

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 515 467**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2011 E 11740931 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2603238**

54 Título: **Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de una enfermedad ocular en un sujeto**

30 Prioridad:

09.08.2010 EP 10305873

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

29.10.2014

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris , FR**

72 Inventor/es:

BEHAR-COHEN, FRANCINE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 515 467 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

Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de una enfermedad ocular en un sujeto

5 CAMPO DE LA INVENCION:

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de una enfermedad ocular en un sujeto.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION:

En los últimos años, se han producido nuevos e interesantes avances en el tratamiento de enfermedades que causan ceguera oculares tales como la degeneración macular relacionada con la edad y la retinopatía diabética, utilizando bioterapias.

15 Inyecciones intravítreas repetidas de proteínas terapéuticas están aumentando rápidamente en frecuencia como una vía de administración intraocular de proteínas terapéuticas. Las inyecciones intravítreas se realizan comúnmente y son bien toleradas, pero se asocian con riesgos de complicaciones raras pero graves tales como lesiones de la retina, formación de cataratas y la infección del ojo. Más problemática es la deficiente complacencia de inyecciones repetidas con frecuencia. Se está explorando un amplio campo de métodos innovadores para reducir la frecuencia de las inyecciones intravítreas.

25 La terapia génica es una opción óptima para enfermedades de los ojos, y particularmente vectores de genes no virales prometen no prestar atención a los límites de los vectores virales que están asociados con la inmunogenicidad, toxicidad y riesgo de inserción en secuencias oncogénicas. Además de ello, los vectores no virales son más apropiados para el control de las dosis de las proteínas terapéuticas que podrían ser un factor crucial para la eficacia y la especificidad de factores terapéuticos de este tipo. Por ejemplo; los tejidos de los ojos son un objetivo desarrollado recientemente para la transferencia de genes in vivo. En este contexto, Behar-Cohen et al (2006) han desarrollado una nueva técnica de electrotransferencia (ET) in vivo en el ojo de rata, utilizando por vez primera el músculo ciliar como tejido diana para la entrega de genes y como un depósito para la producción de proteínas terapéuticas en los medios oculares: humores acuoso y vítreo (documento WO 2006123248). Su eficacia se demostró evaluando los efectos de la producción intraocular de los receptores de TNF en dos modelos de rata de inflamación ocular (uveítis) (Bloquel C et al. Plasmid electrotransfer of eye ciliary muscle: principles and therapeutic efficacy using hTNF-alpha soluble receptor in uveitis. FASEB J. 2006; 20: 389-391; Kowalczyk L et al. Local ocular immunomodulation resulting from electrotransfer of plasmid encoding soluble TNF receptors in the ciliary muscle. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009; 50: 1761-1768; Ouchard E et al. Effects of ciliary muscle plasmid electrotransfer of TNF- α soluble receptor variants in experimental uveitis. Gene Ther 2009; 16: 862-873).

40 Aunque la electrotransferencia al músculo ciliar es un método físico eficaz de transferencia de genes, se requiere la colocación invasiva de electrodos de aguja en el tejido diana para suministrar impulsos eléctricos. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de métodos que sean menos invasivos. No ha habido ningún estudio previo de si la exposición a ultrasonidos de baja intensidad, en combinación con microburbujas comerciales es capaz de aumentar la transferencia de genes en el músculo ciliar liso después del suministro intramuscular de genes informadores.

45 SUMARIO DE LA INVENCION:

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso en un método para tratar una enfermedad ocular en un sujeto, que comprende las etapas que consisten en i) suministrar una composición farmacéutica formulada con microburbujas de agente de contraste ecográfico y un ácido nucleico terapéutico de interés en el músculo ciliar del sujeto y ii) exponer a ultrasonidos la región en la que se suministró la composición farmacéutica para inducir la transfección de dicho ácido nucleico terapéutico de interés dentro de dicho músculo ciliar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION:

55 El objetivo de los autores de la invención era evaluar la viabilidad de utilizar ultrasonidos (US) de baja intensidad combinados con microburbujas (MB) de agente de eco-contraste disponibles comercialmente para transfectar específicamente el músculo ciliar, que se ha demostrado previamente que tienen el potencial de la secreción de proteínas terapéuticas en el medio ocular. Por lo tanto, el ADN del plásmido informador que codifica la *Gaussia luciferasa* y que contiene el gen *LacZ*, solo o mezclado con 50% de microburbujas de contraste ecográfico (Artison), fueron inyectados en el músculo ciliar del ojo de rata, con o sin exposición a ultrasonidos (1 MHz, de 2 W / cm² para Isata durante 2 minutos, ciclo de trabajo del 50%). Siete días después de la transfección, la actividad de luciferasa en medios oculares era significativamente mayor en los ojos a los que se inyectó plásmido y tratados con MB y US

en comparación con los ojos tratados con US solo o con los ojos que recibieron solamente la inyección de plásmido. US más microburbujas mostró un aumento de 2,6 veces en la luminiscencia ($p < 0,023$) en comparación con los ojos no tratados con US control. Treinta días después de la transfección se observó una disminución significativa en la actividad de luciferasa en cada uno de los grupos experimentales. La tinción histoquímica demostró la expresión de β -galactosidasa en la región ciliar, pero no limitado al sitio de inyección del plásmido. Por consiguiente, los autores de la invención demostraron por vez primera in vivo la viabilidad de la transferencia de genes, mediada por ultrasonidos y microburbujas en los tejidos oculares para la producción intraocular de proteínas secretadas en los medios oculares. Estos resultados indican que se pueden utilizar microburbujas combinadas con US de manera eficaz para transfectar células del músculo ciliar y, por lo tanto, para el tratamiento de enfermedades oculares.

La invención se refiere a composiciones para uso en un método de este tipo para el tratamiento de una enfermedad ocular en un sujeto.

Más particularmente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso en un método para tratar una enfermedad ocular en un sujeto, que comprende las etapas que consisten en i) suministrar una composición farmacéutica formulada con microburbujas de agente de contraste ecográfico y un ácido nucleico terapéutico de interés en el músculo ciliar del sujeto y ii) exponer a ultrasonidos la región en la que la composición farmacéutica se suministró para inducir la transfección de dicho ácido nucleico terapéutico de interés dentro de dicho músculo ciliar.

El ácido nucleico a utilizar en la presente invención puede ser cualquier ácido nucleico de interés que exhiba una propiedad biológica. Más particularmente, el ácido nucleico puede ser cualquier ácido nucleico que codifique un producto natural, truncado, artificial, quimérico o recombinante [p. ej., un polipéptido de interés (incluida una proteína o un péptido), un ARN, etc.] que exhiba una actividad biológica.

El ácido nucleico es preferiblemente una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) (ADNc, ADNg, ADN sintético, ADN artificial, ADN recombinante, etc.) o una molécula de ácido ribonucleico (ARN) (ARNm, ARNt, ARNi, ARNsi, ARN catalítico, ARN antisentido, ARN viral, etc.). El ácido nucleico puede ser ácido nucleico de cadena sencilla o de cadena múltiple, preferiblemente un ácido nucleico de doble cadena o puede estar formando complejo. El ácido nucleico puede comprender secuencias híbridas o secuencias sintéticas o semi-sintéticas. Se puede obtener mediante cualquier técnica conocida por las personas expertas en la técnica, y especialmente por los bancos de rastreo, por síntesis química o, alternativamente, por métodos mixtos que incluyen la modificación química o enzimática de secuencias obtenidas mediante el rastreo de bancos.

En una realización particular, el ácido nucleico terapéutico es de origen sintético o biosintético, o se extrae de un virus o de un organismo eucariota o procariota unicelular o pericelular.

El ácido nucleico terapéutico utilizado en la presente invención puede estar desnudo, puede formar complejo con cualquier agente químico, bioquímico o biológico, puede ser insertado en un vector, etc., cuando se administra al músculo ciliar.

Tal como se utiliza aquí, la expresión "ADN desnudo" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que no está combinada a un agente sintético, biosintético, químico, bioquímico o biológico, mejorando el suministro o la transferencia de dicho ADN, o facilitando su entrada en la célula.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha sido enlazada. Este término también se refiere en la presente solicitud a cualquier soporte de suministro tal como una composición asociada a un ácido nucleico terapéutico o profiláctico con el fin de aumentar su suministro celular.

Vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están enlazados. Vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están enlazados operativamente se denominan en esta memoria "vectores de expresión". En general, vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de "plásmidos" que se refieren a bucles de ADN de doble cadena circular que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. En la presente invención, el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. El plásmido es una forma preferida de ADN desnudo de acuerdo con la invención.

Los vectores también pueden ser ADN episomal, cromosomas artificiales de levaduras, minicromosomas o vectores virales en los que el vector viral se selecciona del grupo que consiste en un lentivirus, un adenovirus, un virus adeno-asociado y un vector similar a virus.

El vector también puede ser una vesícula de lípidos tal como un liposoma. Se pueden utilizar, además, compuestos

basados en lípidos que no son liposomas. Por ejemplo, lipofectinas y citofectinas son iones positivos basados en lípidos que se unen a ácido nucleico cargado negativamente y forman un complejo que puede transportar el ADN a través de una membrana celular. La invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión que cumplen funciones equivalentes y que se conoce en la técnica subsiguientemente al presente.

5 Además, el ácido nucleico de acuerdo con la invención también puede contener una o más regiones adicionales, por ejemplo elementos reguladores de tamaño pequeño o grande que están disponibles para el experto en la materia tales como una región de promotor (constitutiva, regulada, inducible, específica para el tejido, etc.), por ejemplo secuencias que permiten y/o fomentan la expresión en el músculo ciliar, una señal de terminación de la transcripción, secuencias de secreción, un origen de replicación y/o secuencias de señal de localización nuclear (nls – siglas en inglés) que potencian adicionalmente la transferencia de polinucleótido al núcleo de la célula. Tales secuencias nls se han descrito en la técnica anterior, incluida la secuencia del antígeno T grande de SV40.

15 Adicionalmente, el ácido nucleico puede comprender, además, marcadores seleccionables útiles para seleccionar, medir y supervisar los resultados de transferencia de ácidos nucleicos (transferencia a qué tejidos, duración de la expresión, etc.). Los tipos de sistemas de expresión y genes informadores que pueden utilizarse o adaptarse para su uso son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se utilizan comúnmente genes que codifican una actividad de luciferasa, una actividad de fosfatasa alcalina o una actividad de la proteína verde fluorescente.

20 El ácido nucleico de acuerdo con la invención puede contener cualquier secuencia de nucleótidos de cualquier tamaño. El ácido nucleico puede, por lo tanto, variar en tamaño desde un oligonucleótido simple a una molécula más grande tal como una secuencia de nucleótidos que incluye los exones y/o intrones y/o elementos de regulación de cualquier tamaño (pequeños o grandes), un gen de cualquier tamaño, por ejemplo de gran tamaño, o un cromosoma, por ejemplo, y puede ser un plásmido, un episoma, un genoma viral, un fago, un cromosoma artificial de levadura, un minicromosoma, una molécula antisentido, etc.

En una realización particularmente preferida, el polinucleótido es un ADN de doble cadena, circular, tal como un plásmido, que codifica un producto con actividad biológica.

30 El ácido nucleico se puede preparar y producir de acuerdo con técnicas de ADN recombinante convencionales, tales como amplificación, el cultivo en células huésped procariotas o eucariotas, purificación, etc. Las técnicas de la tecnología de ADN recombinante son conocidas por los expertos ordinarios en la técnica.

35 En una realización particular, el ácido nucleico de interés es capaz de ejercer un efecto beneficioso sobre células oculares. Puede compensar una deficiencia en o reducir un exceso de una sustancia endógena. Alternativamente, puede conferir nuevas propiedades a las células. Puede ser, por ejemplo, una secuencia antisentido o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que puede afectar a la función, morfología, actividad y/o al metabolismo de las células oculares.

40 La regulación a la baja de la expresión génica utilizando ácidos nucleicos antisentido se puede lograr al nivel de la traducción o transcripción. Ácidos nucleicos antisentido de la invención son preferiblemente fragmentos de ácidos nucleicos capaces de hibridarse específicamente con un ácido nucleico que codifica una sustancia activa ocular endógena o el ARN mensajero correspondiente. Estos ácidos nucleicos antisentido pueden ser oligonucleótidos sintéticos, opcionalmente modificados para mejorar su estabilidad y selectividad. También pueden ser secuencias de ADN, cuya expresión en la célula produce ARN complementario a todo o parte del ARNm que codifica una sustancia activa ocular endógena. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden preparar mediante la expresión de todo o parte de un ácido nucleico que codifica una sustancia activa ocular endógena, en la orientación opuesta. Cualquier longitud de la secuencia antisentido es adecuada para la práctica de la invención con tal de que sea capaz de regular a la baja o bloquear la expresión de la sustancia activa ocular endógena. Preferiblemente, la secuencia antisentido es de al menos 20 nucleótidos de longitud. La preparación y el uso de ácidos nucleicos antisentido, ADN que codifica ARNs antisentido y el uso de antisentido oligo y genético se describe en el documento WO92/15680.

55 Entre los polipéptidos o proteínas biológicamente activos opcionalmente expresadas por un ácido nucleico según se describe arriba o utilizable como un agente biológicamente activo y adecuado para la práctica de la invención se encuentran enzimas, derivados de la sangre, hormonas, linfoquinas, citoquinas, quimioquinas, factores anti-inflamatorios, factores de crecimiento, factores tróficos, factores neurotróficos, factores hematopoyéticos, factores angiogénicos, factores anti-angiogénicos, inhibidores de metaloproteínasa, reguladores de la apoptosis, factores de coagulación, receptores de los mismos, en particular receptores solubles, un péptido que es un agonista o antagonista de un receptor o de una proteína de adhesión, antígenos, anticuerpos, fragmentos o derivados de los mismos, y otros constituyentes esenciales de la célula.

Diversos factores neurotróficos derivados de la retina tienen el potencial de rescatar células fotorreceptoras degenerantes, y pueden ser suministrados a través de un método de acuerdo con la presente invención. Agentes

biológicamente activos preferidos se pueden seleccionar de VEGF, angiogenina, angiopoyetina-1, DeM, factores de crecimiento de fibroblastos ácidos o básicos (aFGF y bFGF), FGF-2, folistatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de dispersión (SF), leptina, midquina, factor de crecimiento placentario (PGF), factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB), pleiotrofina (PTN), RdCVF (factor de viabilidad de cono derivado de bastón), progranulina, proliferina, factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa), factor de crecimiento transformante-beta (TGF-beta), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de permeabilidad vascular (VPF), CNTF, BDNF, GDNF, PEDF, NT3, BFGF, angiopoyetina, efrina, EPO, NGF, IGF, GMF, aFGF, NT5, Gax, una hormona de crecimiento, [alfa]-1-antitripsina, calcitonina, leptina, una apolipoproteína, una enzima para la biosíntesis de vitaminas, hormonas o neuromediadores, quimioquinas, citoquinas tales como IL-1, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, un receptor de las mismas, un anticuerpo que bloquea a cualquiera de dichos receptores, TIMP tales como TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, angioarrestina, endostatina tal como endostatina XVIII y endostatina XV, ATF, angiostatina, una proteína de fusión de endostatina y angiostatina, el dominio C-terminal de hemopexina de metaloproteínasa de la matriz tipo 2, el dominio kringle 5 de plasminógeno humano, una proteína de fusión de endostatina y el dominio kringle 5 del plasminógeno humano, el inhibidor de la ribonucleasa de la placenta, el inhibidor del activador de plasminógeno, la factor plaquetario-4 (PF4), un fragmento de prolactina, la proteína relacionada con proliferina (PRP), la antitrombina III antiangiogénica, el inhibidor derivado de cartílago (CDI), un fragmento del complemento CD59, vasculostatina, vasostatina (fragmento de calreticulina), tromboespondina, fibronectina, en particular fragmento de fibronectina gro-beta, una heparinasa, gonadotropina coriónica humana (hCG), interferón alfa/beta/gamma, proteína inducible por interferón (IP-10), la monoquina inducida por el interferón-gamma (MIG), la proteína 10 inducible por el interferón alfa (IP10), una proteína de fusión de Mig e IP10, receptor de tirosina quinasa 1 similar a Fms soluble (FLT-1), receptor del dominio de inserción de quinasa (KDR), reguladores de la apoptosis tales como Bcl-2, Bad, Bak, Bax, Bik, Bcl-X isoforma corta y Gax, fragmentos o derivados de los mismos, y similares.

En una realización particular, el ácido nucleico codifica un fragmento soluble del receptor TNF[alfa], el receptor TGF [beta] 2, de VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, CCR2 o MIP1. El ácido nucleico puede también, en otra realización preferida, codificar un anticuerpo, un fragmento variable de un anticuerpo una sola cadena (scFv) o cualquier otro fragmento de anticuerpo que tenga capacidades de reconocimiento para los fines de inmunoterapia.

En una realización particular de la presente invención, el ácido nucleico biológicamente activo codifica un precursor de una proteína terapéutica utilizable en la presente invención, tales como las descritas arriba.

Además de ello, en otra realización de la presente invención, se puede utilizar una mezcla de ácidos nucleicos que codifican distintos productos biológicamente activos. Esta variante permite la expresión conjunta de diferentes productos en las células oculares.

La composición farmacéutica de la invención comprende microburbujas de agente de contraste ecográfico compuestas de una envuelta rellena con un núcleo de gas. Típicamente, dicho microburbujas tienen un diámetro de 0,1 a 10 micras, pero esta característica no se debe considerar como limitante y, por lo tanto, también están abarcadas por la invención microburbujas que tienen un diámetro mayor que 10 micras o menor que 0,1 micras.

Un "agente de microburbujas de contraste ecográfico", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una microesfera que comprende una carcasa con una forma aproximadamente esférica que rodea un hueco interno que comprende un gas. La "envuelta" de microburbujas a la que se alude en esta memoria se refiere a una membrana que rodea al hueco interno de la microburbuja y el término "gas", tal como se utiliza en esta memoria, designa una sustancia de baja toxicidad que está en la fase gaseosa a la temperatura ambiente y presión atmosférica normal o que puede sufrir un cambio de fase a la fase gaseosa a una temperatura de transición de aproximadamente 70° C o inferior.

La composición y los métodos para formar microburbujas como agentes de contraste de ultrasonido están bien establecidos en la técnica. Por lo tanto, la persona experta en la técnica conoce los materiales y métodos para formar las microburbujas utilizadas en la presente invención. Ejemplos de procedimientos para la preparación de microburbujas se describen en: la patente de Estados Unidos N° 4.446.442, patente de Estados Unidos N° 4.684.479, patente de Estados Unidos N° 4.718.433, patente de Estados Unidos N° 5.088.499, patente de Estados Unidos N° 5.123.414, patente de estados Unidos N° 5.271.928, patente de Estados Unidos N° 5.413.774, patente de Estados Unidos N° 5.445.813, patente de Estados Unidos N° 5.556.610, patente de Estados Unidos N° 5.597.549, patente de Estados Unidos N° 5.686.060, patente de Estados Unidos N° 5.773.527, patente de Estados Unidos N° 5.798.091, patente de Estados Unidos N° 5.827.504, patente de Estados Unidos N° 6.217.850, patente de Estados Unidos N° 6.416.740, patente de Estados Unidos N° 6.443.898 y la patente europea 0458745.

La envuelta de microburbujas es una membrana que rodea el hueco interno de la microburbuja. Envueltas de microburbujas varían típicamente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200 nm de espesor y ayudan a

evitar la destrucción y la difusión del núcleo de gas. La envuelta de microburbujas comprende típicamente un tensioactivo o un polímero. Tensioactivos adecuados para su uso en la preparación de microburbujas incluyen cualquier compuesto o composición que ayuda a la formación y el mantenimiento de una microburbuja mediante la formación de una capa en la interfaz entre el gas y el medio, habitualmente un medio acuoso, que contiene las microburbujas. El tensioactivo puede comprender un único compuesto o una combinación de compuestos. Se apreciará por la persona experta en la técnica que en la presente invención se puede utilizar una amplia gama de compuestos capaces de facilitar la formación de las microburbujas. El tensioactivo óptimo se puede determinar a través de estudios empíricos que no requieren una experimentación excesiva. Una persona que practique la técnica de la presente invención elegirá un tensioactivo adecuado en base a propiedades tales como la biocompatibilidad. Tensioactivos preferidos incluyen lípidos, incluidos fosfolípidos y lípidos fluorados. Lípidos que se pueden utilizar incluyen ácidos grasos; lisolípidos; fosfatidilcolinas; incluidas dioleoilfosfatidilcolina; dimiristoilfosfatidilcolina, dipentadecanoilfosfatidilcolina, dilauoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina; fosfatidiletanolaminas, incluidas dioleoilfosfatidiletanolamina; fosfatidilserinas; fosfatidilglicerol; fosfatidilinositoles; esfingolípidos; esfingomielina; glucolípidos; gangliósido GM1; gangliósido GM2; glucolípidos; sulfátidos; glucoesfingolípidos; ácido fosfátido; ácido palmítico; ácido esteárico; ácido araquidónico; ácido oleico; lípidos que portan polímeros tales como polietilenglicol, quitina, ácido hialurónico o polivinilpirrolidona; lípidos que portan mono-, di-, oligo- o poli-sacáridos sulfonados; colesterol, sulfato de colesterol; hemisuccinato de colesterol; hemisuccinato de tocoferol, lípidos con ácidos grasos enlazados a éter y éster, lípidos polimerizados, fosfato de diacetilo, estearilamina, cardiolipina, fosfolípidos con ácidos grasos de cadena corta de 6-8 carbonos de longitud, fosfolípidos sintéticos con cadenas de acilo asimétricas, 6-(5-colesten-3p-iloxi)-1-tio-(3-D-galactopiranosido, digalactosildiglicérido, 6-(5-colesten-3(3-iloxi)hexil-6-amino-6-desoxi-1-tio-(3-D-galactopiranosido, 6-(5-colesten-3(3-iloxi)hexil-6-amino-6-deoxil-ltio-a-D-manopiranosido, ácido 12-(((7'-dietilaminocumarin-3-il)carbonil)metilamino)octadecanoico; ácido N-[12-(((7'-dietilaminocumarin-3-il)carbonil)metilamino)octadecanoil]-2-aminopalmítico; (4'-trimetilamonio)butanoato de colesterilo, N-succinildioleoilfosfatidiletanolamina; 1,2-dioleoil-sn-glicerol; 1,2-dipalmitoil-sn-3-succinilglicerol; 1,3-dipalmitoil-2-succinilglicerol; 1-hexadecil-2-palmitoilglicerofosfoetanolamina; palmitoilhomocisteína; y combinaciones de los mismos; bromuro de lauriltrimetilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio, bromuro de miristiltrimetilamonio, cloruro de alquildimetilbencilamonio, bromuro de bencildimetildodecilamonio, bromuro de bencildimetilhexadecilamonio, bromuro de bencildimetiltetradecilamonio, bromuro de cetildimetiletilamonio, bromuro de cetilpiridinio; yoduro de pentafluoro-octadecilo, bromuro de perfluoro-octilo, perfluorodecalina, perfluorododecalina, yoduro de perfluoro-octilo, perfluorotripropilamina y perfluorotributilamina. Polímeros útiles para uso en la presente invención incluyen proteínas, particularmente albúmina, en particular albúmina de suero humano, y otros polímeros biocompatibles, incluidos policianoacrilato y poli(butiloxicarbonilmetil)glutamato. La naturaleza de la envuelta de microburbujas determina la flexibilidad de la microburbuja, el efecto de los ultrasonidos y las propiedades de unión a tipos de células específicos.

En las envueltas de microburbujas se pueden incluir opcionalmente componentes adicionales para impartir características deseadas a las microburbujas. La microburbuja puede comprender una molécula de ligando o diana incluida en o unida a la membrana de la microburbuja, en donde la molécula de ligando o diana se une a una superficie o tejido diana. Véanse, por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 6.245.318; patente de Estados Unidos N° 6.264.917; P. A. Dayton, et al., "Targeted imaging using ultrasound" J. of Magn. Reson. Imaging, 2002, 16(4), 362-77; S. H. Bloch, et al, "Targeted imaging using ultrasound contrast agents", IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine, 2004, 23(5), 18-29; A. Klibanov, et al, solicitud de patente de Estados Unidos N° de pub. 2005/0260189. Microburbujas que incorporan tales sustancias diana dentro de su envuelta se incluyen dentro del alcance de la invención. Ejemplos de moléculas diana de este tipo que pueden incluirse incluyen: anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, moléculas de adhesión celular, sus receptores, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas peptídicas, miméticos de péptidos, y fragmentos de los mismos; agonistas/antagonistas no peptídicos o aglutinantes no bioactivos de receptores para moléculas de adhesión celular, citoquinas, factores de crecimiento y hormonas peptídicas; oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados; sustratos o inhibidores de la proteasa; ligandos de moléculas pequeñas de receptores biológicos; proteasas inactivadas. En el caso de que los ligandos o moléculas diana sean biopolímeros, y los métodos y las composiciones de la invención se utilicen en seres humanos, las moléculas son preferiblemente de origen humano para reducir la posibilidad de inmunogenicidad.

Clases representativas de gases para la inclusión en la microburbuja incluyen, por lo tanto, gases comunes tales como aire; nitrógeno; oxígeno; dióxido de carbono; hidrógeno; gases inertes tales como helio, argón, xenón o criptón; fluoruros de azufre tales como hexafluoruro de azufre, decafluoruro de diazufre o pentafluoruro de trifluorometilazufre; hexafluoruro de selenio; silanos opcionalmente halogenados tales como metilsilano o dimetilsilano; hidrocarburos de bajo peso molecular (p. ej. que contienen hasta 7 átomos de carbono), por ejemplo alcanos tales como metano, etano, un propano, un butano o un pentano, cicloalcanos tales como ciclopropano, ciclobutano o ciclopentano, alquenos tales como etileno, propeno, propadieno o un buteno y alquinos tales como acetileno o propino; éteres tales como dimetiléter; cetonas; ésteres; hidrocarburos halogenados de bajo peso molecular (p. ej. que contienen hasta 7 átomos de carbono); y sus mezclas. Ventajosamente, al menos algunos de los átomos de halógeno en los gases halogenados son átomos de flúor tal como, por ejemplo, en

bromoclorodifluorometano, clorodifluorometano, diclorodifluorometano, bromotrifluorometano, clorotrifluorometano, cloropentafluoroetano, diclorotetrafluoroetano, clorotrifluoroetileno, fluoroetileno, fluoruro de etilo, 1,1-difluoroetano y perfluorocarbonos. Otros gases halogenados incluyen cloruro de metilo, cetonas fluoradas (p. ej., perfluoradas) tales como perfluoroacetona, y éteres fluorados (p. ej., perfluorados) tales como perfluorodietiléter, y tioéteres tales como sulfuro de trifluorometilo. Ejemplos específicos de gases que se pueden utilizar en la presente invención incluyen:

5 aire, aleno, argón, bromoclorofluorometano, bromoclorodifluorometano, bromodifluorometano, bromofluorometano, 3-bromo-1-penteno, bromotrifluorometano, 1,2-butadieno, 1,3-butadieno, 1-buteno, 2-buteno, 1-butino, 2-butino, dióxido de carbono, sulfuro de carbonilo, 1-cloro-1,1-difluoroetano, 2-cloro-1,1-difluoroetano, 1-cloro-1,1,2,2-tetrafluoroetano, clorociclopenteno, clorodifluorometano, clorodifluoronitrometano, cloroetano, clorofluorometano, 2-cloro-1,1,1,4,4,4-hexafluorobutino, 1-chloro-1,1,2,2,2-pentafluoroetano, 1-cloro-1,2,2,2-tetrafluoroetano, clorotrifluorometano, ciclobutano, ciclopropano, 1,1,1,2,2,3,4,5,5,5-decafluoropentano, dibromodifluorometano, 1,2-dibromo-1,1,2,2-tetrafluorometano, 1,1-diclorodiacetileno, 1,1-dicloro-2,2-difluoroetileno, 1,2-dicloro-1,2-difluoroetileno, diclorodifluorometano, 1, 1-dicloroetano, 1, 1-dicloroetileno, diclorofluorometano, 1,1-dicloro-1-fluoroetano, 1,1-dicloro-1,2,2,2-tetrafluoroetano, 2,2-dicloro-1,1,1-trifluoroetano, 1,1-difluoroetano, 1,2-difluoroetano, 1,2-difluoroetileno, difluorometano, 2,2-difluoropropano, 1,1-dimetilciclopropano, 1,2-dimetilciclopropano, dimetiletilamina, 2,3-dimetil-2-norbornano, 2,2-dimetilpropano, etano, etilciclopropano, 3-etil-3-metildiaziridina, etilvinil-éter, fluoroetano, 1-fluorobutano, helio, 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano, hexafluoro-1,3-butadieno, 1,1,1,2,3,3-hexafluoro-2,3-dicloropropano, 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropano, hexafluoro-2-metil-1-buteno, 1,1,1,2,2,3-hexafluoropropano, hexafluoropropileno, yodotrifluorometano, criptón 3-metil-1-buteno, 2-metil-1-buteno-3-ino, 3-metil-1-butino, metilciclobutano, metilciclopropano, isopropilacetileno, metano, 2-metil-1,3-butadieno, 2-metil-butano, metiléter, metil-isopropil-éter, lactato de metilo, nitrito de metilo, sulfuro de metilo, metilvinil-éter, neón, nitrógeno, óxido nitroso, 1-nonen-3-ino, octafluoro-2-buteno, octafluorociclobutano, octafluorociclopenteno, oxígeno, 1,4-pentadieno, n-pentano, 1,1,1,3,3-pentafluorobutano, pentafluoroetano, 1,1,1,3,3-pentafluoropropano, 1-penteno, E-2-penteno, Z-2-penteno, perfluorobutano, perfluoro-1-buteno, perfluoro-2-buteno, perfluoro-2-butino, perfluorociclobuteno, perfluorodimetilamina, perfluoroetano, perfluorometano, perfluorohexano, perfluoropentano, perfluoro-1-penteno, perfluoropropano, perfluoropropileno, propano, propeno, propino, hexafluoruro de selenio, hexafluoruro de azufre, tetrafluoroaleno, 1,1,1,2 tetrafluoroetano, 1,1,2,2-tetrafluoroetano, tetrafluorometano, triclorofluorometano, pentafluoruro de trifluorometilazufre, 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano, 1,1,1-trifluoroetano, trifluorometano, vinil-acetileno, viniléter, y xenón, y sus mezclas.

Gases preferidos de la invención son compuestos fluorocarbonados, incluidos perfluorocarbonos, incluidos perfluoroalcanos; hidrofluorocarbonos, incluidos hidrofluoroalcanos; clorofluorocarbonos, incluidos clorofluoroalcanos; hidroclorefluorocarbonos, incluidos hidroclorefluoroalcanos; y halones (haloalcanos que contienen bromo, flúor y, opcionalmente, cloro). Los perfluorocarbonos, en particular perfluoroalcanos, son particularmente preferidos. Perfluorocarbonos representativos incluyen perfluoroalcanos tales como perfluoroetano, perfluoroetano, perfluoropropanos, perfluorobutanos (p. ej. perfluoro-n-butano, opcionalmente en mezcla con otros isómeros tales como perfluoro-iso-butano), perfluoropentanos, perfluorohexanos o perfluoroheptanos; perfluoroalquenos tales como perfluoropropeno, perfluorobutenos (p. ej. perfluorobut-2-eno), perfluorobutadieno, perfluoropentenos (p. ej., perfluoropent-1-eno) o perfluoro-4-metilpent-2-eno; perfluoroalquinos tales como perfluorobut-2-ino; y perfluorocicloalcanos tales como perfluorociclobutano, perfluorometilciclobutano, perfluorodimetilciclobutanos, perfluorotrimetilciclobutanos, perfluorociclopentano, perfluorometilciclopentano, perfluorodimetilciclopentanos, perfluorociclohexano, perfluorometilciclohexano o perfluorocicloheptano. También se prefiere el hexafluoruro de azufre. De estos gases, perfluoropropano y perfluorobutano son especialmente preferidos debido a su demostrada seguridad para la inyección intraocular en seres humanos. Se han utilizado en estudios con seres humanos para inyecciones intraoculares para estabilizar los desprendimientos de retina. Son también útiles en la invención otros gases inertes tales como hexafluoruro de azufre.

El gas llena preferiblemente al menos el 50% del hueco dentro de la envuelta de la microburbuja, llenando en algunas realizaciones al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% del hueco. En algunas realizaciones, el gas llena sustancialmente el hueco dentro de la envuelta de la microburbuja.

Además del agente tensioactivo, puede ser deseable incorporar otros agentes dentro de la fase acuosa para la formación de microburbujas, o para la formulación de microburbujas para su uso in vivo. Tales agentes pueden incluir ventajosamente modificadores convencionales de la viscosidad, tampones tales como tampones fosfato u otros tampones biocompatibles convencionales o agentes de ajuste del pH tales como ácidos o bases, y agentes osmóticos (para proporcionar isotonicidad, hiperosmolaridad o hiposmolaridad). Disoluciones preferidas tienen un pH de aproximadamente 7 y son isotónicas. Ejemplos de tales agentes incluyen cloruro de sodio y sacarosa. Disoluciones de microburbujas se pueden estabilizar, por ejemplo, mediante la adición de una amplia diversidad de modificadores de la viscosidad, que incluyen, pero no se limitan a hidratos de carbono y sus derivados fosforilados y sulfonados; poliéteres, preferiblemente con intervalos de pesos moleculares entre 400 y 8000; di- y tri-hidroxi-alcanos y sus polímeros, preferiblemente con intervalos de pesos moleculares entre 800 y 8000. Glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, polivinilpirrolidona y poli(alcohol vinílico) también pueden ser útiles como estabilizadores en la presente invención.

Opcionalmente, las microburbujas de la invención pueden encapsular además una o más sustancias. Ejemplos incluyen moléculas terapéuticas o agentes de contraste.

- 5 Los agentes de contraste incluyen gases paramagnéticos tales como aire atmosférico, que contiene trazas de oxígeno 17, o iones paramagnéticos tales como Mn^{2+} , Gd^{2+} y Fe^{3+} , así como partículas superparamagnéticas (ferritas, óxidos de hierro Fe_3O_4) y, por lo tanto, se pueden utilizar como agentes de contraste de susceptibilidad para formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), iones metálicos radiopacos tales como yodo, bario, bromo o wolframio, para su uso como agentes de contraste de rayos X, y gases procedentes de núcleos cuadrupolares, que puede tener un potencial para su uso como agentes de contraste de resonancia magnética.

- Moléculas terapéuticas ilustrativas incluyen agentes antineoplásicos, tales como compuestos de platino (p. ej., espiroplatino, cisplatino y carboplatino), metotrexato, fluorouracilo, adriamicina, mitomicina, ansamitocina, bleomicina, arabinósido de citosina, arabinosil adenina, mercaptopurina, vincristina, busulfán, clorambucilo, melfalán (p. ej., PAM, L-PAM o mostaza de fenilalanina), mercaptopurina, mitotano, hidroclicloruro de procarbazona, dactinomicina (actinomicina D), hidroclicloruro de daunorubicina, hidroclicloruro de doxorubicina, taxol, mitomicina, plicamicina (mitramicina), aminoglutetimida, fosfato de estramustina sódico, flutamida, acetato de leuprolida, acetato de megestrol, citrato de tamoxifeno, testolactona, trilostano, amsacrina (m-AMSA), asparaginasa (L-asparaginasa) Erwinia asparaginasa, etopósido (VP-16), interferón α -2a, interferón α -2b, tenipósido (VM-26), sulfato de vinblastina (VLB), sulfato de vincristina, bleomicina, sulfato de bleomicina, metotrexato, adriamicina, arabinosil, hidroxurea, procarbazona y dacarbazina; inhibidores mitóticos tales como etopósido y los alcaloides de vinca; radiofármacos tales como productos de yodo y fósforo radiactivos; hormonas tales como progestinas, estrógenos, anti-estrógenos, hormona de crecimiento, hormona estimulante de melanocitos, estradiol, dipropionato de beclometasona, betametasona, acetato de betametasona y fosfato sódico de betametasona, fosfato disódico de betametasona, fosfato sódico de betametasona, acetato de cortisona, dexametasona, acetato de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, flunisolida, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, cipionato de hidrocortisona, fosfato sódico de hidrocortisona, succinato sódico de hidrocortisona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona, acetato de parametasona, prednisolona, acetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, tebutato de prednisolona, prednisona, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, diacetato de triamcinolona, hexacetónido de triamcinolona, acetato de fludrocortisona, oxitocina, vasopresina, y sus derivados; anti-helmínticos, vitaminas tales como cianocobalamina, ácido retinoico, retinoides y derivados tales como palmitato de retinol y α -tocoferol; péptidos incluidas enzimas tales como manganeso superóxido dismutasa y fosfatasa alcalina; agentes anti-alérgicos tales como amelexanox; agentes anti-coagulación tales como fenprocumón y heparina; fármacos para la circulación tales como propranolol; potenciadores metabólicos tales como glutatión; fármacos antituberculosos tales como ácido para-aminosalicílico, isoniazida, sulfato de capreomicina, cicloserina, hidroclicloruro de etambutol etionamida, pirazinamida, rifampicina y sulfato de estreptomycin; fármacos antivirales tales como aciclovir, amantadina azidotimidina (AZT, DDI, foscarnet, o zidovudina), ribavirina y vidarabina monohidrato (adenina arabinósido, ara- A); fármacos antianginosos tales como diltiazem, nifedipina, verapamil, tetranitrato de eritritol, dinitrato de isosorbida, nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) y tetranitrato de pentaeritritol; antibióticos como dapsona, cloranfenicol, neomicina, cefaclor, cefadroxilo, cefalexina, cefradina eritromicina, clindamicina, lincomicina, amoxicilina, ampicilina, bacampicilina, carbenicilina, dicloxacilina, ciclacilina, picloxacilina, hetacilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, penicilina, incluida la penicilina G y penicilina V, ticarcilina, rifampicina y tetraciclina; fármacos antiinflamatorios tales como diflunisal, ibuprofeno, indometacina, meclofenamato, ácido mefenámico, naproxeno, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina, aspirina y salicilatos; fármacos antiprotozoarios tales como cloroquina, hidroxicloroquina, metronidazol, quinina y antimonato de meglumina; fármacos antirreumáticos tales como penicilamina; narcóticos como paregórico; opiáceos tales como codeína, heroína, metadona, morfina y opio; glucósidos cardíacos tales como deslanosida, digitoxina, digoxina, digitalina y digitalis; bloqueadores neuromusculares tales como mesilato de atracurio, trietioduro de galamina, bromuro de hexafluorenio, yoduro de metocurina, bromuro de pancuronio, cloruro de succinilcolina (cloruro de suxametonio), cloruro de tubocurarina y bromuro de vecuronio; sedantes (hipnóticos) tales como amobarbital, amobarbital sódico, aprobarbital, butobarbital sódico, hidrato de cloral, etclorvinol, etinamato, hidroclicloruro de flurazepam, glutetimida, hidroclicloruro de metotrimeprazina, metiprilona, hidroclicloruro de midazolam, paraldehido, pentobarbital, pentobarbital sódico, fenobarbital sódico, secobarbital sódico, talbutal, temazepam y triazolam; anestésicos locales tales como hidroclicloruro de bupivacaína, hidroclicloruro de cloroprocaina, hidroclicloruro de etidocaína, hidroclicloruro de lidocaína, hidroclicloruro de mepivacaína, hidroclicloruro de procaína e hidroclicloruro de tetracaína; anestésicos generales tales como droperidol, etomidato, citrato de fentanilo con droperidol, hidroclicloruro de ketamina, metohexital sódico y tiopental sódico; partículas radiactivas o iones tales como estroncio, yoduro de renio e itrio; y profármacos, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos N° 6.443.898.
- 60 Típicamente, a la disolución que contiene el ácido nucleico de interés se añade una cantidad de aproximadamente 10% a aproximadamente 60% de microburbujas.

La composición farmacéutica de la invención también puede comprender un soporte, excipiente o diluyente

compatible o fisiológicamente aceptable.

El término o expresión "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inapropiada cuando se administra a un mamífero, especialmente a un ser humano, según corresponda. Un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semi-sólida o líquida no tóxica, diluyente, material de encapsulación o adyuvante de la formulación de cualquier tipo.

Soporte, excipiente o diluyente farmacéuticamente compatible o fisiológicamente aceptable incluye diluyentes y cargas que son farmacéuticamente aceptables para los métodos de la invención, son estériles, y pueden seleccionarse de disoluciones o suspensiones de neutras a de carácter ligeramente ácido, isotónicas tamponadas (incluidos fosfatos, cloruro, etc.), acuosas u oleaginosas, y más preferiblemente de sacarosa, trehalosa, tensioactivos, proteínas y aminoácidos. El soporte, excipiente o diluyente farmacéuticamente compatible o fisiológicamente aceptable se formula preferiblemente utilizando adecuados agentes dispersantes, humectantes, de suspensión, calmantes, isotónicos o formadores de viscosidad, estabilizantes, conservantes y tampón apropiado para formar una disolución isotónica. El soporte farmacéuticamente aceptable particular y la relación de compuesto activo a soporte están determinados por la solubilidad y las propiedades químicas de la composición, el modo particular de administración y la práctica farmacéutica estándar. Los expertos en la técnica entenderán cómo formular tales vehículos por técnicas conocidas.

Un ejemplo de estabilizadores es edetato disódico o similares. Ejemplos de agentes isotónicos son glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sorbitol y manitol o similares. Ejemplos de tampones son ácido cítrico, hidrógeno-fosfato de sodio, ácido acético glacial y trometamol o similares. Ejemplos de ajustadores del pH son ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido acético, hidróxido de sodio, carbonato de sodio e hidrógeno-carbonato de sodio o similares. Un ejemplo de agentes calmantes es alcohol bencílico o similares. Ejemplos de conservantes son cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, ésteres de p-hidroxibenzoato, benzoato de sodio y clorobutanol o similares.

Puede ser deseable una viscosidad mayor que la de las disoluciones acuosas simples para aumentar la absorción ocular del compuesto activo, para reducir la variabilidad en la dispensación de las formulaciones, para disminuir la separación física de los componentes de una suspensión o emulsión de la formulación y/o de otra manera para mejorar la formulación oftálmica. Agentes de viscosidad de este tipo incluyen, por ejemplo, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropil-metilcelulosa, hidroxietil-celulosa, carboximetil-celulosa, hidroxipropil-celulosa u otros agentes conocidos por los expertos en la técnica. Tales agentes se emplean típicamente a un nivel de aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 2% en peso.

Formas de preparación de la composición farmacéutica destinada para la administración al músculo ciliar o células de sujetos son preferiblemente preparados líquidos. Los preparados líquidos se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo el agente biológicamente activo en BSS (siglas inglesas de disolución salina equilibrada), una disolución de glicerol, una disolución de ácido hialurónico y similares. Una composición particular comprende, por ejemplo, BBS (60%) y ácido hialurónico (40%). Un estabilizador, un agente isotónico, un tampón, un ajustador del pH, un agente calmante, un conservante, electrolitos tales como sodio, potasio, calcio, magnesio y/o cloruro o similares se pueden añadir opcionalmente en una cantidad adecuada a los preparados líquidos.

La composición farmacéutica puede comprender o el agente biológicamente activo se puede combinar (en un uso de acuerdo con la presente invención) con cualquier ingrediente activo o adyuvante adicional. El adyuvante puede seleccionarse de cualquier sustancia, mezcla, soluto o composición que facilite o aumente la actividad biológica del agente profiláctico o terapéutico tal como cualquier agente biológico, sintético o biosintético que mejore el suministro o la transferencia de dicho agente y pueda ser asimilado a un vector (como soporte de suministro) de acuerdo con la invención. El adyuvante puede estar acondicionado y puede administrarse por separado o secuencialmente a partir de la composición que contiene agente profiláctico o terapéutico y/o en un sitio distinto de inyección. El tratamiento con múltiples agentes y/o adyuvantes de acuerdo con la invención no necesita hacerse utilizando una mezcla de agentes y/o adyuvantes, sino que se puede hacer utilizando preparados farmacéuticos separados. Los preparados no tienen por qué ser suministrados exactamente al mismo tiempo, sino que pueden coordinarse para ser suministrados a un paciente durante el mismo período de tratamiento, es decir, en el espacio de una semana o un mes o entre sí.

Cualesquiera agentes terapéuticos adecuados se pueden coordinar con las composiciones de la presente invención. Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden administrarse, además del o de los agentes biológicamente activos (profilácticos o terapéuticos) anteriores a través de un método de acuerdo con la presente invención también incluyen agentes permeabilizantes tal como un virus, una vesícula lipídica, ácido hialurónico, iones positivos basados en lípidos, emulsiones policatiónicas, péptidos catiónicos, polyplex, etc.; antibióticos y agentes antimicrobianos tales como hidrocloruro de tetraciclina, leucomicina, penicilina, derivados de penicilina, eritromicina,

sulfatiazol y nitrofurazona; anestésicos locales tales como benzocaína; vasoconstrictores tales como hidrocloreto de fenilefrina, hidrocloreto de tetrahidrozolina, nitrato de nafazolina, hidrocloreto de oximetazolina e hidrocloreto de tramazolina; cardiotónicos tales como digitalis y digoxina; vasodilatadores tales como nitroglicerina e hidrocloreto de papaverina; antisépticos tales como hidrocloreto de clorhexidina, hexilresorcinol, cloruro de dequalinio y etacridina; 5 enzimas tales como cloruro de lisozima y dextranasa; hipotensores; sedantes; agentes antitumorales; agentes anti-inflamatorios esteroides tales como hidrocortisona, prednisona, fluticasona, prednisolona, triamcinolona, acetónido, dexametasona, betametasona, beclometasona, y dipropionato de beclometasona; agentes antiinflamatorios no esteroides tales como acetaminofeno, aspirina, aminopirina, fenilbutazona, ácido mefanámico, ibuprofeno, diclofenaco sódico, indometacina, colchicina, y probenocid; 10 agentes anti-inflamatorios enzimáticos tales como quimotripsina y seratiopeptidase bromelaína; agentes anti-histamínicos tales como hidrocloreto de difenhidramina, maleato de clorfeniramina y clemastina; agentes antialérgicos; y compuestos analgésicos.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones de la presente invención pueden adaptarse a fin de obtener una cantidad de ingrediente activo que sea eficaz para obtener una actividad biológica deseada. Se debe entender, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular 15 dependerá de una diversidad de factores, incluido el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo, las tasas de absorción y excreción, combinación con otros fármacos y la gravedad de la enfermedad particular que esté siendo tratada. La composición farmacéutica de la invención puede ser suministrada al músculo ciliar en múltiples sitios de inyección. El suministro también se puede repetir en el tiempo.

El ultrasonido es un sonido de alta frecuencia, con una frecuencia de aproximadamente 10 kHz o mayor. Frecuencias que se prefieren para uso en la presente invención son aquellas por encima del intervalo de la audición humana, en el intervalo de frecuencia de aproximadamente 800 kHz a aproximadamente 3 MHz. La frecuencia y la intensidad utilizadas de los ultrasonidos se determinan por el requisito para lograr la destrucción selectiva de 25 microburbujas en el sitio de suministro. Se han estudiado y son conocidos por la persona experta en la técnica los parámetros necesarios para optimizar la destrucción de microburbujas. En general, se espera que intensidades de ultrasonidos en el intervalo de aproximadamente 700 kPa y 200 kPa de presión pico negativa será eficaz para destruir las microburbujas selectivamente en el sitio de suministro. El ultrasonido puede ser aplicado con cualquier dispositivo de ultrasonidos bien conocido en la técnica. Por ejemplo, el dispositivo puede estar compuesto de una sonda enfocada o desenfocada que se aplica a la superficie ocular después de interposición de gel. La sonda es de 30 1 mm de diámetro a 15 mm de diámetro. Típicamente, el dispositivo proporciona una señal ultrasónica de 800 kHz a 3 MHz, con una intensidad de salida I_{sata} (siglas inglesas de intensidad media temporal media espacial) que oscila entre $0,5 \text{ W/cm}^2$ y 5 W/cm^2 . La señal es suministrada durante un período que oscila entre 20 s y 5 min. El dispositivo de ultrasonidos puede ser suministrado en un modo de impulso-eco o en un modo continuo.

La combinación del dispositivo de ultrasonidos con un sistema de formación de imágenes por biomicroscopía de ultrasonido (UBM) en tiempo real puede ser particularmente adecuada para permitir la visualización de la región 35 ciliar y para guiar la aguja de inyección con mayor precisión para el suministro local de genes.

Las microburbujas son destruidas en la zona de tratamiento con ultrasonidos, liberando su contenido. La cavitación también crea pequeñas ondas de choque que aumentan la permeabilidad de la célula, permitiendo el suministro del ácido nucleico terapéutico de interés. El uso de microburbujas puede también limitar la cantidad de la respuesta inflamatoria y puede permitir inyecciones repetidas. Las microesferas llenas de gas reducen eficazmente el umbral de energía de cavitación no térmica. 40

Ejemplos de enfermedades oculares que pueden tratarse mediante el método de la presente invención incluyen enfermedades oculares proliferativas, enfermedades oculares neurodegenerativas, glaucoma, enfermedades oculares infecciosas, enfermedades oculares inflamatorias (tales como conjuntivitis, queratitis, endotelitis, uveítis, coroiditis, retinitis, retinocoroiditis, uveítis anterior, y neuropatías ópticas inflamatorias), degeneraciones de la retina 50 (en particular, retinitis pigmentosa, degeneración periférica de la retina, degeneración macular tal como degeneración macular seca relacionada con la edad), retinopatía isquémica (en particular, retinopatía del prematuro y retinopatía diabética), enfermedades vasculares de la retina, síndrome de isquemia ocular y otras anomalías vasculares, trastornos y tumores coroidales, trastornos vítreos, proliferación glial tal como vitrorretinopatía proliferativa y proliferación glial asociada a angiogénesis pre-retinal diabética, etc. Se describen a continuación las principales enfermedades que pueden ser prevenidas o tratadas mediante la presente invención. 55

La inflamación intraocular reagrupa todos los tipos de inflamación de los tejidos intraoculares, principalmente úvea y la retina. Inflamaciones intraoculares pueden ser por causas inmunológicas, causas infecciosas, causas iatrogénicas o de etiologías desconocidas. Pueden ser agudas, recurrentes o crónicas. Las inflamaciones intraoculares se encuentran entre la mayoría de las causas de ceguera curable. Inflamaciones intraoculares del segmento posterior pueden estar asociadas a vasculitis, neuritis óptica, vitritis y retinitis corea. 60

Distrofias hereditarias de la retina o la retinitis pigmentosa son enfermedades hereditarias que causan ceguera

debido a mutaciones o deleciones en genes implicados en el ciclo visual. Comienzan en edad temprana y progresan lentamente hasta la ceguera total. La pérdida de fotorreceptores se asocia a la pérdida de células pigmentarias de la retina y a la atrofia vascular y del nervio óptico en las etapas posteriores. Algunas de éstas son la degeneración heredada debido a la mutación en el ADN mitocondrial.

5 Hay dos tipos principales de glaucoma: glaucoma crónico o glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) y el glaucoma agudo de ángulo cerrado. Otras variaciones incluyen glaucoma congénito, glaucoma pigmentario, glaucoma neovascular y glaucoma secundario. El glaucoma es similar a la hipertensión ocular, pero con una lesión acompañante del nervio óptico y pérdida de la visión. El glaucoma suele tratarse con gotas para los ojos, láser o cirugía ocular convencional. Si no se trata, el glaucoma causará ceguera.

15 La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos capilares que conducen a la neovascularización. La angiogénesis es un proceso complejo que incluye una serie de pasos secuenciales que incluyen la degradación mediada por células endoteliales de la membrana basal vascular y matrices intersticiales, la migración de células endoteliales, la proliferación de células endoteliales y la formación de bucles capilares por parte de células endoteliales. Aunque la angiogénesis es un proceso normal para el desarrollo o el mantenimiento de la vasculatura, condiciones patológicas (es decir, enfermedades dependientes de la angiogénesis) surgen en los casos en los que el crecimiento de los vasos sanguíneos es en realidad perjudicial. La angiogénesis está especialmente asociada con enfermedades importantes del tejido ocular, incluidas retinopatías diabéticas, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía del prematuro, rechazo del injerto de córnea, glaucoma neovascular y cicatrización de la córnea. Cualquier crecimiento anormal de los vasos sanguíneos en el ojo puede dispersar y bloquear la luz incidente antes de llegar a la retina. La neovascularización puede ocurrir en casi cualquier sitio en el ojo y puede alterar significativamente la función del tejido ocular. Algunas de las enfermedades neovasculares oculares más amenazantes son los que implican la retina. Por ejemplo, muchos pacientes diabéticos desarrollan una retinopatía que se caracteriza por la formación de nuevos vasos sanguíneos, con fugas en la superficie anterior de la retina y en el vítreo que causa la vitreorretinopatía proliferativa. Un subconjunto de pacientes con degeneración macular relacionada con la edad desarrollan una neovascularización subretiniana que conduce a su ceguera final.

30 La retinopatía diabética se produce cuando los vasos de la retina dentro del ojo rezuman sangre y fluidos en el tejido circundante. Alrededor del 80% de los pacientes con diabetes desarrollan una retinopatía diabética. Esta enfermedad se trata generalmente utilizando un láser. Sin embargo, la terapia con láser implica complicaciones, incluida la oclusión venosa de la retina, pérdida de la agudeza visual, hemorragia vítrea y, a veces, fracasa. Si no se trata, la retinopatía diabética puede causar ceguera.

35 La retinopatía del prematuro (ROP) afecta a los bebés nacidos prematuramente. Consiste en el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos dentro de la retina y el vítreo. La progresión a etapas posteriores de la ROP puede conducir a la formación de tejido cicatricial en la retina, hemorragia vítrea y desprendimiento de retina. El tratamiento se realiza generalmente por láser o crioterapia (congelación).

40 Las retinopatías isquémicas son retinopatías asociadas a la oclusión vascular (capilares o vasos grandes) que conducen al sufrimiento neuroretiniano, la muerte de las células y la neo-angiogénesis. La degeneración macular es una enfermedad que afecta a la visión central y conduce a la pérdida de la visión. Aunque existen formas de degeneración macular que golpean a los jóvenes, la afección se presenta con mayor frecuencia en personas que tienen más de 60 años de edad. Este trastorno se denomina, por lo tanto, degeneración macular relacionada con la edad (AMD). Debido a que sólo el centro de la visión de una persona se ve afectado por lo general, rara vez se produce una ceguera a partir de esta enfermedad. Sin embargo, la lesión de la mácula en el centro de la retina puede destruir la capacidad de ver claramente en línea recta. Formas secas asocian degeneración de neuroretina, células RPE y coroides. Formas húmedas asocian fenómenos previamente descritos y el crecimiento de neovasos de los coriocapilares y/o los vasos de la retina, desprendimiento y hemorragias sub-retinales, hemorragias y desgarros sub-epiteliales, etc. La degeneración macular se produce habitualmente después de la edad de sesenta años. Al tiempo que se reduce la visión central, la mayoría de los pacientes conservar cierta visión y nunca pasan a ser totalmente ciegos.

55 La queratitis es una inflamación de la córnea. La queratitis puede ser causada por infecciones bacterianas, virales o fúngicas, ojos secos resultantes de trastornos del párpado o capacidad disminuida de formar lágrimas, exposición a la luz muy brillante, objetos extraños que lesionan o se alojan en el ojo, sensibilidad o reacciones alérgicas a maquillaje de ojos, polvo, polen, contaminación u otros irritantes y deficiencia de vitamina A.

60 El pucker macular (también denominado membrana epirretinial, formación de arrugas de la retina, fibrosis premacular y maculopatía celofán) es debido muy frecuentemente a la contracción relacionada con la edad del vítreo que se aleja de la retina, provocando que la retina cicatrice y se formen arrugas. Otras causas del pucker macular incluyen trauma (de una cirugía o una lesión en el ojo), desprendimiento de retina, inflamación y problemas en los vasos sanguíneos de la retina. El único tratamiento es la cirugía que consiste en una vitrectomía (separación del

vítreo) combinado con desprender el tejido de la cicatriz. La complicación más común de la vitrectomía es un aumento en la tasa de desarrollo de cataratas.

5 La enfermedad de ojo tratado puede elegirse entre escleritis, conjuntivitis, queratitis, endotelitis, uveítis, coroiditis, retinitis, retinocoroiditis, uveítis anterior, retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, retinopatía proliferativa vítreo, distrofias retinianas heredadas, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma de ángulo abierto, glaucoma neovascular, retinopatía isquémica, etc.

10 Un aspecto particular de la invención es una composición para uso en un método de tratamiento de la uveítis crónica que comprende suministrar al músculo ciliar de un sujeto que padece la misma un ácido nucleico que codifica un receptor soluble para TNF alfa.

15 Otro aspecto particular de la invención es una composición para uso en un método de tratamiento de neovasos intraoculares o edema macular que comprende suministrar al músculo ciliar de un sujeto que padece el mismo un ácido nucleico que codifica un anti-VEGF, un receptor anti-VEGF o un anti-PLGF.

20 Un aspecto particular adicional de la invención es una composición para uso en un método para tratar o retrasar la retinitis pigmentosa que comprende suministrar al músculo ciliar de un sujeto que padece la misma un ácido nucleico que codifica un factor neurotrófico tal como se describe arriba.

Otro aspecto particular de la invención es una composición para uso en un método para tratar la retinopatía diabética que comprende suministrar al músculo ciliar de un sujeto que padece la misma un ácido nucleico que codifica un anti-IRS-1 o IGF-1.

25 La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica formulada con microburbujas de agente de contraste ecográfico y a un ácido nucleico terapéutico de interés para su uso en un método para tratar una enfermedad ocular en un sujeto, en que dicho método comprende las etapas que consisten en i) suministrar dicha composición farmacéutica al músculo ciliar del sujeto y ii) exponer a ultrasonidos la región en la que se suministró la composición farmacéutica para inducir la transfección de dicho ácido nucleico terapéutico de interés dentro de dicho músculo ciliar.

35 De acuerdo con las composiciones para uso de acuerdo con la presente invención, se prevén kits para prevenir o tratar una enfermedad ocular. Dispositivos y la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención pueden suministrarse juntos en un kit. Dentro del kit, los componentes pueden estar envasados o contenidos por separado. También se pueden suministrar al kit otros componentes tales como excipientes, soportes, otros fármacos o adyuvantes, instrucciones para la administración de la sustancia activa o la composición, y dispositivos de administración o inyección. Las instrucciones pueden estar en forma escrita, en vídeo o en audio, puede estar contenida en papel, en un soporte electrónico, o incluso como una referencia a otra fuente tal como un sitio web o un manual de referencia.

40 La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

EJEMPLO:

45 **Material y Métodos**

Animales: ratas Lewis hembra, con un peso de 150 a 200 g, se adquirieron de Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Francia) a las 7 semanas de edad y fueron alojadas en las instalaciones de la solicitante durante 1 semana antes de su inclusión en el estudio. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Para los experimentos, las ratas se anestesiaron mediante inyección intramuscular de una mezcla de ketamina 1000 (80 mg/kg; Virbac, Carros, Francia) y Largactil (0,5 mg/kg; Sanofi-Aventis, París, Francia). Al final de los experimentos, las ratas fueron sacrificadas por inhalación de dióxido de carbono.

55 **Plásmidos:** Se utilizaron dos plásmidos comercialmente disponibles para dosificar y localizar la expresión de genes informadores en el músculo ciliar: el pCMV-Gluc-1 (Nanolight Technology, Pinetop, AZ, EE.UU.) que codifica una luciferasa *Gaussia* secretada bajo el control de un promotor de citomegalovirus (CMV), adquirido de Clontech (Palo Alto, CA, EE.UU.), y el pVAX1-lacZ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), que contiene el gen *lacZ* bajo el control de un promotor de CMV (Clontech, Palo Alto, CA, EE.UU.).

60 Después de la amplificación en *Escherichia coli DH5-alfa*, los plásmidos fueron purificados con kits Nucleobond AX1000 (Macherey-Nagel GmbH & Co, KG) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y luego fueron preparados en las concentraciones apropiadas, con el fin de inyectar 15 µg de plásmidos en 10 µL de solución

salina, es decir, 1,5 µg/µL sin MB o 3 µg/µL con 50% de MB.

Microburbujas (MB): Los autores de la invención utilizaron para todos sus experimentos microburbujas de segunda generación, comercialmente disponibles y listas para usar, proporcionadas por Artison Corp., (Inola, OK, EE.UU.). La MB Artison es un agente de contraste de lípidos-envuelta US llena de gas perfluorocarbono y que mide alrededor de 2,4 µm de diámetro. La disolución de MB se compone de aproximadamente 13×10^8 microesferas por milímetro.

Las MB se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las MB Artison fueron primero re-dispersadas agitando suavemente el vial durante 10 segundos, hasta obtener una suspensión blanca lechosa homogénea, tras lo cual se retiró del vial el volumen deseado de la dispersión. Después, las burbujas se añadieron a la disolución de plásmido y se mezclaron suavemente durante 10 segundos para permitir su combinación inmediatamente antes de su inyección.

Aparato de ultrasonidos: El tratamiento por ultrasonidos (US) se realizó utilizando un sistema de sonoporación diseñado para la investigación: Sonitron 2000, de Artison (Inola, OK, EE.UU.) con un transductor desenfocado plano que opera a 1 MHz o 3 MHz (conmutable). Se seleccionó una sonda de 3 mm de diámetro para suministrar la energía acústica a una zona pequeña para los experimentos con ratas. El transductor tenía una intensidad de salida Isata (intensidad media temporal media espacial) que oscilaba entre 0 y 5 W/cm², ajustable a incrementos de 0,1 W/cm² con ciclos de trabajo (porcentaje de tiempo a lo largo de un período de pulso) que varía de 5 a 100% y de repetición de impulsos de frecuencia variable. La ventaja de un modo pulsado de la aplicación de US es que pueden reducirse los efectos térmicos adversos. El tiempo de tratamiento era ajustable de 0 a 20 minutos.

Sonoporación *in vivo* del músculo ciliar de rata: Para los experimentos de terapia, el ojo se mantuvo en posición mediante una hoja quirúrgica. Quince µg de ADN de plásmido solo o mezclado con MB se inyectaron luego bajo microscopía quirúrgica en el músculo ciliar de los dos ojos de la rata utilizando una aguja desechable de calibre 30 en una microjeringa de 100 µl (jeringa BD-microfina, NM Médica, Asnieres, Francia). Para llegar al músculo ciliar justo por debajo de la esclerótica posterior al limbo (cruce en donde la córnea transparente se une a la esclerótica blanca opaca), la inyección se realizó en la cara temporal superior del limbo. Inmediatamente después de la inyección, la punta de ultrasonidos se aplicó directamente sobre la superficie ocular después de la interposición de un gel de acoplamiento transparente (Gelaser, Alcon, Rueil-Malmaison, Francia) y la región en la que se practicó la inyección fue expuesta a US. La sonda US no se movió durante el tratamiento. Los dos ojos fueron tratados con el mismo procedimiento por el mismo operario. En todos los experimentos, se aplicaron los siguientes ajustes de US: 1 MHz, 2 W/cm² Isata durante 2 minutos, ciclo de trabajo del 50% con una anchura de pulso de 5 ms (en tiempo) y un intervalo de pulsos de 5 ms (fuera de tiempo) y una frecuencia de repetición de pulsos de 100 Hz.

Diseño experimental: Se llevaron a cabo dos conjuntos de experimentos en un total de 36 ratas Lewis. Los dos ojos del mismo animal fueron tratados de una manera idéntica.

El primer conjunto de experimentos tuvo como objetivo evaluar la cinética de la expresión del gen informador de luciferasa en el músculo ciliar los días 7 (n = 20 ratas) y 30 (n = 12 ratas) después de la sonoporación. Para este fin se inyectaron 15 µg de pCMV-Gluc-1 en el músculo ciliar de los dos ojos de todos los animales. Después de la inyección del plásmido, se formaron cuatro grupos experimentales para el ensayo de 7 días. En el primer grupo no se realizó tratamiento adicional alguno para servir como controles (grupo control, n = 10 ojos). En el segundo grupo, la inyección del plásmido fue seguida inmediatamente por la exposición a US (grupo de US, n = 10 ojos). En los dos últimos grupos, se inyectaron en el músculo ciliar el ADN del plásmido mezclado con microburbujas, seguido de tratamiento con US (grupo US+ MB, n = 12 ojos) o sin US (grupo MB, n = 8 ojos). Para el ensayo de 30 días se establecieron grupos similares: grupo control (n = 8 ojos), grupo US (n = 8 ojos) y grupo US + MB (n = 8 ojos). El efecto de microburbujas por sí solo no se evaluó en este momento. Una rata adicional sin tratar se utilizó como control negativo para la expresión de luciferasa en cada momento. Todos los animales fueron sacrificados el día 7 o el día 30 después del tratamiento. Los ojos fueron enucleados y, a continuación, los fluidos oculares (humores acuoso y vítreo) fueron retirados para la evaluación de la actividad de la luciferasa por luminometría.

En los segundos conjuntos de experimentos, los ojos de ratas (n = 4) se utilizaron para analizar la localización de la actividad de β-galactosidasa, después de la sonoporación del plásmido que contiene el gen *LacZ* en el músculo ciliar. Se inyectaron quince µg de pVAX1-LacZ en el músculo ciliar de seis ojos. Después, los ojos se expusieron a ultrasonidos más microburbujas (n = 2 ojos), ya sea a US (n = 2 ojos) o a microburbujas solo (n = 2 ojos). La rata restante, que no recibió inyección ni exposición a US, servía como control. El día 7 después de la transfección, los ojos fueron enucleados y se prepararon para el análisis histoquímico.

Los ojos se examinaron mediante observación a simple vista inmediatamente después de cada uno de los experimentos, y luego 7 y 30 días después de la transfección de genes.

Medición de la actividad de la luciferasa: El día 7 ó 30 después del tratamiento, los ojos tratados con la inyección

intramuscular de 15 µg de pCMV-Gluc-1, con o sin US y/o MB, fueron enucleados. Se retiraron fluidos oculares (humores acuoso y vítreo) y, después de centrifugación a 5000g durante 5 min a 4°C, los sobrenadantes se conservaron a -20°C hasta su uso.

5 La actividad de luciferasa se evaluó en 10 µl de cada una de las muestras colocados en una placa blanca de 96-pocillos (Costar®, tratado con cultivo de tejido, placa blanca) con el Sistema de Ensayo de Luciferasa *Renilla* según el protocolo del fabricante (Promega, Charbonnières, Francia). El detector era un luminómetro Wallac Victor2, Contador 1420 Multi-label (EG & G Wallac, Evry, Francia) que añade 50 µl de sustrato de ensayo de luciferasa (Promega) a la muestra y se integra la luz producida por la muestra durante 10 segundos con una demora de 2
10 segundos. El análisis de los datos se realizó utilizando el software Wallac 1420 workstation. Los resultados se dan para cada una de las muestras en recuentos por segundo (cps). La luminiscencia de fondo era inferior a 120 cps.

Localización de la expresión de beta-galactosidasa en la región ciliar: análisis histoquímico *in situ*: Siete días después del tratamiento, los ojos fueron enucleados, se fijaron en paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,2% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 hora a 4°C y después se enjuagó tres veces en PBS. Los ojos completos fueron posteriormente incubados durante una noche en la oscuridad a temperatura ambiente (37°C) en presencia de un reactivo cromogénico X-gal (1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-d-galactopiranosido, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, Francia) en PBS que contenía 5 mM de K₃Fe(CN)₆, 5 mM de K₄Fe(CN)₆, 2 mM de MgCl₂ y 0,02% de NP-40 para la detección colorimétrica de la actividad de β-galactosidasa. A continuación, los ojos fueron
20 embebidos en parafina, y luego se cortaron en rodajas utilizando un microtomo Microm HM-340E (Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Alemania). Secciones longitudinales 10 µm de espesor se cortaron en paralelo al eje óptico. Una mitad de las secciones de parafina procedente de cada una de las muestras se montó en glicerol/PBS (1:1) y la otra mitad se contratiñó con hemalum-eosina para teñir los núcleos y los citoplasmas, respectivamente. Durante su examen al fotomicroscopio Leitz Aristoplan, las imágenes fueron capturadas utilizando
25 una cámara digital Leica DFC 480, ya sea con una lente de objetivo 10x o 25x y un tiempo de exposición mantenido, respectivamente, en 2,55 ms y 14,9 ms.

Análisis estadístico: El programa utilizado para el análisis de los datos fue GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Los resultados se expresan como media ± error típico de la media (SEM). El análisis de los
30 datos se realizó utilizando un análisis no paramétrico de una vía de la varianza (ANOVA, ensayo Kruskal-Wallis), seguido de un ensayo de comparación múltiple de Dunn. Antes del ANOVA, valores atípicos extremos se identificaron mediante el ensayo de Grubb y se excluyeron del conjunto de datos (un punto por grupo). La significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

35 **Resultados:**

El examen clínico de los ojos tratados de inmediato y los días 7 y 30 después del tratamiento mostraron la ausencia de inflamación o daño ocular grave.

40 **Cinética de la actividad de la luciferasa en fluidos oculares:** La luminiscencia de la *Gaussia-luciferasa* se demostró en fluidos oculares de ratas, 7 días después de la inyección del plásmido pCMV-Gluc-1 (15 µg) en el músculo ciliar en cuatro grupos de tratamiento diferentes. El nivel medio de la actividad de luciferasa en los fluidos oculares se aumentó en ambos grupos tratados con la exposición de US, con o sin MB, en comparación con el grupo control (inyección de ADN solo). En los ojos que recibieron la aplicación de US después de la
45 co-administración de plásmido y MB (n = 11), la actividad de luciferasa en el músculo ciliar fue significativamente mayor en aproximadamente 2,6 veces en comparación con el grupo control (n = 9, $p < 0,05$) o con el grupo MB (n = 7, $p < 0,005$). En contraposición, los US solos (n = 9) indujeron un aumento menor en el nivel de luminiscencia (de 1,5 veces en comparación con el grupo control con una diferencia estadísticamente no significativa). Sólo la diferencia con el grupo MB era estadísticamente significativa ($p < 0,005$). Se detectó una pequeña actividad de luciferasa sin la
50 exposición de US después de la inyección del plásmido solo o mezclado con MB. Los resultados de los autores de la invención muestran una alta dispersión en la actividad de luciferasa, en particular para los grupos tratados con US.

El día 30, la expresión del gen luciferasa se ha reducido en cada uno de los grupos experimentales alrededor de 50% entre los días 7 y 30 después del tratamiento. El análisis estadístico ANOVA demostró que el factor "tiempo" tiene un efecto muy significativo y representa el 14,16% de la varianza total ($p = 0,0029$) y que el factor "grupo" tiene un efecto significativo y representa el 10,84% de la varianza total ($p = 0,0304$). La interacción entre ambos factores no se considera significativa. Ensayos posteriores de Bonferroni determinaron que la luminiscencia se redujo significativamente entre D7 y D30 sólo en el "grupo US + MB" ($p < 0,01$).

60 **Localización de la expresión de β-galactosidasa en la región ciliar:** Siete días después de la sonoporación dirigida al músculo ciliar de un plásmido que contiene el gen informador *LacZ*, la tinción histoquímica reveló que la expresión de β-galactosidasa (células azules) se detectó dentro del campo de aplicación de US en las células de la región ciliar. Este método condujo a la expresión eficaz en la región ciliar en el caso de la aplicación de US + MB y la

aplicación de US, mientras que no se observó actividad de β -galactosidasa alguna en la región ciliar sin aplicación de US alguna (ojo control).

Discusión:

5 El principal objetivo del presente estudio era investigar la viabilidad de la transferencia de genes a los músculos ciliares por sonoporación. Hasta donde tienen conocimiento, el trabajo de los autores de la invención es el primer estudio *in vivo* de la transferencia de ADN de plásmidos al músculo ciliar mediado por US y MB. En el ojo, el músculo liso ciliar ofrece dos ventajas principales. En primer lugar, es un tejido al que se accede fácilmente sin penetración en la cavidad vítrea. En segundo lugar, este músculo se encuentra localizado entre las partes anterior y posterior de la esfera ocular, lo que permite la secreción de proteína en el humor acuoso así como el humor vítreo y la retina. Los experimentos actuales de los autores de la invención, que implican la coadministración de microburbujas y ADN del plásmido, se llevaron a cabo con genes informadores ampliamente utilizados como marcadores para evaluar la eficacia de la tecnología de terapia génica.

15 Los autores de la invención han demostrado que la exposición a ultrasonidos externos en la región ciliar después de una única inyección intramuscular de una mezcla de plásmido que contiene un gen informador y MB es un método sencillo y eficaz para facilitar la transferencia de genes *in vivo* en el músculo ciliar de la rata. La observación de la secreción de proteínas en los fluidos oculares (humores acuoso y vítreo) el día 7 después de sonoporación de 15 μ g de plásmido informador suministrado al músculo ciliar confirma la viabilidad de este método. La captación de luciferasa en el tejido muscular era aproximadamente 2,6 veces mayor en el grupo US + MB en comparación con los controles tratados con inyección de luciferasa solo. Cuando no se suministraron después de la inyección de ADN, la expresión de genes era baja.

25 Además de los beneficios del uso combinado de ultrasonido y microburbujas, el enfoque de los autores de la invención ofrece algunas ventajas específicas para la transferencia de genes por sonoporación ocular. En primer lugar, requiere sólo una aguja intramuscular para la inyección de ADN y la exposición externa a US, que es ampliamente aceptado en la práctica clínica. Su seguridad ha sido bien establecida. Los US se pueden enfocar con precisión en el sitio diana, incluso de pequeño tamaño como lo son los músculos ciliares, para producir el suministro local de genes y son ampliamente utilizados para los exámenes clínicos y terapias.

30 En resumen, este estudio demuestra que el músculo ciliar ocular puede ser fijado como objetivo mediante sonoporación de ADN, lo que permite una secreción de proteínas en la esfera ocular. La sonoporación dirigida a los músculos ciliares tiene un potencial como un proceso de suministro de genes no virales, mínimamente invasivo, seguro y eficaz para el tratamiento de diversas enfermedades oculares.

REFERENCIAS:

40 A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica formulada con microburbujas de agente de contraste ecográfico y un ácido nucleico terapéutico de interés para uso en un método para tratar una enfermedad ocular en un sujeto, en donde dicho método comprende las etapas que consisten en i) suministrar dicha composición farmacéutica en el músculo ciliar del sujeto y ii) exponer a ultrasonidos la región en la que se suministró la composición farmacéutica para inducir la transfección de dicho ácido nucleico terapéutico de interés dentro de dicho músculo ciliar.
- 10 2. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho ácido nucleico terapéutico de interés es una molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) o una molécula de ácido ribonucleico (ARN).
- 15 3. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho ácido nucleico terapéutico de interés es un vector tal como un plásmido.
- 20 4. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho ácido nucleico de interés es codificado para un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en enzimas, derivados de la sangre, hormonas, linfoquinas, citoquinas, quimioquinas, factores anti-inflamatorios, factores de crecimiento, factores tróficos, factores neurotróficos, factores hematopoyéticos, factores angiogénicos, factores anti-angiogénicos, inhibidores de metaloproteínasa, reguladores de la apoptosis, factores de coagulación, receptores de los mismos, en particular receptores solubles, un péptido que es un agonista o antagonista de un receptor o de una proteína de adhesión, antígenos, anticuerpos, fragmentos o derivados de los mismos, y otros constituyentes esenciales de la célula.
- 25 5. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la envuelta de microburbujas comprende un polímero o un tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en lípidos, incluidos fosfolípidos y lípidos fluorados.
- 30 6. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el gas incorporado en las microburbujas es un compuesto de fluorocarbono, preferiblemente un perfluorocarbono seleccionado del grupo que consiste en perfluor alcanos tales como perfluorometano, perfluoroetano, perfluoropropanos, perfluorobutanos, perfluoropentanos, perfluorohexanos o perfluoroheptanos; perfluoroalquenos tales como perfluoropropeno, perfluorobutenos, perfluorobutadieno, perfluoropentenos o perfluoro-4-metilpent-2-eno; perfluoroalquinos tales como perfluorobut-2-ino; y perfluorocicloalcanos tales como perfluorociclobutano, perfluorometilciclobutano, perfluorodimetilciclobutanos, perfluorotrimetilciclobutanos, perfluorociclopentano, perfluorometilciclopentano, perfluorodimetilciclopentanos, perfluorociclohexano, perfluorometilciclohexano o perfluorocicloheptano.
- 35 40 7. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los ultrasonidos se suministran mediante un dispositivo de ultrasonidos que proporciona una señal ultrasónica de 800 kHz a 3 MHz con una intensidad de salida I_{sata} que oscila entre $0,5 \text{ W/cm}^2$ y 5 W/cm^2 .
- 45 50 8. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7^o, en donde dicha enfermedad ocular se selecciona del grupo que consiste en enfermedades oculares proliferativas, enfermedades oculares neurodegenerativas, glaucoma, enfermedades oculares infecciosas, enfermedades oculares inflamatorias tales como conjuntivitis, queratitis, endotelitis, uveítis, coroiditis, retinitis, retinocoroiditis, uveítis anterior, y neuropatías ópticas inflamatorias, degeneraciones de la retina, en particular retinitis pigmentosa, degeneración periférica de la retina, degeneración macular tal como degeneración macular seca relacionada con la edad, retinopatía isquémica, en particular retinopatía del prematuro y retinopatía diabética, enfermedades vasculares de la retina, síndrome de isquemia ocular y otras anomalías vasculares, trastornos y tumores coroidales, trastornos vítreos, proliferación glial tal como vítrorretinopatía proliferativa y proliferación glial asociada a angiogénesis pre-retinal diabética.