

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 791**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/436** (2006.01)

**A61K 31/445** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2003** **E 12004712 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014** **EP 2514420**

54 Título: **Uso de rapamicina para el tratamiento o prevención de la degeneración macular asociada a la edad**

30 Prioridad:

**18.09.2002 US 412088 P**

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

**16.09.2014**

73 Titular/es:

**TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF  
PENNSYLVANIA (100.0%)  
3160 Chestnut Street, Suite 200  
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**LATIES, ALAN;  
WEN, RONG y  
LOU, ZHIJUN**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 494 791 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

Uso de rapamicina para el tratamiento o prevención de la degeneración macular asociada a la edad.

5 **Campo técnico**

La presente descripción se refiere a composiciones y usos de las mismas para inhibir la angiogénesis no deseada, incluyendo la de los tejidos oculares. En particular, se proporcionan composiciones y usos de las mismas para el tratamiento de la neovascularización coroidea (NVC) en las enfermedades oculares. Aunque la invención se refiere a la rapamicina (sirolimus) "y un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para su administración al ojo o al tejido ocular para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) mediante un modo de administración tal como se define en las reivindicaciones, la descripción" proporciona el uso de la familia de compuestos de "limus" incluyendo tacrolimus, para inhibir la angiogénesis no deseada.

15 **Antecedentes de la invención**

La retina del ojo contiene los conos y bastones que detectan los colores. En el centro de la retina se encuentra la mácula lútea, que tiene aproximadamente de 1/3 a 1/2 cm de diámetro. La mácula proporciona la visión detallada, en particular en el centro (la fovea), debido a que los conos tienen la densidad más alta. Los vasos sanguíneos, células ganglionares, la capa nuclear interna y las células, y las capas plexiformes están desplazados todos hacia un lado (en lugar de reposar por encima de los conos), permitiendo de este modo a la luz un camino más directo a los conos.

Bajo la retina se encuentra la coroides, que comprende una colección de vasos sanguíneos incluidos dentro de un tejido fibroso, y el epitelio profundamente pigmentado, que se superpone a la capa de la coroides. Los vasos sanguíneos de la coroides proporcionan nutrición a la retina (en particular a sus células visuales).

Existe una variedad de trastornos de la retina, cuyo tratamiento actual no es óptimo. La retina puede desgarrarse, formar agujeros y separarse de la coroides subyacente.

La degeneración macular (DMAE) asociada a la edad es la principal causa de pérdida visual severa en los Estados Unidos para las personas mayores de 55. La DMAE se produce en forma ya sea atrófica o (menos comúnmente) exudativa. En la DMAE exudativa, los vasos sanguíneos crecen a partir de la coriocapilar a través de defectos en la membrana de Bruch, y en algunos casos el epitelio pigmentario de la retina subyacente (neovascularización coroidea o angiogénesis). La organización del exudado seroso o hemorrágico que escapan de estos vasos da como resultado la cicatrización fibrovascular de la región macular con degeneración concomitante de la neurorretina, desprendimiento y desgarro del epitelio pigmentario de la retina, hemorragia vítrea y pérdida permanente de la visión central. Este proceso es responsable de más del 80% de los casos de pérdida visual significativa en pacientes con DMAE.

Varios estudios han descrito recientemente el uso de la fotocoagulación con láser en el tratamiento de las lesiones neovasculares iniciales o recurrentes asociadas con la DMAE (Macular Photocoagulation Study Groups (1991) en Arch. Ophthalmol. 109: 1220; Arch. Ophthalmol. 109: 1232; Arch. Ophthalmol. 109: 1242). Desafortunadamente, los pacientes de DMAE con lesiones subfoveales sometidos a tratamiento con láser experimentaron una reducción más bien precipitada de la agudeza visual (media de 3 líneas) a los 3 meses de seguimiento. Por otra parte, a los dos años después del tratamiento los ojos tratados solo tenían una agudeza visual un poco mejor que sus homólogos no tratados (medias de 20/320 y 20/400, respectivamente). Otro inconveniente del procedimiento es que la visión después de la cirugía empeora inmediatamente.

Se ha demostrado que la neovascularización coroidea (NVC) es recalcitrante al tratamiento en la mayoría de los casos. El tratamiento con láser puede abolir la NVC y ayudar a preservar la visión en casos seleccionados que no impliquen el centro de la retina, pero esto se limita a solo 10% de los casos. No hay ningún otro tratamiento disponible para corregir la NVC. Desafortunadamente, incluso con la fotocoagulación con láser satisfactoria, la neovascularización se repite en aproximadamente 50-70% de los ojos (50% a lo largo de 3 años y >60% a los 5 años) (Macular Photocoagulation Study Group, Arch. Ophthalmol. 104: 694-701 (1986)). Además, muchos pacientes que desarrollan NVC no son buenos candidatos para la terapia con láser debido a que la NVC es demasiado grande para el tratamiento con láser, o no se puede determinar la localización de manera que el médico no puede enfocar con precisión el láser. Por lo tanto, hasta la presente invención, ha habido una necesidad durante mucho tiempo de métodos que prevengan o inhiban significativamente la neovascularización coroidea.

Además de la DMAE, la neovascularización coroidea es causada por trastornos de la retina tales como: síndrome de presunta histoplasmosis ocular, degeneración miópica, estrías angioides y trauma ocular. El deterioro angiogénico asociado con la neovascularización retiniana e intravítrea se produce en una amplia gama de trastornos, incluyendo

retinopatía diabética, oclusiones venosas, retinopatía de células falciformes, retinopatía del prematuro, desprendimiento de retina, isquemia ocular y trauma.

El documento US2002/0123505 A1 describe un dispositivo médico que contiene un análogo de rapamicina. El dispositivo médico comprende una estructura de soporte que tiene un recubrimiento que contiene una sustancia terapéutica.

Los compuestos poseen propiedades antiangiogénicas y se pueden utilizar, entre otras cosas, para el tratamiento de la degeneración macular senil.

## Descripción de la invención

La presente descripción proporciona composiciones y usos que son eficaces en la inhibición de la angiogénesis no deseada, específicamente de la neovascularización coroidea (NVC) que está asociada con las enfermedades oculares tales como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y el síndrome de histoplasmosis. Las composiciones de la descripción para inhibir la angiogénesis comprenden agentes activos de la familia de compuestos "limus", que se unen a miembros de la familia de inmunofilina de proteínas celulares, incluyendo ciclofilinas y proteínas de unión a FK506 (FKBP), para inhibir la angiogénesis en las membranas de la coroides. Los miembros de la familia de compuestos "limus" incluyen sirolimus (rapamicina) y su análogo soluble en agua SDZ-RAD, tacrolimus, everolimus, pimecrolimus, CCI-779 (Wyeth), AP23841 (Ariad), y ABT-578 (Abbott Laboratories) así como análogos y derivados de los mismos.

Se puede administrar una cantidad terapéutica de los agentes activos de la descripción a un paciente por medio de una variedad de rutas diferentes y se puede administrar en dosis que son seguras y proporcionan inhibición angiogénica en sitios internos. La presente descripción proporciona de este modo el tratamiento de enfermedades de mamíferos caracterizadas por angiogénesis no deseada e incontrolada mediante la administración de una composición que comprende uno o más agentes activos de la descripción. En un aspecto particular de la descripción, se proporcionan métodos para inhibir o tratar la neovascularización coroidea (NVC) del ojo.

Por lo tanto, la presente invención es especialmente útil para el tratamiento de ciertas enfermedades neovasculares oculares seleccionadas entre la degeneración macular, que es la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). La invención es particularmente útil en el tratamiento o la inhibición de la forma húmeda de DMAE en donde los vasos sanguíneos crecen desde su ubicación normal en la coroides a una posición indeseable debajo de la retina. El derrame y sangrado de estos nuevos vasos sanguíneos da como resultado la pérdida de visión y posiblemente ceguera. La invención proporciona también la inhibición de la transición de la forma seca de la DMAE (en donde el epitelio pigmentario de la retina o EPR degenera y conduce a la muerte de las células fotorreceptoras y la formación de depósitos de color amarillos denominados drusen debajo de la retina) a la forma húmeda de la DMAE. La invención por lo tanto proporciona también el tratamiento de la forma seca de la DMAE.

Los compuestos que se contemplan para uso en la presente invención se administran al paciente para detener la progresión de la enfermedad y permitir las reducciones en, o la regresión de, la neovascularización. Otras enfermedades que se pueden tratar utilizando la presente descripción incluyen la retinopatía diabética, el glaucoma neovascular y la fibroplasia retrolental.

Por consiguiente, y en un primer aspecto, la descripción proporciona compuestos, composiciones, kits y usos de los mismos para inhibir la angiogénesis no deseada, así como la neovascularización en la retina de un ser humano o animal. En un segundo aspecto, la descripción proporciona un tratamiento para enfermedades mediadas por angiogénesis o neovascularización coroidea en un sujeto. En un aspecto adicional, la descripción proporciona métodos para prevenir, inhibir o tratar la forma húmeda de la DMAE, incluyendo la inhibición de la pérdida de la visión asociada con la misma.

Otro aspecto de la descripción consiste en el uso de los métodos descritos anteriormente combinados con otros métodos conocidos para el tratamiento de la angiogénesis, la neovascularización, y la forma húmeda de la DMAE, así como en la reducción de la pérdida de agudeza visual asociada con la misma. Además, la descripción proporciona métodos para la visualización de los vasos sanguíneos mediante el uso de colorantes lipófilos en un organismo, así como un modelo animal de neovascularización coroidea que puede ser aplicado como análisis de identificación rápida de compuestos anti-angiogénicos, anti-neovascularización, y anti-DMAE adicionales.

Las ventajas y características novedosas de la invención se expondrán en parte en la descripción, los ejemplos y las figuras que siguen, todos los cuales se pretende que tengan solo fines ilustrativos.

## Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una reconstrucción tridimensional de los vasos sanguíneos de la retina. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

La Figura 2 muestra la NVC en el tejido de un ojo al que se ha inyectado Matrigel. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

La Figura 3 muestra la inhibición de la formación de NVC por rapamicina. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

#### Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

La presente invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de rapamicina y un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para administración al ojo o al tejido ocular para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la DMAE, en donde el medicamento se administra mediante un modo de administración seleccionado del grupo que consiste de la inyección intraocular, inyección subretiniana, inyección subescleral, inyección intracoroidea, e inyección subconjuntival.

Además, la presente invención proporciona una composición de rapamicina para su uso en el tratamiento de la DMAE, comprendiendo dicha composición de rapamicina una cantidad eficaz de rapamicina y un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para administración al ojo o al tejido ocular, en donde la composición se administra mediante un modo de administración seleccionado del grupo que consiste de la inyección intraocular, inyección subretiniana, inyección subescleral, inyección intracoroidea, e inyección subconjuntival.

La descripción proporciona métodos para el tratamiento de trastornos que implican angiogénesis y neovascularización, incluyendo trastornos oftálmicos, y, en particular trastornos de la retina que implican degeneración macular y, neovascularización coroidea en la retina o entre la retina y su tejido coroideo subyacente, o que implican tejido coroideo, como se ha descrito anteriormente. La invención comprende un nuevo uso para el inmunosupresor, rapamicina, que también es conocida como la lactona macrocíclica sirolimus (asequible comercialmente como Rapamune<sup>®</sup>, Wyeth-Ayerst) (Véase, Physician's Desk Reference, 55<sup>a</sup> edición). De acuerdo con Merck Index, 12<sup>a</sup> Edición, Rapamune también es conocido como RAPA, RPM, sirolimus, AY22989, y NSC-226080.

Aunque Sirolimus es conocido como inmunosupresor, se ha informado que un compuesto anti-angiogénico en el contexto de tumores primarios y metastásicos (Guba et al, Nature Medicine 18(2):128-135 (Feb. 2002) y Guba et al., Chir. Forum Exp.Klin. Forsch. Band 30, páginas 37-39 (2001)). En esos estudios, no hay ninguna discusión referente a otros tipos de neovascularización, tales como la neovascularización coroidea. En lugar de ello, hay una discusión de la participación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y los niveles en suero del mismo. El VEGF es un factor implicado en numerosas indicaciones sin certidumbre de que las terapias dirigidas al mismo sean eficaces en el tratamiento de dichas indicaciones. Por ejemplo, se ha sugerido que el VEGF está implicado en la formación de nuevos vasos patogénicos en la DMAE, aunque la actividad del VEGF nunca se ha sometido a ensayo en un modelo animal con respecto a la DMAE. Por lo tanto, la capacidad para tratar la DMAE eligiendo como diana la actividad de VEGF sigue siendo experimental.

Además de la utilización de sirolimus, la descripción proporciona el uso de otros compuestos de unión a inmunofilinas así como derivados y análogos de rapamicina para tratar la angiogénesis y la neovascularización. Los ejemplos de tales compuestos incluyen SDZ-RAD, tacrolimus, everolimus, pimecrolimus, CCI-779 (Wyeth), AP23841 (Ariad), y ABT-578 (Abbott Laboratories), así como los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.527.907; 6.376.517; y 6.329.386. Los derivados adicionales incluyen los descritos en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2002/0123505.

La descripción también proporciona el uso de los agentes anteriores combinados con otros agentes y terapias para el tratamiento de la angiogénesis o la neovascularización, particularmente NVC. Los ejemplos de tales agentes y terapias adicionales incluyen pirrolidina, ditiocarbamato (inhibidor de NFkB); escualamina; análogo de TPN 470 y fumagilina; inhibidores de PKC (proteína quinasa C); inhibidores de quinasas Tie-1 y Tie-2; inhibidores de quinasas de los receptores de VEGF; inhibidores proteosómicos tales como Velcade<sup>™</sup> (bortezomib, para inyección; ranibuzumab (Lucentis<sup>™</sup>) y otros anticuerpos dirigidos a la misma diana; pegaptanib (Macugen<sup>™</sup>); antagonistas del receptor de vitronectina, tales como antagonistas de péptidos cíclicos de integrinas de tipo receptor de vitronectina; antagonistas de integrinas  $\alpha$ -v/ $\beta$ -3; antagonistas de integrinas  $\alpha$ -v/ $\beta$ -1; tiazolidinodionas, tales como rosiglitazona o troglitazona; interferón, incluyendo  $\gamma$ -interferón o interferón dirigido a NVC mediante el uso de dextrano y coordinación de metal; factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF); endostatina; angiostatina; acetato de anecortave; acetónido; triamcinolona; tetratiomolibdato; silenciamiento de ARN o ARN de interferencia (RNAi) de factores angiogénicos, incluyendo ribozimas que dirigen la expresión del VEGF; Accutane<sup>™</sup> (ácido13-*cis* retinoico); inhibidores de la ECA como quinopril o perindozril; inhibidores de mTOR (diana de mamíferos de rapamicina); 3-aminotalidomida; pentoxifilina; 2-metoxiestradiol; colchicinas; AMG-1470; inhibidores de ciclooxigenasa tales como nepafenac, rofecoxib, diclofenaco y; modulador de ARNt sintasa; inhibidor de metaloproteasa 13; inhibidor de acetilcolinesterasa; bloqueadores de los canales de potasio; endorrepelina; análogo de purina de 6-tioguanina; peróxido cíclico ANO-2; arginina desiminasa (recombinante); epigallocatequina-3-galato; cerivastatina; análogos de

suramina; Moléculas trampa de VEGF; Visudyne™ y otros fotosensibilizadores con terapia fotodinámica (PDT); y fotocoagulación con láser.

"La degeneración macular" se caracteriza por la acumulación excesiva de depósitos fibrovasculares en o debajo de la mácula y la retina y la atrofia y/o desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina (EPR). La administración de rapamicina parece limitar la angiogénesis excesiva, tal como la neovascularización coroidea en la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), que puede ocurrir sin dicho tratamiento. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "angiogénesis" significa la generación de nuevos vasos sanguíneos ("neovascularización") en un tejido u órgano. Una "enfermedad o afección mediada por angiogénesis" del ojo o de la retina es aquella en la que se generan nuevos vasos sanguíneos de una manera patógena en el ojo o de la retina, dando como resultado la pérdida de la visión u otro problema, p. ej., neovascularización coroidea asociada a la DMAE.

Los métodos de la descripción incluyen una realización preferida en la que se utiliza rapamicina y/u otros agentes activos *in vitro* o *in vivo*. Cuando se administra *in vitro*, se utiliza el método, por ejemplo, para detectar o analizar los efectos de los agentes activos candidatos adicionales para la actividad de control o reducción de la neovascularización o angiogénesis en el tejido o las células de la retina o la coroides. Esto se puede utilizar como un análisis útil para los agentes anti-angiogénesis o NVC. Cuando se administra *in vivo* el compuesto se utiliza, por ejemplo, para tratar a un paciente que tiene una predisposición a desarrollar la neovascularización coroidea observada típicamente en la DMAE, o para prevenir o inhibir la neovascularización coroidea en tal paciente, o para reducir la neovascularización coroidea en un paciente de DMAE. Prevenir, inhibir y reducir reciben sus significados ordinarios en relación con el efecto de los agentes activos de la invención sobre la neovascularización coroidea. Un paciente que tiene una predisposición o la necesidad de la prevención puede ser identificado por el médico experto en la técnica mediante métodos y criterios establecidos en la materia. El médico experto en la técnica también puede diagnosticar fácilmente las personas que necesitan inhibición o tratamiento en base a los criterios establecidos en la materia para la identificación de la angiogénesis y/o neovascularización no deseadas.

Una cantidad eficaz del fármaco es la cantidad que proporciona el efecto terapéutico buscado, p. ej., una dosis terapéuticamente eficaz de rapamicina o fármaco equivalente sería la cantidad que reduce la neovascularización coroidea en un paciente de DMAE, o que inhibe o previene completamente la neovascularización coroidea en un paciente predispuesto a la DMAE o que, incluso sin predisposición, muestra los primeros signos de DMAE. Por lo tanto, la dosis terapéuticamente eficaz puede no ser la misma en todos los pacientes tratados con rapamicina. Una cantidad eficaz también se refiere a la cantidad de fármaco que inhibe la angiogénesis o la neovascularización en un modelo o análisis para ello, tal como el descrito por medio de la presente invención.

"Paciente" se refiere preferiblemente a un sujeto que tiene, o que puede desarrollar, neovascularización coroidea asociada con la DMAE exudativa a menos que se trate mediante los métodos preferidos de la presente invención. Tal paciente es preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, aunque los presentes usos son también aplicables a animales de experimentación modelo y sujetos animales veterinarios.

Un agente activo de la descripción, tal como rapamicina, se administra preferiblemente por vía oral, intravenosa, tópica, intraocular, intramuscular, local o en un dispositivo ocular. Para la rapamicina el modo de administración se selecciona entre los siguientes: inyección intraocular, inyección subretiniana, inyección subescleral, inyección intracoroidea e inyección subconjuntival. Más preferiblemente, el agente activo se administra directamente a la zona de la retina mediante inyección subretiniana, aunque se pueden desarrollar modos de administración menos invasivos que son igual de eficaces. Las formulaciones para la liberación controlada o la liberación retardada a lo largo del tiempo también son proporcionadas por la presente descripción.

La dosificación del agente activo dependerá de la afección que se vaya a tratar, el agente concreto, y otros factores clínicos tales como el peso y el estado del ser humano o animal y la ruta de administración del agente. Se debe entenderse que la presente invención tiene aplicación tanto para uso humano como veterinario. Para la administración a seres humanos, una dosificación eficaz es aquella que inhibe la neovascularización coroidea. En el caso de la rapamicina, una cantidad inhibidora que se puede emplear oscila generalmente entre aproximadamente 0,1 y 300 mg/kg/día, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y 50 mg/kg/día, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 1 y 10 mg/kg/día. Las dosificaciones de los diversos agentes de la invención para el tratamiento de diversas afecciones se pueden refinar mediante el uso de los ensayos clínicos de la presente invención. Adicionalmente, los intervalos de dosificación para la práctica de la invención incluyen los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.376.517 y 5.387.589.

El agente activo de la invención, rapamicina, puede ser sometido a operaciones farmacéuticas convencionales, tales como esterilización y/o puede contener coadyuvantes convencionales, tales como conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, etc. Los agentes también se pueden formular con excipientes farmacéuticamente aceptables para uso clínico para producir una composición farmacéutica. Las formulaciones de la presente descripción adecuadas para la administración oral pueden presentarse en forma de unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente

activo; en forma de polvo o gránulos; en forma de una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite y en forma de un bolo, etc. Dicho de otra manera, los agentes activos de la descripción se pueden utilizar para preparar un medicamento para el tratamiento de cualquiera de las afecciones descritas en el presente documento.

Para su administración, un agente activo tal como la rapamicina se puede combinar con uno o más coadyuvantes apropiados para la ruta de administración indicada. El agente activo se puede mezclar con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de los ácidos fosfórico y sulfúrico, acacia, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, y/o poli(alcohol vinílico), y comprimirse o encapsularse para la administración convencional. Alternativamente, los compuestos de esta descripción se pueden disolver en polietilenglicol, propilenglicol, disoluciones coloidales de carboximetilcelulosa, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma de tragacanto, y/o diversos tampones. Otros adyuvantes y modos de administración son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se pueden utilizar en la práctica de la descripción. El vehículo o diluyente puede incluir una sustancia de retardo temporal, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera, u otras sustancias bien conocidas en la técnica.

Las formulaciones de la invención incluyen aquellas adecuadas para administración oral, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral), nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratraqueal, y epidural). Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por medio de técnicas farmacéuticas convencionales. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación el ingrediente activo y el vehículo o vehículos o excipiente o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, si fuera necesario, conformando el producto.

En otro aspecto de la descripción se proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende: una cantidad terapéuticamente eficaz del agente activo de la invención, la rapamicina, y un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para su administración al ojo o al tejido ocular.

Además, se proporciona un kit, que comprende al menos un vial que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del agente activo de la invención, la rapamicina, y un segundo vial que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración al ojo o al tejido ocular. Otros kits de la descripción comprenden componentes tales como el agente activo de la invención para su uso en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria, en donde también se incluyen recipientes, cada uno con uno o más de los diversos reactivos (típicamente en forma concentrada) utilizados en los métodos, incluyendo, por ejemplo, tampones y otros reactivos según sea necesario. También se incluirán típicamente una etiqueta o indicador que describen, o un conjunto de instrucciones para el uso de, los componentes del kit en un método de la presente invención, en donde las instrucciones pueden estar asociadas a un prospecto y/o al embalaje del kit o los componentes del mismo.

Las enfermedades asociadas con la neovascularización retiniana/coroidea que se pueden tratar de acuerdo con la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, retinopatía diabética, degeneración macular, retinopatía del prematuro, infecciones que causan una retinitis o coroiditis, presunta histoplasmosis ocular, degeneración miópica, estrías angioides, trauma ocular, y DMAE. Otros ejemplos de enfermedades y afecciones no deseadas que se pueden tratar con la presente invención incluyen pseudoxantoma elástico, oclusión venosa, oclusión arterial, enfermedad obstructiva de la carótida, la anemia de Células Falciformes, enfermedad de Eales, miopía, desprendimiento de retina crónico, síndromes de hiperviscosidad, toxoplasmosis, trauma y complicaciones post-láser. Otras enfermedades incluyen enfermedades asociadas con la rubeosis (neovascularización del ángulo) y enfermedades causadas por la proliferación anormal de tejido fibrovascular o fibroso, incluyendo todas las formas de vitreorretinopatía proliferativa, estén o no asociadas con la diabetes.

Además de las composiciones y métodos para el tratamiento de las afecciones no deseadas, la descripción también proporciona métodos para la visualización de los vasos sanguíneos en un cuerpo. Tales métodos también pueden ser considerados como métodos para marcar de forma detectable los vasos sanguíneos en un cuerpo para su posterior visualización. Las maneras convencionales para procesar muestras de tejido para la visualización de los vasos sanguíneos son laboriosos y requieren mucho tiempo. Para mejorar la eficiencia en la preparación del tejido, la presente invención proporciona una técnica llamada Pintura del Vaso. El concepto básico de la Pintura del Vaso es teñir selectivamente el revestimiento interno de los vasos sanguíneos con el colorante fluorescente. Los vasos sanguíneos están revestidos con membrana de células endoteliales, una membrana de bicapa lipídica que puede ser teñida directamente con un colorante lipófilo. La clave de esta técnica es una disolución formulada especialmente, la Pintura del Vaso, que contiene un colorante lipófilo. Los ejemplos no limitantes de tales colorantes están disponibles de Molecular Probes, e incluyen DiI, DiO, DiO, DiD, DiA, y DiR, que son dialquilcarbocianinas de cadena larga y colorantes dialquilaminoestirilo utilizados como trazadores neuronales. Por medio de la perfusión intracardiaca de un animal con la Pintura del Vaso seguido de un lavado, opcionalmente en una solución de fijación

tal como, pero no limitada a, solución de paraformaldehído al 4%, los vasos sanguíneos se tiñen instantáneamente. Los tejidos pueden ser observados mediante microscopía de fluorescencia inmediatamente después de la perfusión. La tinción es notablemente brillante con muy bajo fondo de manera que se pueden obtener imágenes de alto contraste utilizando lentes de objetivo de diferentes potencias de aumento.

La descripción también proporciona un modelo animal de neovascularización ocular. El modelo se analiza en detalle más abajo, pero en general se basa en la inyección de material en el espacio subretiniano del ojo de un animal. Se puede utilizar cualquier modelo animal no humano adecuado para la enfermedad ocular, y el material inyectado puede variar de Matrigel™, un extracto de proteínas de la matriz extracelular (ECM), de tumor EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) murino que se utiliza ampliamente como membrana basal reconstituida en experimentos de cultivo celular, a una solución simple de colágeno I de cola de rata, colágeno I bovino y colágeno humano I (tal como la disponible de BD Biosciences). Véanse Gautreau, A. et al, PNAS, 96: 7300. (1999); Abir R. et al. Hum Reprod, 14: 299. (1999); y Abir R. et al. Steril, 75: 141. (2001). Se pueden usar otras fuentes de colágeno, incluyendo las producidas mediante el uso de colágeno liofilizado (tales como colágeno de cola de rata de Roche) disuelto en 0,1 X DME pH 4,0 (DME en polvo de Life Technologies sin NaHCO<sub>3</sub>, preparar una solución 10X pero con el indicador de color de pH, y utilizar de HCl para ajustar el pH a 4,0, y a continuación diluir esta solución con agua para preparar la solución 0.1X DME) y una solución de ácido acético al 10%.

Sin estar limitados por la teoría, y ofrecido para mejorar la comprensión de la descripción, se cree que la inyección de una solución de colágeno (o proteína) es suficiente para imitar los depósitos anormales que se producen en la DMAE después de la inyección en el espacio subretiniano de las ratas que induce una nueva invasión de los vasos sanguíneos. Tales modelos animales se pueden utilizar ventajosamente para detectar agentes activos candidatos de la invención para determinar la actividad contra la angiogénesis, la neovascularización (tal como la NVC), y la DMAE. Los ejemplos de tales métodos incluyen los que comprenden la administración (por medio de cualquier método descrito en la presente memoria) de un agente candidato a dicho animal y la determinación del efecto (aumento, disminución o ningún cambio) sobre la angiogénesis o la neovascularización en dicho animal.

Los siguientes ejemplos se exponen con el fin de proporcionar a los expertos normales en la técnica una exposición y descripción completas de cómo preparar y utilizar la presente invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben contabilizar algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura es grados Celsius, y la presión es la atmosférica o próxima a la misma.

#### Ejemplo 1

##### Modelo animal basado en Matrigel™

Dentro de esta aplicación, a menos que se indique lo contrario, las técnicas utilizadas se pueden encontrar en cualquiera de varias referencias bien conocidas, tales como: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); "Guide to Protein Purification" en Methods in Enzymology (MP Deutshcer, ed., (1990) Academic Press, Inc.); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2ª ed, Liss, Inc., Nueva York, N.Y., (1987).

En la búsqueda de tratamientos eficaces para la NVC, se creó un modelo animal simple inyectando 2-3 µl de Matrigel™ en el espacio subretiniano de ratas adultas Sprague-Dawley utilizando una aguja de calibre 33 conectada a una microjeringa Hamilton de 10 µl. Una semana o más tarde, los animales se sacrificaron mediante inhalación de CO<sub>2</sub> y se sometieron a perfusión con la Pintura de Vaso, una nueva técnica de visualización desarrollada recientemente en el laboratorio de los autores de la presente invención que permite escrutar agentes, incluyendo compuestos químicos y proteínas, para determinar su potencial en la inhibición de la NVC (Wen, ARVO Abstract, Marzo de 2002). La Pintura de Vaso comprende el uso de una disolución que contiene Dil, seguido de una disolución de paraformaldehído al 4%, y se discute adicionalmente más adelante.

Se retiró la porción anterior del ojo, incluyendo la córnea y el cristalino, y la copa ocular se incluyó en agarosa al 5%. Se cortaron secciones del ojo (100 micras) en serie en un vibrátomo y se montaron en portaobjetos de vidrio. Las secciones oculares se examinaron mediante microscopía de fluorescencia para la neovascularización en el depósito de Matrigel™. Se obtuvieron secciones ópticas en serie utilizando microscopía confocal. La reconstrucción tridimensional de los vasos sanguíneos de nuevo desarrollo se logró utilizando Auto Visualiz-3D (Autouant Imaging, Inc.). El escape de proteína de los nuevos vasos se detectó mediante la evaluación del cambio de color en el depósito de Matrigel™ después de la inyección intravenosa de colorante Azul de Evan.

La neovascularización se observó tan pronto como 7 días después de la inyección de Matrigel™ y fue evidente extensa NVC 10 días después de la inyección de Matrigel™ en todos los ojos inyectados. Nuevos vasos sanguíneos, originados a partir de la coriocapilar exclusivamente, invadieron el depósito de Matrigel™ y formaron

extensas redes de 14 días después de la inyección de Matrigel™. Reconstrucción tridimensional mostró claramente que los nuevos vasos se originaron en la coroides. El depósito de Matrigel™ se volvió de color azul claro después de la inyección de azul Evan, en comparación con el tejido circundante de color blanco pálido, lo que indica la falta de barrera. Se observó cicatriz en forma de disco 30 días después de la inyección de Matrigel™.

Por lo tanto, los depósitos subretinianos de Matrigel™ inducen la NVC en el espacio subretiniano, imitando la patología observada en la DMAE exudativa, o de forma húmeda, y proporcionando de este modo un modelo animal mejorado para la investigación de la patología de la NVC y para someter a ensayo terapias potenciales.

## Ejemplo 2

### Inhibición de la NVC

En la caracterización inicial del modelo, se sospechaba que había una posible participación de una reacción inflamatoria a Matrigel™ en la generación de la neovascularización. Como resultado, se sometieron a ensayo dos inmunosupresores conocidos, ciclosporina y rapamicina.

La administración oral de ciclosporina (15 mg/kg/d, administrada 4 días antes de la inyección de Matrigel™ a 10 días después de la inyección) no tuvo ningún efecto sobre la NVC. En marcado contraste, sin embargo, la rapamicina oral (Rapamune®, 1,5 mg/kg/d, administrada 4 días antes de la inyección de Matrigel™ a 10 días después de la inyección) dio como resultado la completa inhibición del desarrollo de NVC en los 16 ojos sometidos a ensayo. La rapamicina es asequible comercialmente en forma de una solución oral, comercializada como Solución Oral Rapamune por Wyeth-Ayerst. Por lo tanto, se examinaron adicionalmente las propiedades anti-NVC de la rapamicina por medio de administración local.

Debido a que la rapamicina no es soluble en agua, se disolvió en DMSO (sometido a ensayo en 8 ojos) o se suspendido en PBS (sometido a ensayo en 6 ojos), a continuación se mezcló con Matrigel™. La rapamicina que contenía Matrigel™ mixta se inyectó en el espacio subretiniano. A una dosis de 25 µg/l de rapamicina (o 30 µg/inyección, ya que cada inyección utiliza 1,2 µl de Matrigel™), hubo de nuevo una inhibición completa de la NVC en los ojos tratados con rapamicina.

En experimentos adicionales, y utilizando los métodos descritos anteriormente, la cantidad de la rapamicina se redujo a 2,5 µg/l. A esta cantidad (la palabra "concentración" no se está utilizando puesto que la rapamicina no es soluble en agua), los cristales de rapamicina fueron claramente visibles, incluso al cabo de 10 días. En cada caso, no hubo neovascularización detectable en los ojos tratados. Los problemas debidos a la insolubilidad, si los hubiera, pueden ser abordados mediante el uso de agentes activos solubles de la invención, tales como, pero no limitados a, SDZ-RAD.

Por tanto, la rapamicina tiene el potencial para inhibir o prevenir la NVC en pacientes humanos. Además, la administración local de rapamicina es, evidentemente, un enfoque práctico para el tratamiento de la NVC, que es particularmente ventajosa teniendo en cuenta los efectos desventajosos potenciales de la administración sistémica.

## Ejemplo 3

### Pintura de Vaso

La retina de una rata Sprague-Dawley de 3 meses de edad normal, sacrificada mediante sobredosis de CO<sub>2</sub> se perfundió con la Pintura de Vaso (Dil, 0,1 mg/ml), seguido de paraformaldehído al 4%. La retina se disecó y se fijó posteriormente en el mismo fijador durante 1 hora, se enjuagó en solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se montó horizontalmente en portaobjetos de vidrio. Las microfotografías se tomaron en un microscopio Nikon E800.

Las microfotografías de la retina montada horizontalmente mostraron que los vasos se tiñen intensamente con un fondo bajo. Los núcleos de las células endoteliales también se tiñeron y fueron fácilmente identificables. La estructura espacial de la vasculatura se conservó bien y los capilares retinianos profundos también fueron visibles.

La red vascular se aprecia mejor por medio de imágenes para mostrar su tridimensionalidad. Se pueden obtener excelentes imágenes en 3-D de la vasculatura utilizando la técnica del molde de corrosión y microscopía electrónica de barrido (SEM), véase Konerding MA (1991) Scanning electron microscopy of corrosion casting in medicine. Scanning Microsc. 5:851-865. Sin embargo, el molde de corrosión es técnicamente difícil y consume mucho tiempo, como la SEM. Alternativamente, las imágenes en 3-D se pueden reconstruir a partir de una pila de secciones ópticas en serie por medio de microscopía confocal. La tinción brillante y una alta razón de señal a ruido mediante la Pintura del vaso hacen que sea posible obtener secciones ópticas en serie de muestras tan gruesas como 100-150 µm mediante microscopía láser confocal de barrido sin deterioro significativo de la señal desde la parte inferior de la muestra incluso utilizando lentes de objetivo de baja potencia de aumento. Se pueden reconstruir imágenes en 3-D

de alta calidad en diferentes ángulos de visión a partir de una pila de imágenes digitales en 2-D mediante un soporte lógico comercial. La Figura 1 muestra imágenes reconstruidas en 3-D de una retina montada horizontalmente, procesada como se ha descrito anteriormente. Se tomó una pila de 78 secciones ópticas a lo largo del eje Z (distancia de  $Z = 1 \mu\text{m}$ ) por medio de microscopía confocal utilizando una lente de objetivo 20X en un microscopio confocal Bio-Rad MRC-1024. Se reconstruyeron imágenes en 3-D para mostrar la vasculatura de la retina a un ángulo de  $0^\circ$  (Fig. 1A) o  $180^\circ$  (Fig. 1B). Ambas representan una arteria en la superficie de la retina con conexiones con los capilares profundos.

#### Ejemplo 4

##### NVC en zona inyectada con Matrigel™

Matrigel™ es un extracto de proteínas de la matriz extracelular (MEC) de tumor EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) murino y se utiliza ampliamente como membrana basal reconstituida en experimentos de cultivo celular. También se utiliza para evaluar agentes angiogénicos o antiangiogénicos en un ensayo *in vivo*, el ensayo del tapón de Matrigel™ (Passaniti A, Taylor RM, Pili R, et al. (1992) A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. Lab Invest. 67:519-528). Los estudios patológicos indican una asociación entre la NVC y depósitos anormales de la matriz extracelular (MEC) en la localización entre el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la membrana de Bruch. Con el fin de imitar los depósitos anormales que se producen en la DMAE, se inyecta Matrigel™ en el espacio subretiniano de las ratas. Nuevos vasos sanguíneos invaden los depósitos de Matrigel™ poco después de la inyección de Matrigel™.

En lo que sigue, se introdujo Matrigel™ (1,2  $\mu\text{l}$ ) en el espacio subretiniano mediante inyección en los ojos de ratas Sprague-Dawley. En un momento determinado después de la inyección, el animal se sacrificó y se sometió a perfusión con la Pintura de Vaso, seguida de solución de paraformaldehído al 4%. La porción anterior del ojo se retiró y a continuación la copa ocular se incluyó en agarosa al 5%. Se cortaron secciones (100  $\mu\text{m}$  de espesor) transversales en serie en un vibrátomo.

Nuevos vasos sanguíneos procedentes de la coriocapilar fueron detectables tan pronto como 4 días después de la inyección de Matrigel™ y llegaron a estar bien desarrollados 10 días después de la inyección. Una imagen DIC de una sección transversal de un ojo, de un animal de 2 meses de edad 10 días después de la inyección de Matrigel™, se muestra en la Fig. 2A. La imagen DIC se superpuso sobre una sección óptica para mostrar la NVC junto con la coroides y la vasculatura de la retina (Fig. 2A). Los nuevos vasos sanguíneos penetran en la membrana de Bruch en un solo sitio (punta de flecha amarilla) y a continuación se ramifican en la capa de Matrigel™ entre el EPR y la retina. Se tomó una pila de 42 secciones ópticas de esta muestra y se reconstruyó una imagen en 3-D (Fig. 2B). La imagen en 3-D muestra claramente que se originaron nuevos vasos sanguíneos a partir de la coriocapilar a través de un único sitio de penetración (punta de flecha amarilla).

La permeabilidad de los vasos sanguíneos recién formados se evaluó mediante el ensayo de Azul de Evans. El Azul de Evans (60 mg/kg en PBS) se inyectó por vía intravenosa a una rata Sprague-Dawley a cuyos ojos se les había inyectado Matrigel™ 10 días antes. Se disecó una preparación de coroides-retina, montada horizontalmente y se observó mediante microscopía de fluorescencia. Solo se observó tinción azul de Evans en la zona a la que se había inyectado Matrigel™, indicando la naturaleza permeable de los nuevos vasos.

#### Ejemplo 5

##### Inhibición de la NVC por rapamicina

En los escritorios iniciales de agentes antiangiogénicos potenciales utilizando el modelo Matrigel™, la rapamicina demostró una notable capacidad para inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos. La rapamicina, utilizada clínicamente como inmunosupresor (Kahan BD (2001) Sirolimus: a comprehensive review. Expert Opin. Pharmacother. 2:1903-1917), se une a una FKBP (proteína de unión a FK506) para formar un complejo FKBP-rapamicina, que a su vez inhibe la función de mTOR (diana de mamífero de rapamicina), un controlador central del crecimiento celular (Schmelzle T, Hall MN (2000) TOR, a central controller of cell growth. Cell 103:253-262). La rapamicina inhibe la proliferación de células endoteliales (Viñals F, Chambard JC, Pouyssegur J (1999) p70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation. J. Biol. Chem. 274:26776-26782) y la respuesta a VEGF (Yu Y, Sato JD (1999) MAP kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and p70 S6 kinase mediate the mitogenic response of human endothelial cells to vascular endothelial growth factor. J. Cell Physiol. 178:235-246) y bFGF (factor básico de crecimiento de fibroblastos) y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas). Véase Cao et al. (1995) Effects of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. Inhibition of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor action and antagonism of rapamycin by FK506. Transplantation 59(3):390-5 and Ruygrok et al. (2003) Rapamycin and cardiovascular medicine. Intern. Med. J. 33(3):103-9. Se ha demostrado que bloquea la angiogénesis tumoral (Guba

M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, et al. (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. Nat. Med. 8:128-135).

Se inyectó Matrigel™ en el espacio subretiniano de ratas adultas Sprague-Dawley (n = 22). Los animales fueron alimentados con rapamicina una vez al día a una dosis de 3 mg/kg comenzando 4 días antes de la inyección de Matrigel™. Los ojos se recogieron a los 10 días (n = 18) o 20 días (n = 4) después de la inyección de Matrigel™ y se procesaron como se describe en el Ejemplo 4. Las secciones de tejido se examinaron mediante microscopía de fluorescencia. Ninguno de los ojos recogidos a los 10 días contenía los nuevos vasos sanguíneos invadiendo el espacio subretiniano en los animales tratados rapamicina. En el grupo de 20 días, algunos vasos sanguíneos recién formados comenzaron a invadir la zona de Matrigel™. La cantidad de NVC en este grupo se semicuantificó como (+). En comparación, la NVC en los animales de control (10 días) se calificó como (+++ ~ ++++), como se muestra en la Fig. 2.

En otro grupo de animales, la rapamicina se mezcló con Matrigel™ (suspensión, 1 µg/µl, n = 6; 10 µg/µl, n = 11) y se inyectaron simultáneamente al espacio subretiniano con Matrigel™ (liberación en gel). Los ojos se recogieron 10 días después de la inyección y se procesaron como se describe en el Ejemplo 4. No se encontró NVC en ninguno de los ojos tratados con rapamicina mediante liberación en gel. La Fig. 3 muestra una imagen DIC de una sección de un ojo, al que se han inyectado Matrigel y la mezcla de rapamicina a una dosis alta (10 µg/µl de suspensión) 10 días antes de la recogida de tejidos, para mostrar las partículas de rapamicina en el espacio subretiniano. Se observan claramente partículas de rapamicina en Matrigel™ en la imagen DIC, que se superpone a una imagen confocal de la tinción de Pintura de Vaso para mostrar los vasos sanguíneos de la coroides y la retina. No se encontró NVC en ninguno de los ojos a los que se había inyectado rapamicina.

En todos los experimentos, la rapamicina no tuvo ningún efecto discernible sobre la vasculatura normal del ojo. La ciclosporina, también un inmunosupresor, no pudo inhibir la formación de NVC cuando se administró por vía oral (100 mg/kg/d, n = 3) o en gel (25 µg/µl, n = 3) por medio del mismo paradigma experimental.

#### Ejemplo 5

##### Índice de NVC en ojos tratados con tacrolimus FK506

FK506, que no es soluble en agua, se mezcló con Matrigel™ (en forma de una suspensión) a 10 µg/µl, y 1,2 µl se inyectaron en el espacio subretiniano como se ha descrito anteriormente. Los ojos se recogieron 10 días después de la inyección y los vasos sanguíneos se tiñeron con Pintura de Vaso. Los ojos fueron incluyeron agarosa al 5% y se cortaron secciones seriadas (100 µm de espesor) en un vibrátomo. La NVC se examinó mediante microscopía de fluorescencia y se calculó el índice de NVC de cada ojo. Los resultados se muestran a continuación.

FK506 Media = 12,67 (n = 6) ETM = 2,76

Control de Media = 32,00 (n = 10) ETM = 6,41

Prueba t de Student P = 0,042

Por lo tanto, FK506 inhibe NVC en 60%.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de rapamicina y un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para administración al ojo o al tejido ocular para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), en donde el medicamento es administrado mediante un modo de administración seleccionado del grupo que consiste en inyección intraocular, inyección subretiniana, inyección subescleral, inyección intracoroidea, e inyección subconjuntival.
- 10 2. Una composición de rapamicina para su uso en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), comprendiendo dicha composición de rapamicina una cantidad eficaz de rapamicina y un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para administración al ojo o al tejido ocular, en donde la composición se administra mediante un modo de administración seleccionado del grupo que consiste en inyección intraocular, inyección subretiniana, inyección subescleral, inyección intracoroidea, e inyección subconjuntival.

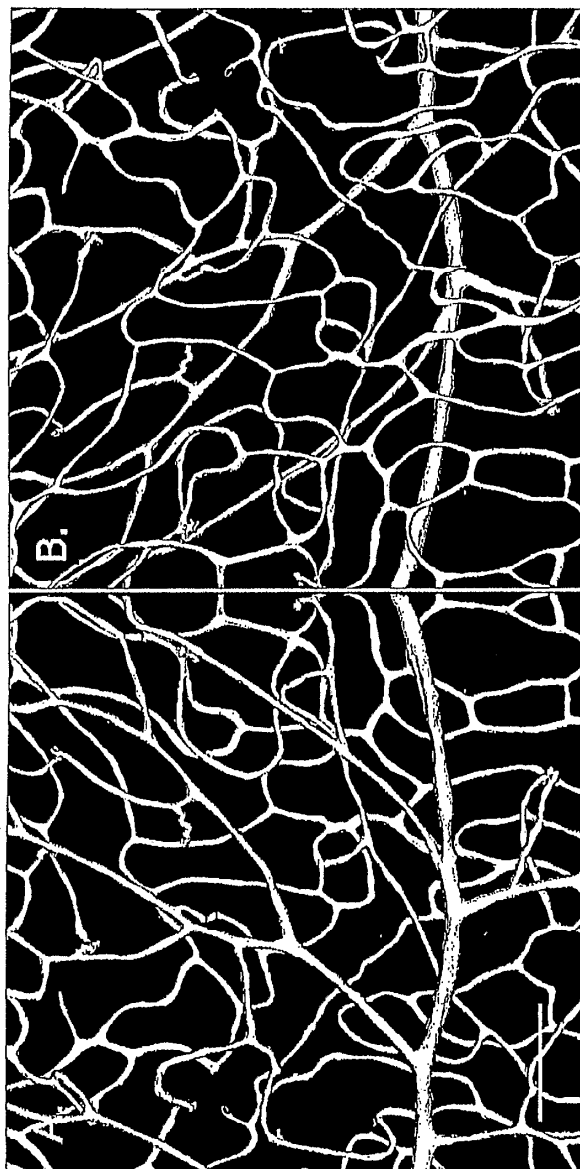


Fig. 1

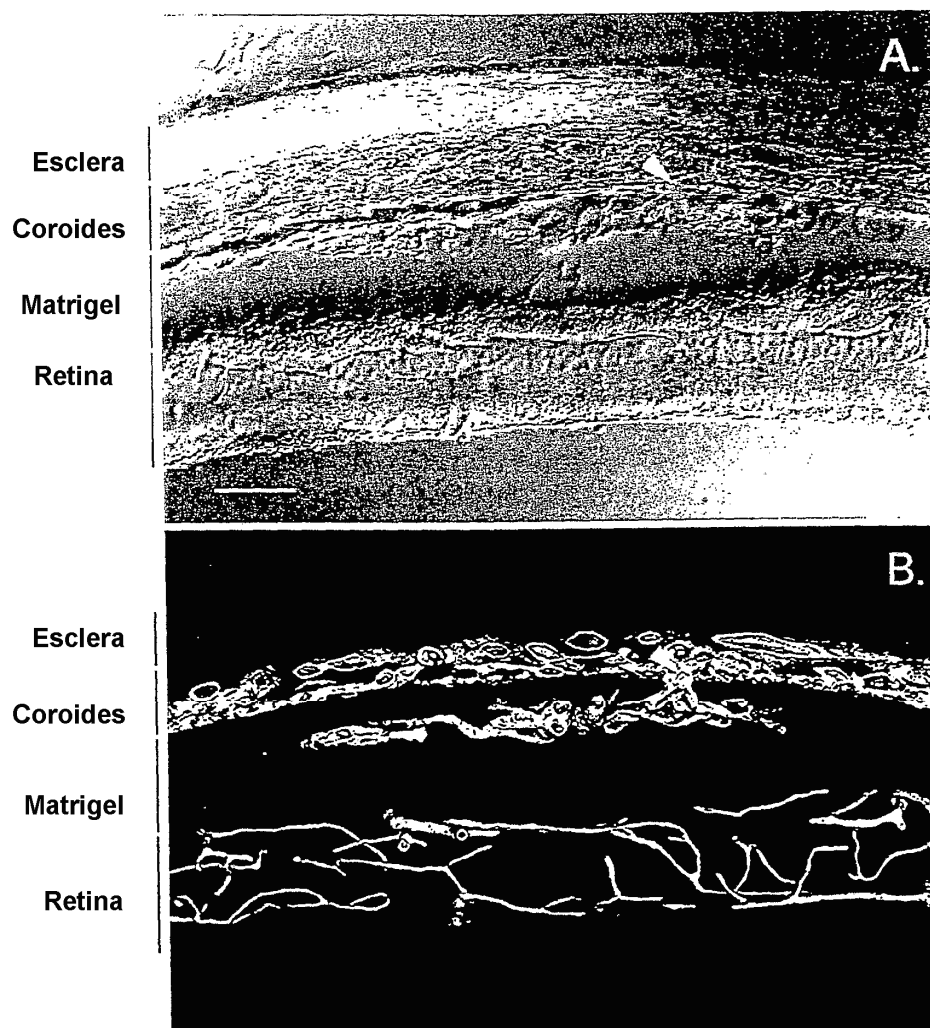


Fig. 2

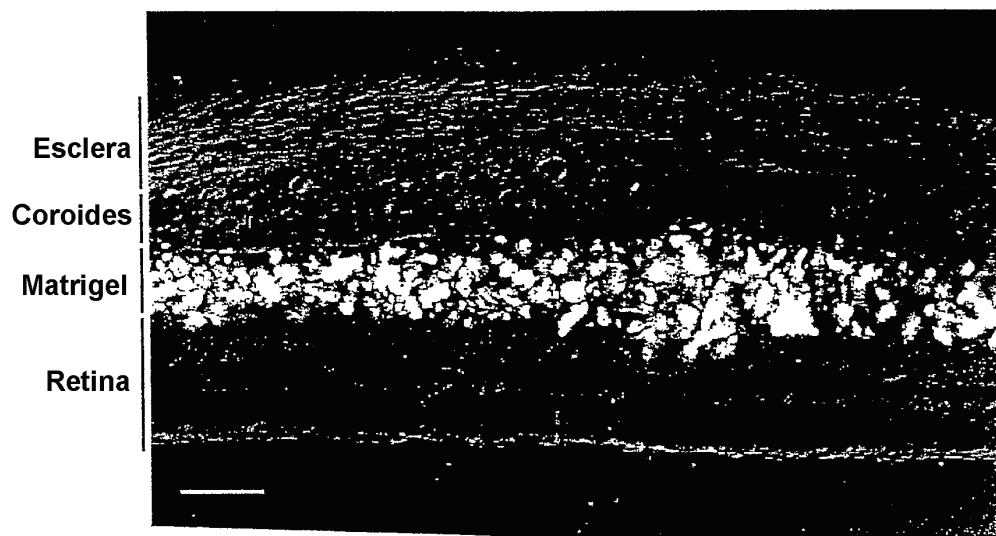


Fig. 3