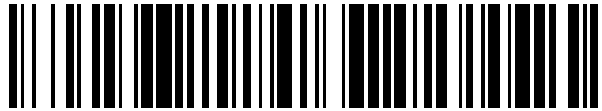


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 481 765**

51 Int. Cl.:

A61K 31/201 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2010 E 10708491 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2400958**

54 Título: **Inhibidores de la serina palmitoiltransferasa para prevenir y retardar la retinitis pigmentosa**

30 Prioridad:

26.02.2009 IT MI20090284

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

31.07.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO (20.0%)
Via Festa del Perdono, 7
20122 Milano , IT;
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
(20.0%);
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA (20.0%);
NANOVECTOR S.R.L. (20.0%) y
NTC S.R.L. (20.0%)**

72 Inventor/es:

**GHIDONI, RICCARDO;
STRETTOI, ENRICA;
GARGINI, MARIA, CLAUDIA y
GASCO, PAOLO**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 481 765 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la serina palmitoiltransferasa para prevenir y retardar la retinitis pigmentosa

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere al uso del inhibidor de serina palmitoiltransferasa miriocina para prevenir y retardar la degeneración hereditaria de la retina, en donde la degeneración hereditaria de la retina es retinitis pigmentosa, y a las composiciones, en particular sobre la base de nanoesferas lipídicas, que contienen miriocina.

10 Estado de la técnica

El término retinitis pigmentosa (RP) comprende un grupo de trastornos hereditarios que implican la degeneración progresiva de las retinas de ambos ojos. Los individuos afectados sufren una pérdida gradual de la visión nocturna y una reducción del campo visual periférico (conocido como "visión de túnel"), y además con el tiempo la visión central se puede perder y la enfermedad puede progresar hasta hipovisión y ceguera. Otra característica típica es el aumento de la sensibilidad al deslumbramiento, en otras palabras la adaptación con retardo en el cambio de la luz a la oscuridad y viceversa. El trastorno puede afectar a los fotorreceptores (los conos y predominantemente los bastones, responsables de la visión periférica) o al epitelio pigmentario de la retina, con un depósito característico de pigmento, al que se debe el nombre de la enfermedad.

La retinitis pigmentosa afecta aproximadamente a una persona de 4000, se encuentra en todo el mundo y actualmente es incurable. Por lo menos 15,000 personas en Italia se afectan, se les reduce la visión, sin un tratamiento efectivo, con un impacto económico y social evidente. Al menos 150,000 personas en la UE sufren de este trastorno incurable. Ya que la enfermedad es hereditaria pero no afecta a la capacidad reproductiva, su incidencia tiende a aumentar debido al aumento de la esperanza de vida en los países industrializados.

Hodge WG, y otros (Can J Ophthalmol. 2006 Ago;41(4):481-90) describen el uso potencial de los ácidos grasos omega-3 para tratar trastornos de la retina y de las lentes, y en particular para prevenir o retardar la progresión de la retinitis pigmentosa. Sin embargo, los autores enfatizan que los ensayos clínicos se encuentran en la etapa preliminar.

Se ha propuesto el uso de algunos factores neurotróficos, sin embargo todavía están en la etapa experimental y se limitan por el hecho de que estas sustancias tienen una estructura proteica, un peso molecular alto y no penetran libremente las células. En particular, Thanos C., Emerich D. (Expert Opin Biol Ther. 2005 Nov;5(11):1443-52) describen la liberación controlada de factores neurotróficos tales como CNTF, BDNF, GDNF, LEDGF, PEDF y otros para el tratamiento de trastornos de la retina tales como la retinitis pigmentosa, la degeneración macular, el glaucoma y los similares.

De acuerdo con algunos autores, el tratamiento oral con antioxidantes, como el ácido docosahexaenoico (ADH), o con suplementos dietéticos, tales como el palmitato de vitamina A, retarda la degeneración secundaria de los conos de la retina. Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos es aún controversial entre la comunidad científica. Berson EL. (Int Ophthalmol Clin. 2000 Fall;40(4):93-111) describe un intento para tratar trastornos degenerativos de la retina que afectan a los fotorreceptores con enfoques nutricionales, tales como los suplementos con Vitaminas A, E, K y B6, dietas bajas en proteínas, y similares.

El tratamiento hiperbárico no es particularmente efectivo, aunque en algunos estudios se observó una respuesta de células positiva, que se demostró instrumentalmente con un electroretinograma (ERG), el cual mostró un aumento estadísticamente significativo en amplitud en los pacientes que se tratan con oxígeno en una cámara hiperbárica.

50 Resumen de la invención

Se encontró ahora que la administración *in vivo* de cantidades no tóxicas de inhibidores de serina palmitoiltransferasa, la enzima que cataliza la primera etapa crítica de la biosíntesis de ceramida, es capaz de retardar el progreso del trastorno, es decir, de la retinitis pigmentosa, mediante la reducción de la velocidad de degeneración de los fotorreceptores, lo que prolonga su supervivencia y mejora sus actuaciones funcionales, y especialmente la ventana de tiempo de la visión residual.

Además se encontró que el uso de una formulación de nanoesferas de lípidos no sólo permite que las nanoesferas se carguen con el inhibidor de serina palmitoiltransferasa con lo que se obtienen dispersiones acuosas con concentraciones comparables con las utilizadas para inyecciones intraoculares, sino que además proporciona una alta concentración del compuesto en la retina, especialmente en la interfaz con el epitelio pigmentario de la retina, liberando el fármaco sin causar toxicidad.

65

Descripción de la invención

- 5 La presente invención se refiere al inhibidor de la serina palmitoiltransferasa (SPT) miriocina para su uso en la prevención y retardo de las degeneraciones hereditarias de la retina, es decir, la retinitis pigmentosa, y composiciones a base de nanoesferas lipídicas que contienen el inhibidor de SPT.
- Los ejemplos de inhibidores de serina palmitoiltransferasa incluyen miriocina y los compuestos que se especifican en las siguientes referencias bibliográficas.
- 10 Sasaki, S. y otros, J. Antibiot. 47: 420-33 (1994) describen micestericinas, compuestos que se correlacionan estructuralmente con la miriocina, como inhibidores de la SPT.
- VanMiddlesworth F., y otros., J. Antibiotics 45: 861-7 (1992) describen otra clase de inhibidores potentes de la SPT, las esfingofunginas.
- 15 Otros inhibidores de la SPT incluyen cicloserina, D-serina, viridiodfungina A y lipoxamicina.
- US 20080249274 describe métodos para el tratamiento de aterosclerosis a través de la administración de miriocina.
- 20 WO 2005092325 describe el uso de miriocina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de hipertrigliceridemia en mamíferos.
- WO 2008046071 describe compuestos con actividad moduladora de SPT para el tratamiento de resistencia a la insulina, trastornos cardiovasculares, síndrome metabólico y trastornos inflamatorios.
- 25 WO 2008083280 describe compuestos que actúan sobre la SPT, útiles para tratar la resistencia a la insulina, la apoptosis de las células beta pancreáticas, la obesidad, los trastornos cardiovasculares, las dislipidemias y el síndrome del X frágil.
- 30 WO 2004039351 describe composiciones farmacéuticas que contienen nanopartículas lipídicas que son adecuadas para su uso en el campo oftálmico.
- Acharia U. y otros, Science 299:1740-1743 (2003) describen que la modulación de la ruta de biosíntesis de los esfingolípidos rescata la degeneración de los fotorreceptores y demuestra que la SPT, la enzima limitante de la velocidad de la ruta de biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos, afecta a la degeneración de la retina que se observa en los mutantes de *Drosophila*. Los autores concluyen que estos resultados proporcionan una base sólida para explorar estrategias que manipulen enzimas de esfingolípidos para el manejo terapéutico de la degeneración de la retina en los organismos superiores.
- 35 Más particularmente, la presente invención se refiere a la miriocina para su uso en prevenir y retardar las degeneraciones hereditarias de la retina, es decir, la retinitis pigmentosa, y a composiciones basadas en nanoesferas lipídicas cargadas con miriocina.
- La miriocina es un compuesto natural, de origen fúngico, soluble en las membranas y capaz de penetrar en las células libremente, con una acción inhibitoria sobre la serina palmitoiltransferasa.
- 45 La administración de miriocina induce la inhibición de la síntesis *de novo* de la ceramida, un esfingolípido presente en los modelos murinos de RP.
- 50 Se conoce que la miriocina, administrada en la retina, es capaz de actuar directamente sobre las vías metabólicas de los fotorreceptores, inhibiendo selectivamente una vía metabólica que se activa durante la muerte de las células fotorreceptoras en el trastorno degenerativo hereditario de la retina, y así inhibe en parte la muerte de los fotorreceptores que se afectan por la RP.
- 55 Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la miriocina no tiene ningún efecto, tampoco desfavorable, sobre las células normales. por lo tanto, este compuesto puede usarse para retardar el proceso progresivo de la degeneración de las células fotosensibles de la retina en la retinitis pigmentosa, prolongando así la fase de visión útil en el sujeto que se afecta por ese trastorno. Dado que este es un trastorno de progresión lenta, un retardo, incluso un retardo parcial, implica una mejora considerable en el rendimiento visual del sujeto afectado, y por lo tanto mejora su calidad de vida.
- 60 Se conoce que la administración de miriocina *in vivo* a animales experimentales induce cambios selectivos entre los fotorreceptores de la retina, cuya supervivencia se prolonga, y se observa una disminución concomitante en la velocidad de degeneración de estas células.

Además, se observa un mayor rendimiento visual de la retina, cuando se mide con métodos electroretinográficos.

5 El tratamiento con miriocina inhibe el proceso activo de muerte de células de la retina, independientemente de la mutación que lo causa. Esto es una enorme ventaja del método que se usa, ya que las principales dificultades implicadas en el tratamiento de la RP son debido a su gran heterogeneidad genética.

Sección experimental

10 Los estudios que se diseñaron para investigar la eficacia de la miriocina en el tratamiento de la RP se condujeron en un modelo de ratón mutante rd10. Este ratón presenta una mutación con cambio de sentido en la subunidad beta del gen de la fosfodiesterasa específico de los bastones, e imita una forma de la RP autosómica recesiva humana. La muerte de los bastones comienza alrededor de los 12 días de vida (P12), y llega al máximo en P24, lo que se demuestra por el hecho de que un ERG (electroretinograma) que se generó por los bastones se puede grabar hasta 15 P25. En cuanto a la muerte de los conos de la retina, las respuestas se extinguen en P45.

La degeneración de los bastones presenta los rasgos característicos de la apoptosis.

20 Un enfoque multidisciplinario, que se basa en la bioquímica, la morfología y la electrofisiología, se usa para establecer la muerte de los fotorreceptores como el objetivo a través de la señalización de los esfingolípidos en el ratón mutante rd10, y se obtuvieron los siguientes resultados:

A. Niveles de ceramida endógena

25 Los niveles del esfingolípido ceramida endógena se comprobaron después del aislamiento de la retina a partir de ratones mutantes rd10 anestesiados y de tipo silvestre (ts) de diversos grupos de edad. Las retinas aisladas se trataron para la extracción de lípidos, y la relación ceramida endógena total/fosfato inorgánico se determinó con la prueba de la diacilglicerol quinasa. Se encontró que los niveles de ceramida endógenos aumentan en la retina de los ratones mutantes rd10 en el momento de la degeneración masiva de los fotorreceptores, y permanece 30 constantemente elevada en todas las edades analizadas. Por el contrario, los niveles de ceramida de la retina en los animales de control de tipo silvestre (ts) con el mismo fondo genético no cambiaron después de la madurez completa de la retina.

35 Estos resultados indican que la ceramida desempeña una función causal en el proceso de apoptosis que afecta a los fotorreceptores, lo que conduce a su muerte. Por lo tanto, las células de la retina residuales, que se conocen por degenerar progresivamente (por ejemplo, los conos, y las células bastones bipolares y horizontales) pueden por lo tanto morir como resultado de un proceso dependiente de la ceramida.

B. Reducción de los niveles endógenos de ceramida después del tratamiento con miriocina

40 Se administraron inyecciones intravítreas únicas de 500 nanolitros de miriocina (188 mM) en el ojo derecho de ratones rd10 y ts de edad P19. El vehículo solo (DMSO) se inyectó en el ojo izquierdo de los mismos animales. Las retinas izquierda y derecha se aislaron a P21, y se trataron separadamente para la prueba bioquímica de la ceramida como se explicó anteriormente. 45

En consecuencia se encontraron niveles de ceramida significativamente más bajos en los ojos de los ratones rd10 tratados con miriocina que en los ojos de control. Esta reducción en los niveles de ceramida se corresponde con una reducción marcada en el número de fotorreceptores picnóticos (moribundos) en los ratones mutantes rd10, como se demuestra por el siguiente método morfológico cuantitativo. 50

Por el contrario, la inyección de miriocina no redujo significativamente los niveles de ceramida de la retina en los ratones ts.

C. Conteo de fotorreceptores picnóticos

55 Los animales inyectados en P19 se colectaron en P21, y sus ojos fueron enucleados y fijados. Las retinas izquierda y derecha se aislaron, se tiñeron con moléculas fluorescentes de unión al ADN, y se montaron en los portaobjetos. Se observaron muestras de la capa nuclear externa que contiene los núcleos de los fotorreceptores bajo el microscopio confocal a intervalos regulares a lo largo de los cuatro meridianos de la retina. Las imágenes fueron 60 exportadas a una estación de trabajo computarizada, y los fotorreceptores picnóticos se contaron en cada campo escaneado. Se calculó el número total de los fotorreceptores picnóticos para cada par de retinas tratadas y de control.

65 Se encontró que la inyección miriocina reduce la velocidad de muerte de los fotorreceptores aprox. 50% (n=17 ratones rd10 usados, 34 ojos inyectados y contados). El número estimado de fotorreceptores picnóticos en las

retinas tratadas sólo con DMSO se mantuvo en el mismo intervalo que se observó anteriormente para las retinas de los ratones rd10 no tratados utilizados para otros estudios.

D. Observaciones histológicas

5 Desde el punto de vista histológico, se observó que los ratones rd10 y ts que se inyectaron con miriocina presentaron morfologías normales de la retina. Además, las retinas de los ratones con PVF (proteína verde fluorescente) en las células ganglionares (ratones Thy1-PVF), que se inyectaron como los otros, mostraron un excelente mantenimiento de la morfología de la célula ganglionar y de la estructura, y la estratificación de la retina era buena de conjunto.

E. Estudios de toxicidad

15 Los experimentos de control que se condujeron antes y durante los estudios que se ilustraron anteriormente demostraron que las inyecciones intraoculares de miriocina no causan efectos adversos en los ratones, ya sean rd10 o ts. Hay que señalar que la miriocina se usa raramente *in vivo* hasta la fecha, y nunca se inyecta por vía intraocular. La dosis se eligió sobre la base de la literatura disponible sobre las células cultivadas, calculando una dilución de 7/8 veces, debido al humor vítreo. Se seleccionó una ventana de tiempo para la administración intraocular que precedió al máximo de muerte de los fotorreceptores apoptóticos, por la razón fundamental de prevenir que la mayoría de los fotorreceptores entren en el ciclo apoptótico. Por último, los efectos tóxicos se excluyeron sobre la base del hecho de que no se observaron alguna vez síntomas de respuestas inflamatorias generales o locales (por ejemplo, la invasión por los macrófagos) o aumento de la reactividad ocular en los animales tratados.

F. Recuperación funcional de los fotorreceptores

25 La recuperación funcional de los fotorreceptores se estudió mediante la grabación de un electroretinograma de destello (ERG), una técnica ampliamente usada para comprobar la fisiología de la retina de pacientes humanos, especialmente aquellos que sufren de RP.

30 Dos grupos de ratones rd10 que se inyectaron por vía intraocular como se describe anteriormente no presentaron ninguna recuperación de la respuesta/reacción ERG en el ojo inyectado con miriocina en comparación con el otro ojo inyectado con el vehículo, lo que sugiere que la dosis de miriocina administrada con una única inyección era demasiado baja para producir cambios detectables en una reacción marcada de los fotorreceptores a la luz. Aún inyecciones intravítreas repetidas de miriocina no constituyen un protocolo adecuado para el pequeño tamaño de los ojos de los ratones (y los mismos ratones a aprox. P19): anestésicos generales repetidos e inyecciones intraoculares implican un alto riesgo de muerte de los animales y el desarrollo de cataratas respectivamente.

40 Se desarrolló un nuevo método no invasivo de administración miriocina, que se basa en el uso de nanoesferas lipídicas. Estas son partículas que consisten de lípidos con un diámetro medio de preferencia de entre 40 y 240 nanómetros, que se produce según EP 526666 y WO 2004039351. Como un resultado del uso de la formulación fue posible cargar las nanoesferas lipídicas con miriocina, con lo que se obtiene una dispersión acuosa a una concentración comparable con la utilizada para las inyecciones intraoculares.

45 Se evaluó primero la capacidad de las nanoesferas fluorescentes, cargadas de colorante fluorescente y no cargadas con el ingrediente activo (vacías), para alcanzar el interior del ojo. En la observación con el microscopio confocal se encontró que 24 horas después de la administración de estas nanoesferas a la superficie del ojo, las partículas fluorescentes estaban altamente concentradas en la retina, especialmente en la interfaz con el epitelio de pigmento.

50 Las nanoesferas lipídicas cargadas con miriocina a una concentración de 0.27 mg/ml se administraron a camadas de ratones mutantes rd10. Cuando sus ojos se abrieron (P 14), cada camada se dividió en dos grupos: el primer grupo recibió cada día nanoesferas cargadas con miriocina en forma de gotas para los ojos (750 nanolitros por ojo), y el segundo recibió nanoesferas descargadas (vacías), con la misma formulación química pero sin miriocina. Las grabaciones ERG que se tomaron para evaluar la posible recuperación funcional de los fotorreceptores comenzaron a P21 (la edad en que los ERG registrables son mejores en este mutante), y continuaron hasta P30. En los animales rd10 que no se trataron, las ERG que se indujeron por los bastones se extinguieron a esa edad. En los animales rd10 que se trataron con nanoesferas cargadas con miriocina, se observó en particular el efecto terapéutico del medicamento a P24 (máximo de muerte de los fotorreceptores) y en el intervalo P28-P30. A esta edad tardía, persistió una clara respuesta inducida por los conos en los animales tratados con miriocina, en comparación con el grupo de control.

60 La persistencia de las respuestas inducidas por los conos después de la hora de la extinción total del ERG en los ratones mutantes rd10 es un resultado muy importante. La visión residual de los pacientes humanos con RP se basa en los conos, que están inexorablemente destinados a morir después de la muerte de los bastones.

65 Después de grabaciones de ERG, los animales se enuclearon, sus ojos se fijaron y se seccionaron y se tiñeron las

secciones de la retina con colorantes nucleares fluorescentes para evaluar el grosor de la capa nuclear externa (CNE) y la morfología global de la retina.

Las secciones histológicas de las mismas retinas de las que se obtuvieron los ERGs se muestran en la Figura 1a.

Las respuestas ERG a destellos de luz de intensidades crecientes se obtuvieron de dos ratones rd10 de edad P24. Grandes trazos grises son respuestas de un ratón tratado con NL-MIR-S (Nanosferas de Lípidos de Miriocina-Sólidas), mientras que los trazos negros son de un animal control.

El número de filas nucleares conservadas en la CNE es significativamente mayor en los que se trataron con miriocina que en el ratón control.

Un análisis cuantitativo del número medio de filas de núcleos en la CNL de ratones que se trataron con NL-MIR-S y NLD-S (Nanosferas de Lípidos Descargadas- Sólidas) se da en la Figura 1b.

Se muestran los gráficos de las respuestas escotópicas del ERG que se obtuvieron de una cohorte de ratones rd10 de edad P21-P35. Los valores positivos indican las amplitudes de las ondas-b del ERG y los valores negativos indican la amplitud de las ondas-a. Los ratones que se trataron con NL-MIR-S (diagramas grises) muestran una mejor respuesta de ondas-a en la ventana de tiempo P27-P35 (*:p<0.05 prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney).

La Fig. 1c muestra secciones verticales de la retina de los dos ratones que se trataron con NLS de los que se grabaron en la izquierda los trazos del ERG. El número de filas de los fotorreceptores en los animales que se trataron con NL-MIR-S es mayor que en el control, lo que indica una mayor supervivencia.

En la Fig. 1d la prueba T-test muestra que el número de filas nucleares fotorreceptoras es mayor en las retinas tratadas con NL-MIR-S en el intervalo de tiempo P24-P30.

En consecuencia, la administración continua de miriocina en forma de nanoesferas lipídicas constituye una manera no invasiva de proteger a los fotorreceptores de la degeneración progresiva en la retinitis pigmentosa.

G. Discusión

Los resultados que se describen anteriormente demuestran que es posible reducir la velocidad de muerte por apoptosis de los fotorreceptores mediante la reducción de los niveles de ceramida de la retina a través de la inhibición de biosíntesis *de novo* de ceramida.

Los resultados que se obtuvieron demuestran por lo tanto que se puede mantener una reducción en la degeneración de los fotorreceptores después de la administración de miriocina. En consecuencia, el uso de la miriocina de acuerdo con la invención se puede considerar una estrategia terapéutica eficaz para ayudar a mantener los fotorreceptores (los cuales de otra manera están destinados a morir) viables por un período más largo de tiempo.

Esto es particularmente interesante en vista del hecho de que el fenotipo moderadamente agresivo y el mantenimiento de la arquitectura típica de la retina del ratón mutante rd10 identifica a los pacientes con mutaciones recesivas de la fosfodiesterasa como posibles candidatos para el tratamiento génico.

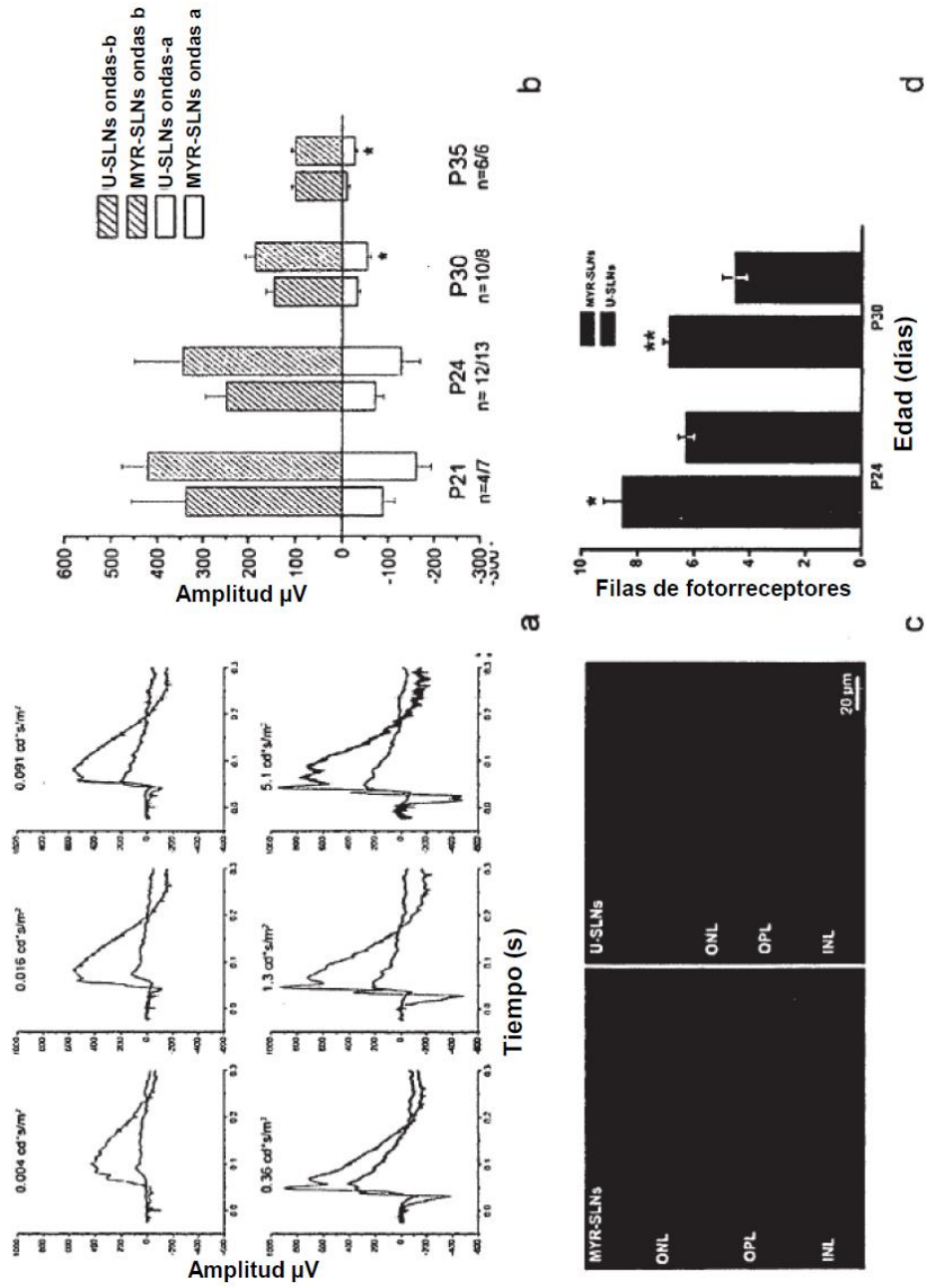
Se cree además generalmente que un pequeño aumento en la velocidad de supervivencia de los bastones puede conducir proporcionalmente a una viabilidad más larga de los conos.

Para los usos terapéuticos recomendados, las composiciones de acuerdo con la invención se pueden formular preferentemente, como se describe anteriormente, en forma de nanoesferas de lípidos para la administración ocular tópica, la cual constituye un aspecto de la presente invención. El método de preparación de dichas nanoesferas, como se indicó anteriormente, se describe en EP 526666 y WO 2004039351.

Las composiciones de acuerdo con la invención pueden formularse además en otras formas adecuadas para la administración ocular tópica, por ejemplo en la forma de gotas para los ojos o inyecciones para uso oftálmico, tales como intravítrea, subconjuntivales, inyecciones intracamerales o retrobulbares, posiblemente usando los excipientes adecuados, cuando lo permita, y se pueden preparar de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la tecnología farmacéutica, tales como los que se describen en "Remington's Pharmaceutical Handbook", Mack Publishing Co., N.Y., USA.

REIVINDICACIONES

1. Uso de la miriocina para la preparación de un medicamento para prevenir y retardar la degeneración hereditaria de la retina, en donde la degeneración hereditaria de la retina es la retinitis pigmentosa.
- 5 2. Uso como el que se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicho medicamento está en una forma farmacéutica adecuada para la administración oftálmica.
3. Uso como el que se reivindica en la reivindicación 2, en donde dicho medicamento está en forma de nanoesferas de lípidos.
- 10 4. Miriocina para usar en la prevención y retardo de la degeneración hereditaria de la retina, en donde la degeneración hereditaria de la retina es retinitis pigmentosa.
- 15 5. Composiciones en forma de nanoesferas de lípido cargadas con miriocina.



Figura