Roberts, A.B. *Cellular biology and biochemistry of retinoids*; Raven Press Ltd.: New York, 1994; 443-520 pp.
35. Nason-Burchenal, K.; Dmitrovsky, E. *The retinoids: cancer therapy and prevention mechanisms*: Berlin, 1999; 301-322 pp.
36. Dragnev, K.H.; Rigasa, J. R.; Dmitrovsky, E. *The Retinoids and Cancer Prevention Mechanisms* *Oncologist* 2003, 5, 361-368.
37. Freemantle, S.J.; Spinella, MJ. ; Dmitrovsky, E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 2003, 22, 7305- 7315.
38. Soriatan, RXlist.com, <http://www.rxlist.com/cgi/generic/acitretin.htm#>, accessed Sept. 02, 2008. 2008.
39. Targretin, RXlist.com <http://www.rxlist.com/cgi/generic/bexarotene.htm>, accessed Sept. 02 2008.

40. Acutane, RXlist.com, <http://www.rxlist.com/cgi/generic/isotret.htm>, accessed Sept. 02 2008.
41. Camerini, T.; Mariani, L.; Palo, G. D.; Marubini, E.; Mauro, M. G. D.; Decens, A.; Costa, A.; Veronesi, U. Safety of the Synthetic Retinoid Fenretinide: Long- Term Results From a Controlled Clinical Trial for the Prevention of Contralateral Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2001, 19, 1664-1670.
- 5 42. Puduvalli, V.K.; Yung, W.K.A.; Hess, K.R.; Kuhn, J.G.; Groves, M.D.; Levin, V.A.; Zwiebel, J.; Chang, S.M.; Cloughesy, T.F.; Junck, L.; Wen, P.; Lieberman, F.; Conrad, C.A.; Gilbert, M.R.; Meyers, C.A.; Liu, V.; Mehta, M. P.; Nicholas, M.K.; Prados, M. Phase II Study of Fenretinide (NSC 374551) in Adults With Recurrent Malignant Gliomas: A North American Brain Tumor Consortium Study. *J. Clin. Oncol.* 2004, 22, 4282-4289.
- 10 43. Villablanca, J. G.; Khan, A.A.; Avramis, V.I.; Seeger, R.C.; Matthay, K.K.; Ramsay, N. K.; Reynolds, CP. Phase I trial of 13-cis-retinoic acid in children with neuroblastoma following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol.* 1995, 13, 849-901.
44. Chemotherapy drugs, Isoretinoin, <http://www.chemocare.com/bio/isoretinoin.asp>, accessed September 8 2008.
- 15 45. Haskell, M.; Mazumder, R. M.; Peerson, J. M.; Jones, A.D.; Wahed, M.A.; Mahalanabis, D.; Brown, K.H. Use of deuterated-retinol-dilution technique to assess total body vitamin A stores of adult volunteers consuming different amounts of vitamin A1 , 2, 3. *Amer. J. of Clinical Nutrition* 1999, 70, 874-880.
46. Bausch, J.; Rietz, P. Method for the assessment of vitamin A liver stores. *Acta Vitaminol Enzymol* 1977, 31, 99-112.
47. Pardoen, J.A.; Mulder, P.P.J. ; Van den Berg, E.M.M.; Lugtenburg, J. Synthesis of 8-, 9-, 12-, and 13-mono-13C-retinal. *Canadian Journal of Chemistry* 1985, 63, 1431-1435.
- 20 48. Weng, J.; Mata, N. L.; Azarian, S. M.; Tzekov, R.T.; Birch, D.G.; Travis, G. H. Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knock-out mice. *Cell* 1999, 9, 13-23.
49. Kim, S.; Fishkin, N.; Kong, J.; Nakanishi, K.; Allikmets, R.; Sparrow, J. R. Rpe65 Leu450Met variant is associated with reduced levels of the retinal pigment epithelium lipofuscin fluorophores A2E and iso-A2E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004, 101, 11668-11672.
- 25 50. Soo-Jong; Kwon, Y.-J.; Han, H.-S.; Park, S.-H.; Park, M.-S.; Rho, Y.-S.; Sin, H. -S. Synthesis and Biological Activity of Novel Retinamide and Retinoate Derivatives. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2004, 52, 501-506.

El alcance de la presente invención no se limita por la descripción, los ejemplos y los usos sugeridos en esta memoria y pueden realizarse modificaciones siempre que queden dentro del alcance de las reivindicaciones anexas y sus equivalentes.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de acuerdo con la fórmula I sustituido en la posición C<sub>20</sub> o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:



5 en donde:

R<sub>1</sub> es oxo o H;

R<sub>2</sub> es H o nada;

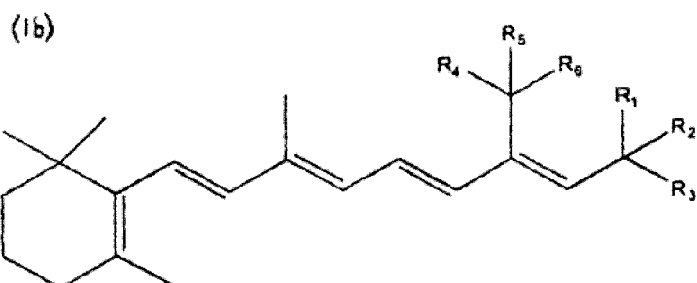
R<sub>3</sub> es hidroxilo u oxo o CHR<sub>7</sub> donde R<sub>7</sub> forma un carotenoide y

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, y R<sub>6</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en <sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H, <sup>3</sup>H, halógeno, y alquilo C<sub>1-8</sub>,

10 en donde R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> no son cada uno <sup>1</sup>H.

2. Una composición de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el compuesto es C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinal.

3. Una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un compuesto de acuerdo con la fórmula Ib sustituido en la posición C<sub>20</sub> o una de sus sales farmacéuticamente aceptables:



15 en donde

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son ambos H y R<sub>3</sub> es OH (retinol); o

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son ambos H y R<sub>3</sub> es OCOCH<sub>3</sub> (acetato de retinol); o

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son ambos H y R<sub>3</sub> es OCOR (éster de retinol tales como, por ej., palmitato de retinol) o

R<sub>1</sub> es = 0, R<sub>2</sub> es nada y R<sub>3</sub> es OH (ácido retinoico) o

20 R<sub>1</sub> es H, R<sub>3</sub> es nada, y R<sub>2</sub> es = CH-R<sub>7</sub>, donde R<sub>7</sub> forma un carotenoide; y

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> se seleccionan independientemente del grupo que consiste en <sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H, <sup>3</sup>H, halógeno, y alquilo C<sub>1-8</sub>;

en donde R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, y R<sub>6</sub> no son cada uno <sup>1</sup>H.

4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el compuesto es acetato de C<sub>20</sub>-D<sub>3</sub>-all-*trans*-retinol.

5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en donde R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son cada uno <sup>3</sup>H, o cada uno F.

25 6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son cada uno <sup>2</sup>H.

7. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, para usar como agente terapéutico.

8. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, para usar en el retraso de la formación de lipofuscina en la retina.
9. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, para usar en el tratamiento de la degeneración macular o distrofias.
- 5 10. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en donde: (i) cuando el compuesto es de la fórmula I, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, y R<sub>3</sub> se seleccionan como en la reivindicación 1, y R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son cada uno <sup>3</sup>H, o cada uno F; y (ii) cuando el compuesto es de la fórmula Ib, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, y R<sub>3</sub> se seleccionan como en la reivindicación 3; y R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> y R<sub>6</sub> son cada uno <sup>2</sup>H, o cada uno <sup>3</sup>H, o cada uno F.
- 10 11. Una composición para usar de acuerdo con la reivindicación 10, en donde cuando el compuesto es de la fórmula Ib, el compuesto se selecciona del grupo que incluye retinoles, acetatos de retinol, ésteres de retinol o beta-caroteno.
12. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, en donde dicha composición es capaz de disminuir o prevenir la formación de lipofuscina o la formación de por lo menos uno de A2E o dímero ATR, y/o en donde dicha composición es capaz de inhibir la abstracción de hidrógeno o la migración en la posición C<sub>20</sub>.
- 15 13. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones que anteceden que además comprende por lo menos un suplemento seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) un antagonista del ciclo visual,
  - (ii) una molécula que inhibe el flujo de un retinoide en el ojo,
  - (iii) antioxidantes oftálmicos;
  - (iv) minerales,

20 (v) fosfolípidos con carga negativa,

  - (vi) carotenoides,
  - (vii) aditivos seleccionados del grupo que consiste en zinc, vitamina E, vitamina D, y combinaciones de los anteriores; y combinaciones de los anteriores.
14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 13, en donde:
- 25 (i) el antagonista del ciclo visual se selecciona el grupo que consiste en TDH, TDT, ácido 13-*cis*-retinoico, ret-NH<sub>2</sub>, y combinaciones de los anteriores;
- (ii) la molécula que inhibe el flujo de un retinoide en el ojo es fenretinida,
- (iii) los antioxidantes oftálmicos se seleccionan del grupo que consiste en vitamina C, vitamina E, beta-caroteno y otros carotenoides, coenzima Q, OT-551, 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-óxido, hidroxitolueno butilado,
- 30 resveratrol, un análogo de trolox (PNU-83836-E), extracto de bilberry, y combinaciones de los anteriores.
- (iv) los minerales se seleccionan del grupo que consiste en óxido cúprico, óxido de zinc; compuestos que contienen selenio, y combinaciones de los anteriores,
- (v) los fosfolípidos con carga negativa se seleccionan del grupo que consiste en cardiollipina, fosfatidilglicero, y combinaciones de los anteriores, y
- 35 (vi) los carotenoides se seleccionan del grupo que consiste en zeaxantina, luteína y combinaciones de los anteriores.
15. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, en donde el compuesto está presente en la composición a un nivel suficiente para administrar una cantidad de aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 90 mg/día a un paciente.
- 40 16. Una forma de dosificación unitaria que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones que anteceden.
17. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, que es un suplemento vitamínico o una composición farmacéutica.
- 45 18. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones que anteceden en la forma de una composición farmacéutica para ingestión oral, o como ungüento o gota para administración local a los ojos, o para administración parenteral u otra, en cualquier forma apropiada tales como intraperitoneal, subcutánea, tópica,

intradérmica, inhalación, intrapulmonar, rectal, vaginal, sublingual, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratecal, o intralinfática.

- 5 19. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones que anteceden para usar en el tratamiento de degeneraciones maculares y retinianas o distrofias, tales como Stargardt, Vitelliform o Best (VMD), Distrofia del Fondo de Sorsby, Degeneración Macular Relacionada con el Proceso de Envejecimiento.

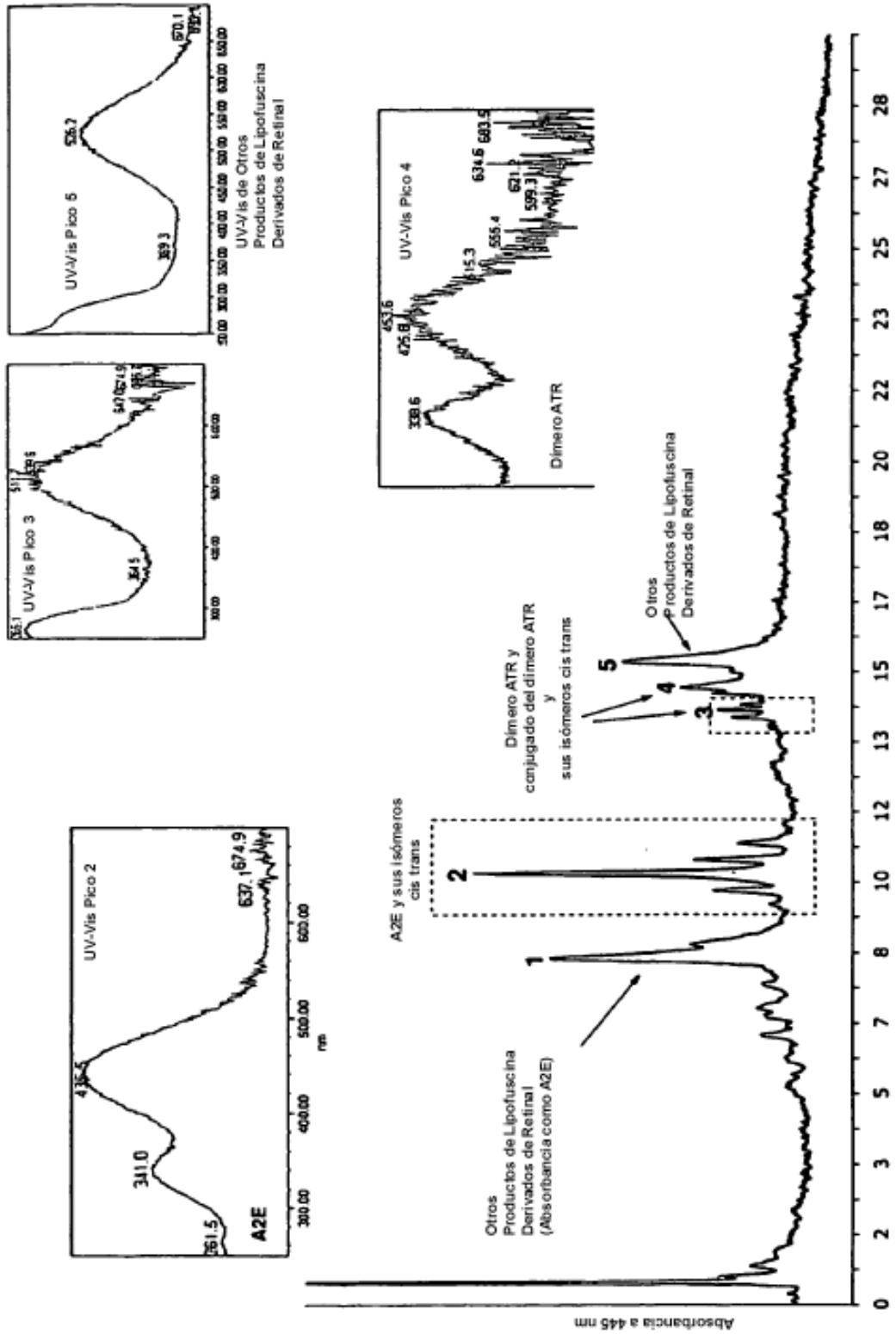


FIG 1.

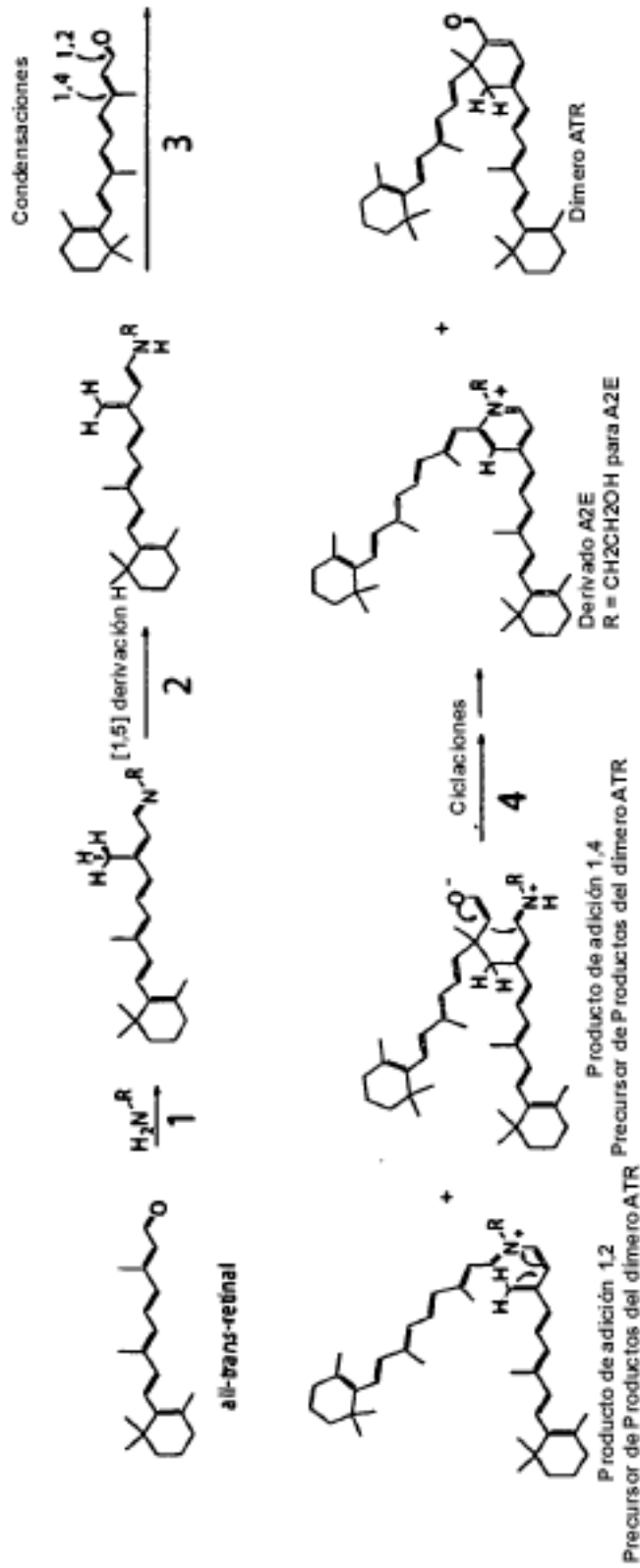


FIG 2.

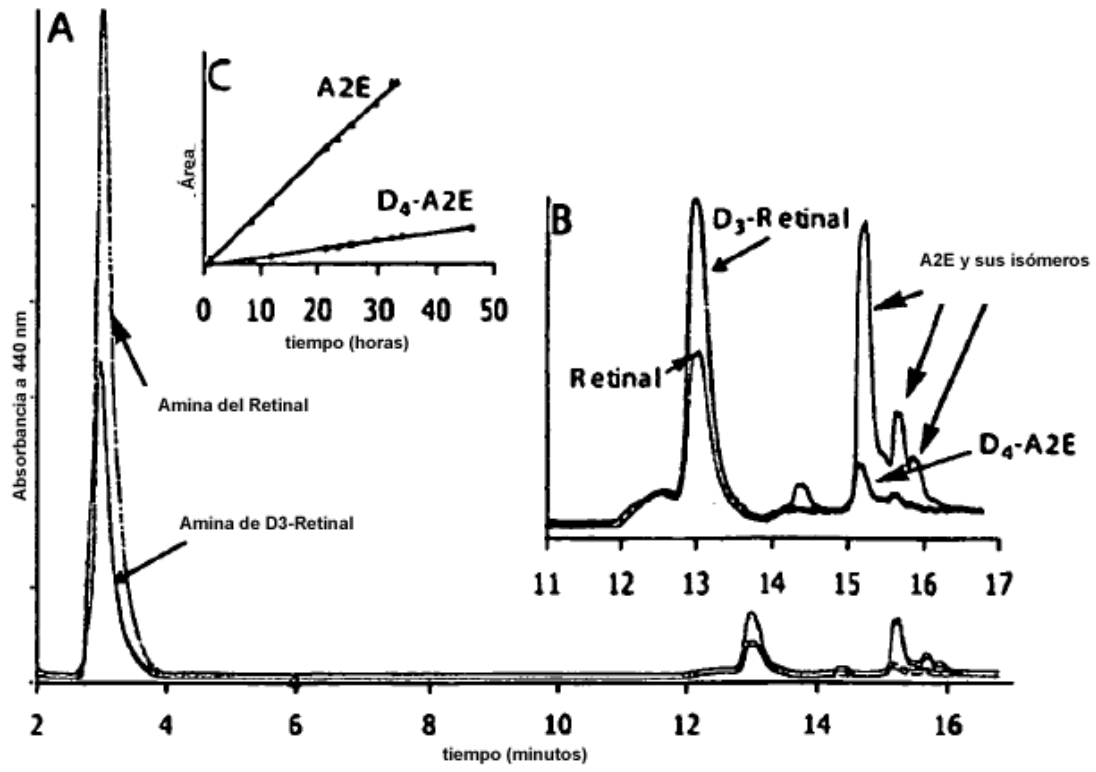
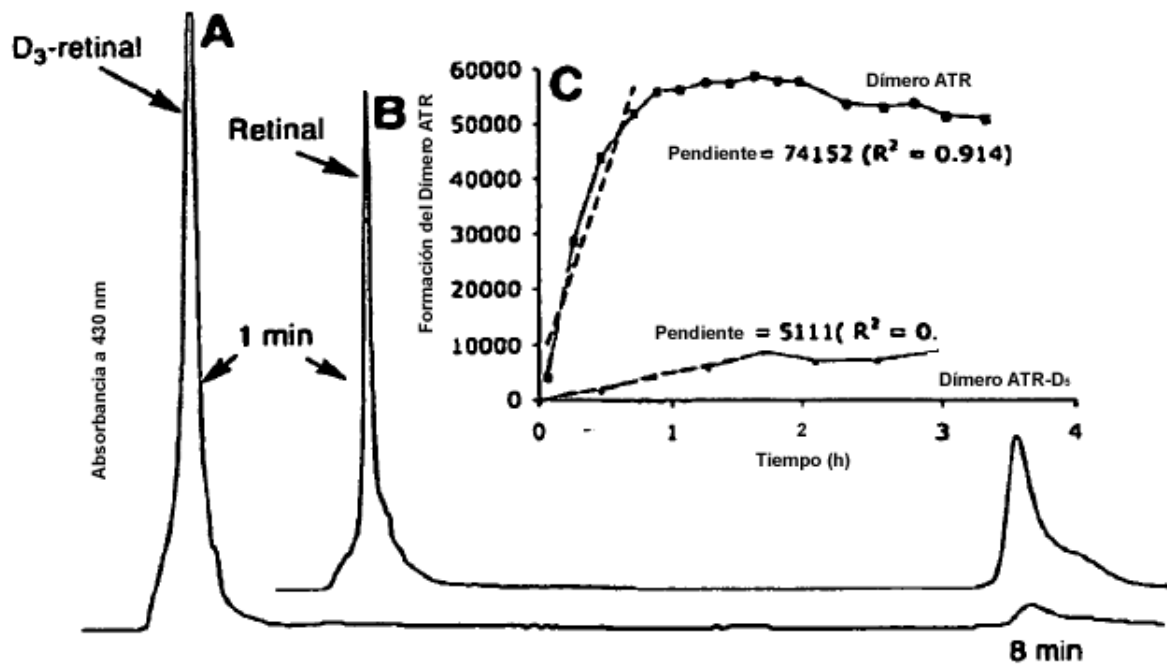


FIG 3.





**FIG 4.**

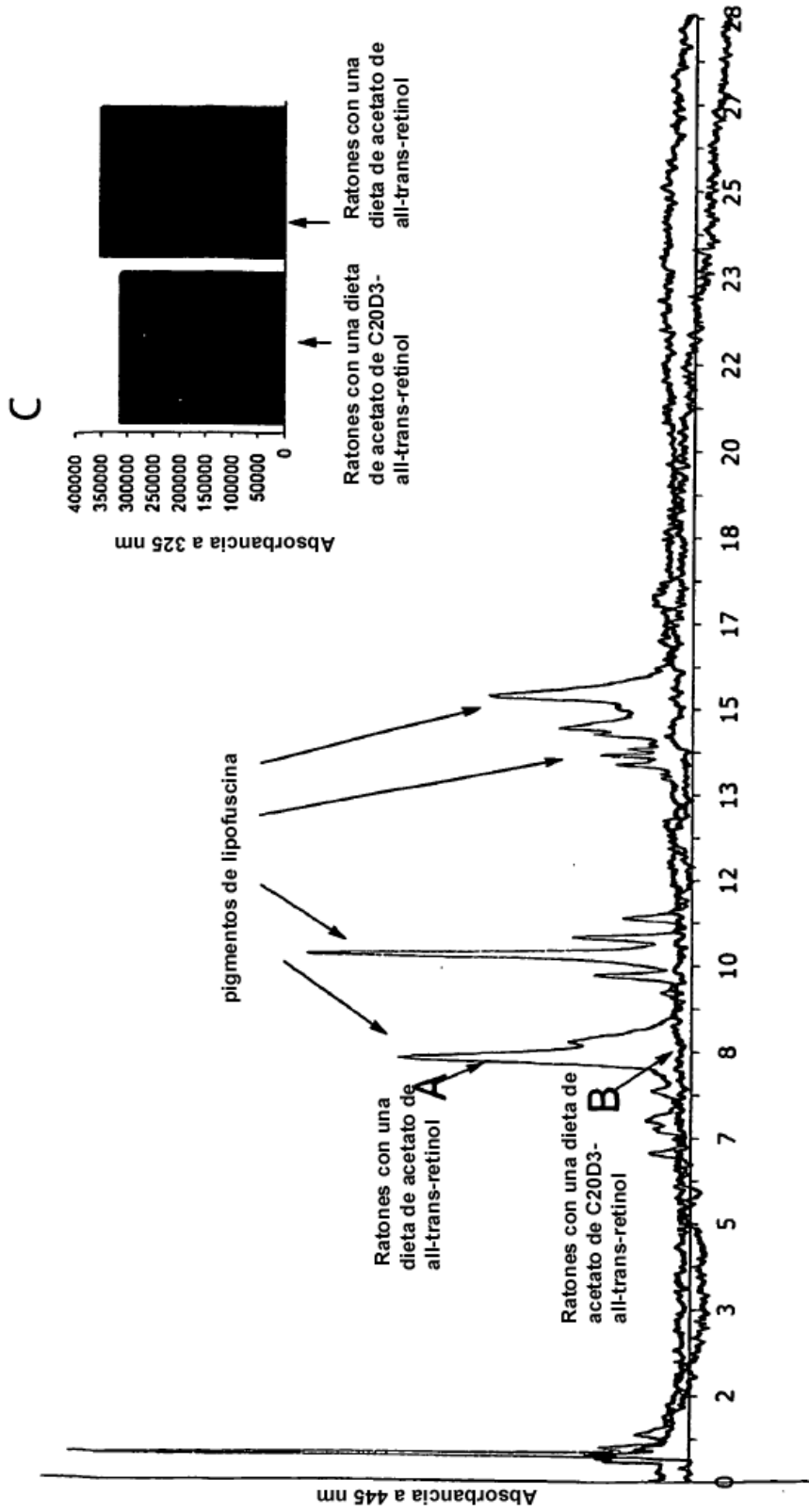


FIG 5.

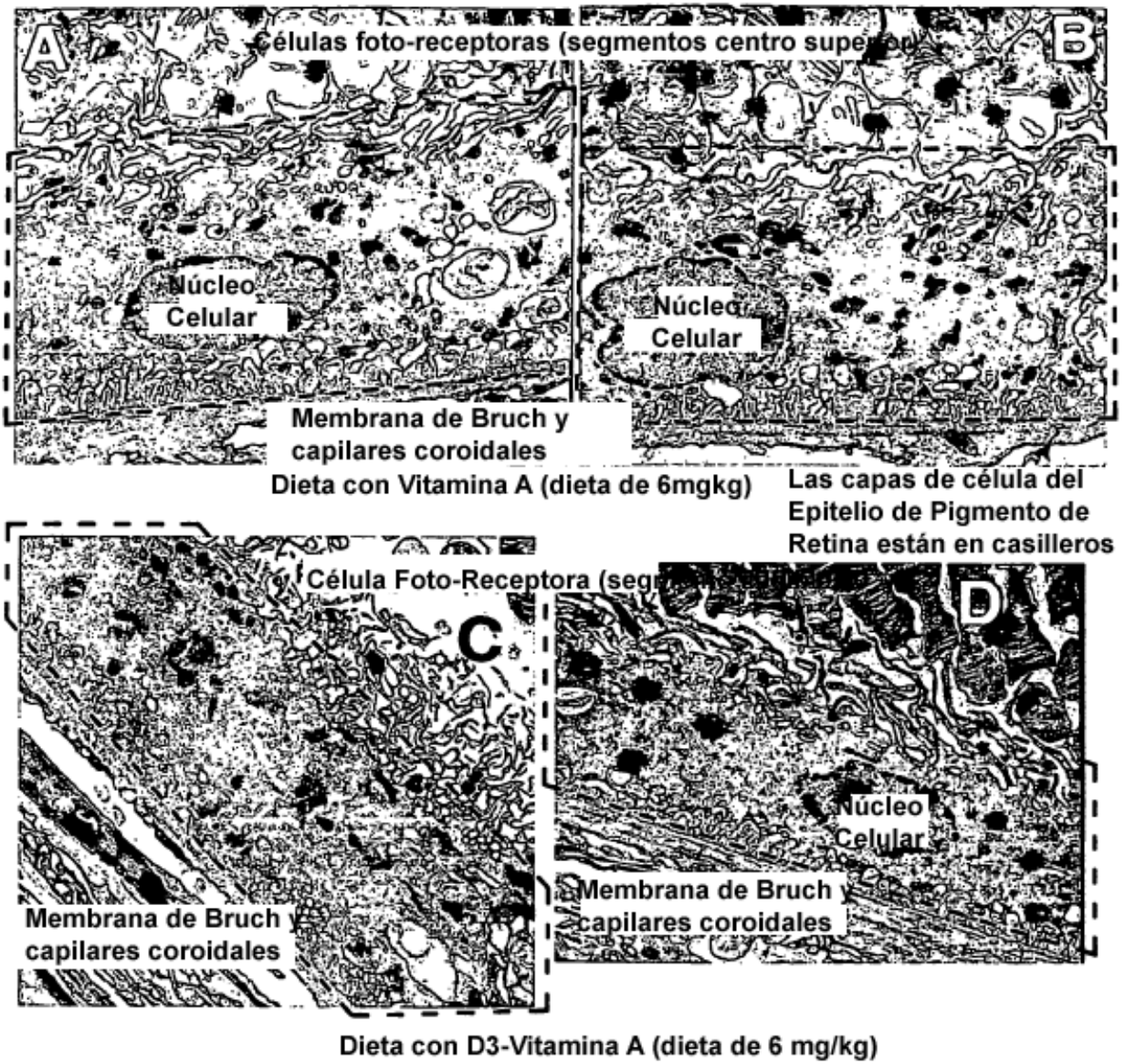


FIG 6.

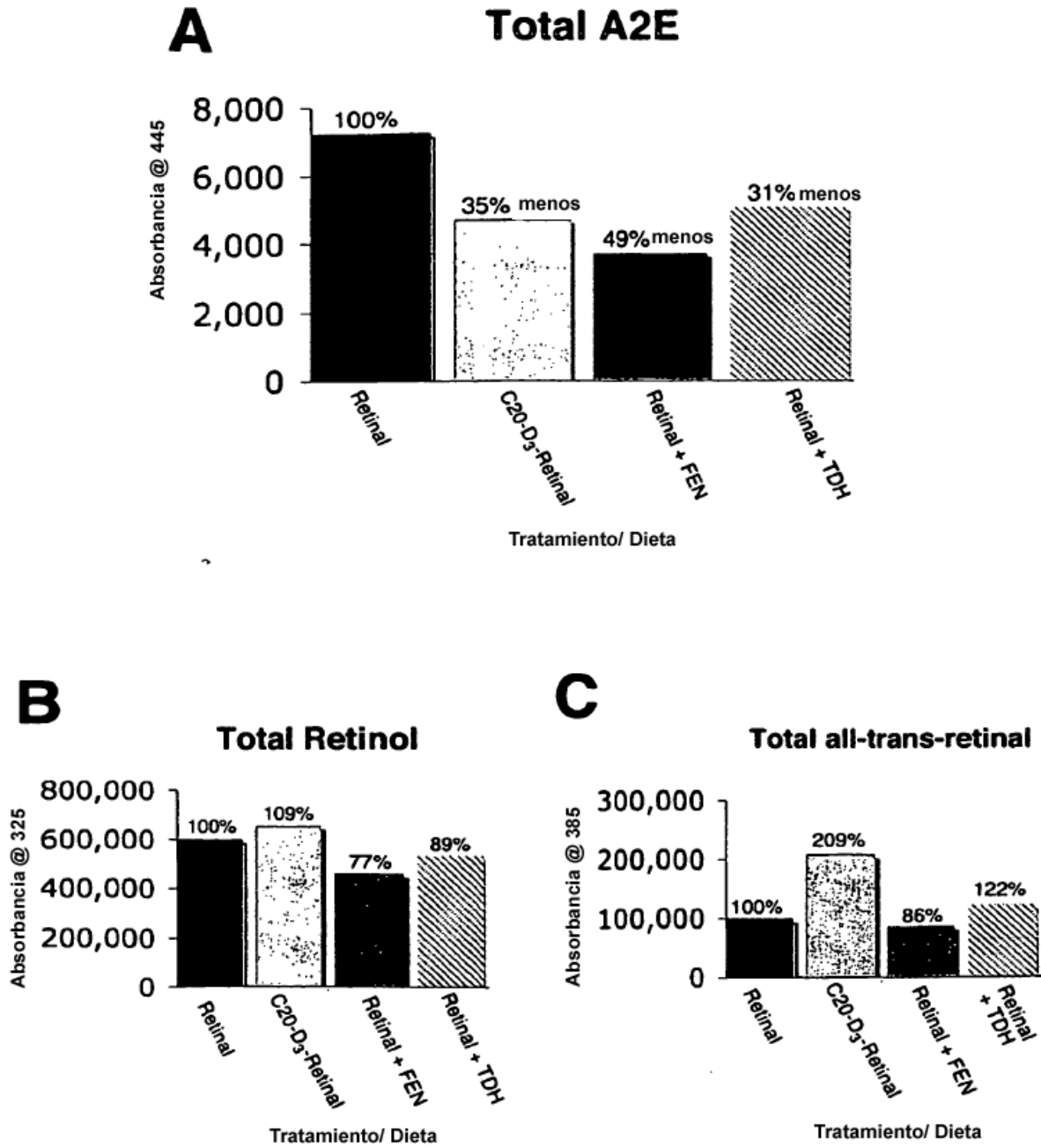


FIG. 7.