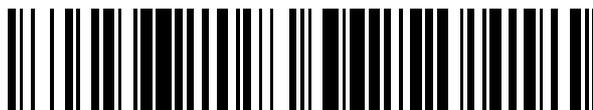


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 934**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/585** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2011 E 11718122 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2568986**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de la acumulación de líquido en y/o bajo la retina**

30 Prioridad:

**29.06.2010 US 359575 P**

**28.06.2010 US 359075 P**

**10.05.2010 EP 10305493**

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

**18.04.2016**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)**

**101, rue de Tolbiac**

**75013 Paris, FR;**

**UNIVERSITE PARIS DESCARTES (33.3%) y**

**ASSISTANCE PUBLIQUE-HOPITAUX DE PARIS (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BEHAR-COHEN, FRANCINE;**

**FARMAN, NICOLETTE y**

**JAISSIER, FRÉDÉRIC**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**ES 2 566 934 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 para el tratamiento de la acumulación de líquido en y/o bajo la retina

5 **Sector de la técnica**

La presente invención proporciona métodos y composiciones para el tratamiento de la acumulación de líquido en y/o bajo la retina.

10 **Estado de la técnica**

Los canales iónicos y las acuaporinas se expresan de manera diferente en las células retinianas, y desempeñan un importante papel en los movimientos iónicos y del agua que son cruciales para el control apto de la hidratación de la retina.

15 Entre las isoformas de la familia de proteínas AQP identificadas hasta la fecha, se ha descubierto que al menos cuatro AQPs se expresan en la retina neural, AQP0, AQP1, AQP4 y AQP9. AQP0 se expresa en las subpoblaciones de las células bipolares, células amacrinas y células ganglionares retinianas (CGRs) (I. landiev, T. Pannicke, W. Härtig, J. Grosche, P. Wiedemann, A. Reichenbach y A. Bringmann, *Localization of aquaporin-0 immunoreactivity in the rat retina*, *Neurosci. Lett.* 426 (2007), págs. 81-86.). AQP1 se expresa normalmente en la retina externa en los fotorreceptores y en las distintas células amacrinas (I. landiev, T. Pannicke, M. B. Reichel, P. Wiedemann, A. Reichenbach y A. Bringmann, *Expression of aquaporin-1 immunoreactivity by photoreceptor cells in the mouse retina*, *Neurosci. Lett.* 388 (2005), págs. 96-99.), mientras que AQP4 se expresa predominantemente en los pies terminales perivasculares y vítreos de las células de Müller y en astrocitos de la retina interna (M. J. Goodyear, S. G. Crewther y B. M. Junghans, *A role for aquaporin-4 in fluid regulation in the inner retina*, *Vis. Neurosci.* 26 (2009), págs. 159-165.).

Se ha demostrado, generalmente, que la alteración de la cantidad y/o localización de la expresión glial de AQP 4, aunque también de AQP1, en la retina produce la acumulación de líquido en y/o bajo la retina. Se descubrió de hecho que AQPs 1 y 4 se alteran en diferentes modelos animales de enfermedad, que incluyen isquemia/reperfusión (I. landiev, T. Pannicke, B. Biedermann, P. Wiedemann, A. Reichenbach y A. Bringmann, *Ischemia-reperfusion alters the immunolocalization of glial aquaporins in rat retina*, *Neurosci. Lett.* 408 (2006), págs. 108-112.) y diabetes inducida por estreptozotocina (ETZ) (I. landiev, T. Pannicke, B. Biedermann, A. Reichenbach, P. Wiedemann y A. Bringmann, *Diabetes alters the localization of glial aquaporins in rat retina*, *Neurosci. Lett.* 421 (2007), págs. 132-136.).

Por ejemplo, tras la isquemia, las células gliales retinianas en las capas de la fibra nerviosa/células ganglionares expresaron fuertemente AQP1 (I. landiev, T. Pannicke, B. Biedermann, P. Wiedemann, A. Reichenbach y A. Bringmann, *Ischemia-reperfusion alters the immunolocalization of glial aquaporins in rat retina*, *Neurosci. Lett.* 408 (2006), págs. 108-112.). Es más, la tinción perivascular en torno a los vasos superficiales cambió de AQP4 en las retinas de control a AQP1 en las retinas postisquémicas (I. landiev, T. Pannicke, B. Biedermann, P. Wiedemann, A. Reichenbach y A. Bringmann, *Ischemia-reperfusion alters the immunolocalization of glial aquaporins in rat retina*, *Neurosci. Lett.* 408 (2006), págs. 108-112.). Los datos sugieren que el transporte del agua mediado por células gliales en la retina se altera tras la isquemia, en especial en los vasos del plexo superficial.

En cuanto a la diabetes, un estudio de micromatrices demostró que la expresión génica de AQP1 y AQP4 aumenta en las retinas de ratas diabéticas (I. landiev, T. Pannicke, B. Biedermann, A. Reichenbach, P. Wiedemann y A. Bringmann, *Diabetes alters the localization of glial aquaporins in rat retina*, *Neurosci. Lett.* 421 (2007), págs. 132-136.). Además, la inmunorreactividad de AQP1 se potenció en las células gliales localizadas en las capas retinianas más internas y en aquellas que rodean a los vasos superficiales de ratas con diabetes inducida por ETZ. La expresión perivascular de AQP4 se redujo según consta en los vasos del plexo superficial aunque se mantuvo sin cambios en la capa nuclear interna (CNI) (I. landiev, T. Pannicke, B. Biedermann, A. Reichenbach, P. Wiedemann y A. Bringmann, *Diabetes alters the localization of glial aquaporins in rat retina*, *Neurosci. Lett.* 421 (2007), págs. 132-136.).

Igualmente, se ha demostrado que la uveítis inducida por endotoxina (UIE) en ratas altera la expresión de Kir4.1 y AQP4 en la retina (Liu XQ, Kobayashi H, Jin ZB, Wada A, Nao-I N. *Differential expression of Kir4.1 and aquaporin 4 in the retina from endotoxin-induced uveitis rat*. *Mol Vis.* 2007 1;13:309-17.).

La degeneración retiniana se ha asociado con una ubicación incorrecta de Kir4.1 y la pérdida de la expresión de AQP4. (Yuan S, Zhang W, Ding J, Yao J, Jiang Q, Hu G. *Increased sensitivity to retinal light damage in aquaporin-4 knockout mice*. *Exp Eye Res.* 2009; 89(1):119-22.). Por último, se demostró que las células gliales de Müller responden a la luz excesiva con una alteración en la localización de las proteínas Kir4.1 y acuaporina-4; (*Localization of glial aquaporin-4 and Kir4.1 in the light-injured murine retina*. landiev I, Pannicke T, Hollborn M, Wiedemann P, Reichenbach A, Grimm C, Remé CE, Bringmann A. *Neurosci Lett.* 2008; 434(3):317-21.).

En resumen, se ha demostrado en todos los modelos de enfermedades retinianas asociados con la desregulación de la homeostasis de líquidos que AQP4, AQP1 y Kir4.1 se sobreexpresan o expresan poco y se ubican de forma incorrecta.

- 5 No obstante, los mecanismos moleculares que regulan la regulación fisiológica o hidroiónica patológica en la retina permanecen sin explorar.

#### Objeto de la invención

- 10 La presente invención proporciona métodos y composiciones para el tratamiento de la acumulación de líquido en y/o bajo la retina.

#### Descripción detallada de la invención

- 15 Los inventores han evaluado el papel directo de la activación de RM en la regulación de la expresión de los canales iónicos y de las acuaporinas en las células gliales retinianas de Müller (GRM) *in vitro*, en el cultivo organotípico *ex vivo* en rata y en la retina de rata *in vivo*. Los resultados muestran que la aldosterona regula la expresión y/o distribución de acuaporina 1, 4 y Kir4.1 en la retina.

- 20 Más específicamente, en la rata normal, los inventores demostraron que en tan solo 24 horas de exposición a la dosis baja de aldosterona (1-10 nM) se potencia la expresión de acuaporina 4 (AQP4) y la expresión de la acuaporina 1 se reduce. Más específicamente, la inyección intravítrea de aldosterona induce la inflamación de la retina (aumento del 24 % en comparación con la inyección simulada en los ojos) y una potente activación de la GRM. Se favorece la ubicación incorrecta adicional de Kir4.1 y AQP4 a las microvellosidades apicales de GRM. Por lo tanto, los resultados ponen de manifiesto la sensibilidad a los mineralocorticoides de la neuroretina y muestran que la aldosterona controla la hidratación de la retina saludable por medio de la regulación de la expresión de los canales iónicos/de agua en GRM. En conjunto, estos resultados demuestran que la neuroretina y más específicamente las células GRM son dianas innovadoras de aldosterona y/o RM. Por tanto, la hormona y su receptor pueden considerarse como piezas innovadoras en la regulación de la homeostasis e hidratación de la retina sana.

- 30 Por consiguiente, los inventores creen ahora que con respecto a los trastornos metabólicos, tales como retinopatía diabética, la sensibilidad a la aldosterona del tejido retiniano aumenta y/o la aldosterona penetra en la esfera ocular debido a la ruptura de las barreras hematorretinianas y por lo tanto potencia la expresión y la ubicación incorrecta de AQP4 y Kir4.1 en GRM que da lugar a la acumulación de líquido en y/o bajo la retina. Los antagonistas de RM pueden ser por lo tanto útiles en el tratamiento de la acumulación de líquido en y/o bajo la retina según lo observado en la coriorretinitis serosa central.

- 40 La presente invención se refiere a un antagonista del receptor de mineralocorticoides (RM) para su uso en el tratamiento de la acumulación de líquido en y/o bajo la retina asociada con la retinopatía diabética, glaucoma, isquemia, miopía, coriorretinitis serosa central, o las formas exudativas de la degeneración macular asociada a la edad.

- 45 Como se utiliza en el presente documento, el término "receptor de mineralocorticoides" o "RM" posee un sentido general en la materia y se refiere al receptor nuclear de la subfamilia 3, grupo C, miembro 2, (NR3C2), es un receptor de alta afinidad por mineralocorticoides. El receptor de mineralocorticoides se denomina asimismo receptor de aldosterona. La actividad antagonista o agonista del RM de un compuesto puede determinarse empleando varios métodos descritos en J, Souque A, Wurtz JM, Moras D, Rafestin-Oblin ME. *Mol Endocrinol.* agosto del 2000; 14(8):1210-21; Fagart J, Seguin C, Pinon GM, Rafestin-Oblin ME. *Mol Pharmacol.* mayo del 2005; 67(5):1714-22 o Hellal-Levy C, Fagart J, Souque A, Wurtz JM, Moras D, Rafestin-Oblin ME. *Mol Endocrinol.* agosto del 2000; 14(8):1210-21. Normalmente, la transfección del receptor de mineralocorticoides humano en células COS junto con un gen indicador que expresa luciferasa permite medir su actividad de transactivación en presencia de un compuesto candidato.

- 55 En el contexto de la presente invención, los antagonistas del receptor de mineralocorticoides resultan preferentemente selectivos para el receptor de mineralocorticoides, en comparación con los receptores relacionados, tales como el receptor de andrógenos, receptor de estrógenos, receptor de glucocorticoides, receptor de progesterona, receptor de hormona tiroidea, receptor activado por el proliferador de peroxisomas, receptor del ácido retinoico, receptor X farnesoide, receptor X pregnano, receptor X hepático, receptor de la vitamina D, receptor X retinoide y el receptor constitutivo de androstano. Por "selectivo" se entiende que la afinidad del antagonista para el receptor de mineralocorticoides es de al menos 10 veces, preferentemente 25 veces, más preferentemente 100 veces, aun preferentemente 500 veces mayor que la afinidad por los receptores relacionados.

- 65 En una realización, el antagonista del receptor de mineralocorticoides es un antagonista de bajo peso molecular, p. ej., una molécula orgánica pequeña. El término "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de tamaño comparable a moléculas orgánicas empleadas generalmente en los productos farmacéuticos. El término excluye

macromoléculas biológicas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferentes fluctúan de tamaño hasta aproximadamente 5.000 Da, más preferentemente hasta 2.000 Da, y más preferentemente hasta aproximadamente 1.000 Da.

- 5 Normalmente, los antagonistas del receptor de mineralocorticoides según la invención son en general compuestos esteroideos de tipo espirolactona. El término "tipo espirolactona" tiene por objeto caracterizar una estructura que comprende un resto de lactona unido a un núcleo esteroide, generalmente al anillo D" del esteroide ", por medio de un enlace de configuración espiro. Una subclase de compuestos antagonistas del receptor de mineralocorticoides tipo espirolactona consiste en compuestos antagonistas del receptor de mineralocorticoides epoxi-esteroideos, tales como eplerenona. Otra subclase de compuestos antagonistas de tipo espirolactona consiste en compuestos antagonistas del receptor de mineralocorticoides no epoxi-esteroideos, tales como espirolactona.

15 Los compuestos antagonistas del receptor de mineralocorticoides epoxi-esteroideos empleados en el método de la presente invención presentan generalmente un núcleo esteroideo sustituido con un resto de tipo epoxi. El término resto de "tipo epoxi" tiene por objeto abarcar cualquier resto caracterizado por tener un átomo de oxígeno como puente entre dos átomos de carbono.

20 El término "esteroideo", como se utiliza en la expresión "epoxi-esteroideo," denota un núcleo provisto de un resto de ciclopentofenantreno, con los anillos "A", "B", "C" y "D" convencionales. El resto de tipo epoxi puede unirse al núcleo ciclopentofenantreno en cualquier posición de unión o sustitución, es decir, fusionado a uno de los anillos del núcleo esteroideo o el resto puede sustituirse en un miembro del anillo del sistema de anillos. La expresión "epoxi-esteroideo" tiene por objeto abarcar un núcleo esteroideo con uno o una pluralidad de restos de tipo epoxi unidos al mismo.

25 Los antagonistas del receptor de mineralocorticoides epoxi-esteroideos apropiados para su uso en los presentes métodos incluyen una familia de compuestos que poseen un resto epoxi fusionado al anillo "C" del núcleo esteroideo. Los ejemplos incluyen compuestos de 20-espiroxano caracterizados por la presencia de un resto epoxi sustituido en 9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ , tales como:

- 30 - ácido pregn-4-eno-7,21-dicarboxílico, 9,11-epoxi-17-hidroxi-3-oxo-, $\gamma$ -lactona, éster metílico (7 $\alpha$ , 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ )  
 - ácido pregn-4-eno-7,21-dicarboxílico, 9,11-epoxi-17-hidroxi-3-oxo-, éster dimetílico (7 $\alpha$ , 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ )  
 - ácido 3' H-ciclopropa[6,7]pregna-4,6-dieno-21-carboxílico,9,11-epoxi-6,7-dihidro-17-hidroxi-3-oxo-,  $\gamma$ -lactona, (6 $\beta$ , 7 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ )  
 - ácido pregn-4-eno-7,21-dicarboxílico,9,11-epoxi-17-hidroxi-3-oxo-,7-(1-metiletil) éster, sal monopotásica, (7 $\alpha$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ )  
 35 - ácido 3'H-ciclopropa[6,7]pregna-1,4,6-trieno-21-carboxílico,9,11-epoxi-6,7-dihidro-17-hidroxi-3-oxo-,  $\Gamma$ -lactona (6 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ )  
 - ácido 3'H-ciclopropa[6,7]pregna-4,6-dieno-21-carboxílico,9,11-epoxi-6,7-dihidro-17-hidroxi-3-oxo- éster metílico, (6 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ )  
 40 - ácido 3'H-ciclopropa[6,7]pregna-4,6-dieno-21-carboxílico,9,11-epoxi-6,7-dihidro-17-hidroxi-3-oxo-, sal monopotásica (6 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ )  
 - ácido 3'H-ciclopropa[6,7]pregna-1,4,6-trieno-21-carboxílico, 9,11-epoxi-6,7-dihidro-17-hidroxi-3-oxo-,  $\gamma$ -lactona (6 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ )  
 - ácido pregn-4-eno-7,21-dicarboxílico, 9,11-epoxi-17-hidroxi-3-oxo-,  $\gamma$ -lactona, éster etílico (7 $\alpha$ , 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ )  
 45 - ácido pregn-4-eno-7,21-dicarboxílico, 9,11-epoxi-17-hidroxi-3-oxo-, $\gamma$ -lactona, 1-éster metiletilico (7 $\alpha$ , 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ )

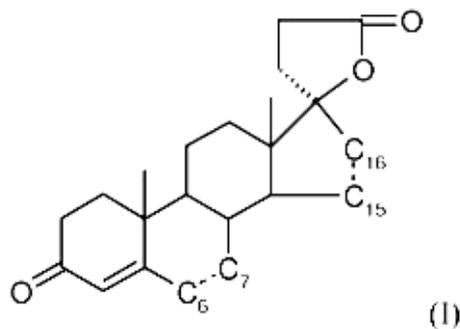
50 Un beneficio particular del empleo de antagonistas del receptor de mineralocorticoides epoxi-esteroideos, como se ejemplifica por la eplerenona, es la elevada selectividad de este grupo de antagonistas del receptor de mineralocorticoides por el receptor de mineralocorticoides. La selectividad superior de eplerenona da lugar a una reducción en los efectos secundarios que pueden causarse por los antagonistas del receptor de mineralocorticoides que exhiben una unión no selectiva a los receptores relacionados, tales como receptores de andrógenos o progesterona.

55 Estos epoxi esteroideos pueden prepararse por procedimientos descritos en Grob *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 4.559.332. Los procesos adicionales para la preparación de compuestos 9,11-epoxi esteroideos y sus sales se desvelan en Ng *et al.*, documento WO97/21720 y Ng *et al.*, documento WO98/25948.

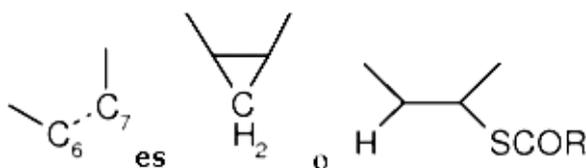
60 Resulta de particular interés el compuesto de eplerenona ((ácido pregn-4-eno-7,21-dicarboxílico, 9,11-epoxi-17-hidroxi-3-oxo-,  $\gamma$ -lactona, éster metílico (7 $\alpha$ , 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ )) (número de registro CAS 107724-20-9), también conocido como epoximexrenona. La eplerenona es un antagonista del receptor de mineralocorticoides y presenta una selectividad más alta por los receptores de mineralocorticoides de la que presenta, por ejemplo, la espirolactona. La selección de eplerenona como antagonista del receptor de mineralocorticoides en el presente método sería beneficiosa para reducir determinados efectos secundarios, tales como ginecomastia que se producen con el uso de antagonistas del receptor de mineralocorticoides con menos especificidad.

65 Los antagonistas del receptor de mineralocorticoides no epoxi-esteroideos aptos para su uso en los presentes

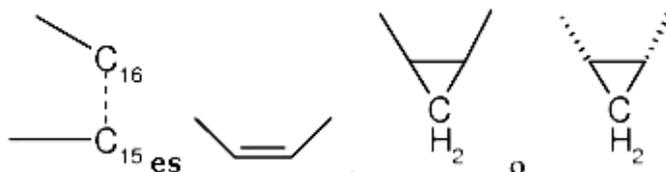
métodos incluyen una familia de compuestos de tipo espirolactona definidos por la Fórmula I:



5 en la que:



10 - R es un alquilo inferior de hasta 5 átomos de carbono, y



Los residuos de alquilo inferior incluyen grupos ramificados y no ramificados, por ejemplo, metilo, etilo y n-propilo.

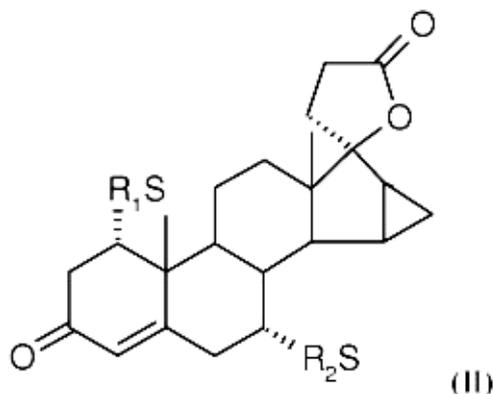
15 Los compuestos específicos de interés en la Fórmula I son los siguientes:

- 7 $\alpha$ -acetiltio-3-oxo-4,15-androstadieno-[17( $\beta$ -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona;
- 3-oxo-7 $\alpha$ -propioniltio-4,15-androstadieno-[17( $\beta$ -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona;
- 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -metileno-3-oxo-4,15-androstadieno-[17( $\beta$ -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona;
- 20 - 15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -metileno-3-oxo-4,7 $\alpha$ -propioniltio-4-androsteno[17( $\beta$ -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona;
- 6 $\beta$ ,7 $\beta$ ,15 $\alpha$ ,16-dimetileno-3-oxo-4-androsteno[17( $\beta$ -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona;
- 7 $\alpha$ -acetiltio-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metileno-3-oxo-4-androsteno-[17( $\beta$ -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona;
- 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metileno-3-oxo-7 $\beta$ -propioniltio-4-androsteno-[17( $\beta$ -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona; y
- 25 - 6 $\beta$ ,7 $\beta$ ,15 $\beta$ ,16 $\beta$ -dimetileno-3-oxo-4-androsteno-[17( $\beta$ -1')-espiro-5']perhidrofuran-2'-ona.

Los métodos para fabricar compuestos de Fórmula I se describen en la patente de Estados Unidos n.º 4.129.564 de Wiechart *et al.* expedida el 12 de diciembre de 1978.

Otra familia de compuestos no epoxi esteroideos de interés se define por la Fórmula II:

30



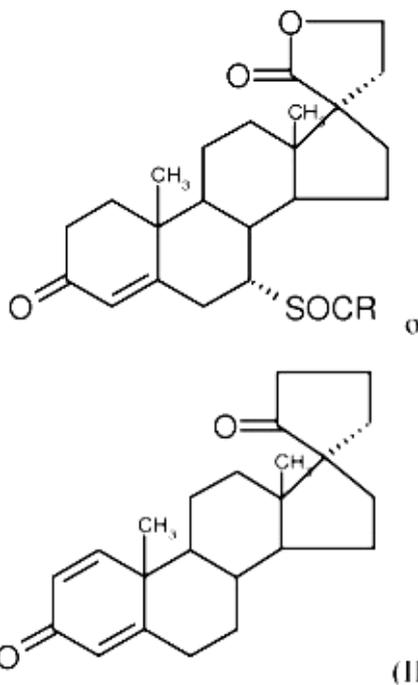
en la que R1 es alquilo C1-3 o acilo C1-3 y R2 es H o alquilo C1-3.

5 Los compuestos específicos de interés en la Fórmula II son los siguientes:

- 1 $\alpha$ -acetiltio-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metileno-7 $\alpha$ -metiltio-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-eno-21,17-carbolactona; y
- 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metileno-1 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dimetiltio-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-eno-21,17-carbolactona.

10 Los métodos para fabricar los compuestos de Fórmula II se describen en la patente de Estados Unidos n.º 4.789.668 de Nickisch *et al.* expedida el 6 de diciembre de 1988.

Otra familia de compuestos no epoxi esteroideos de interés se define por una estructura de Fórmula III:



15

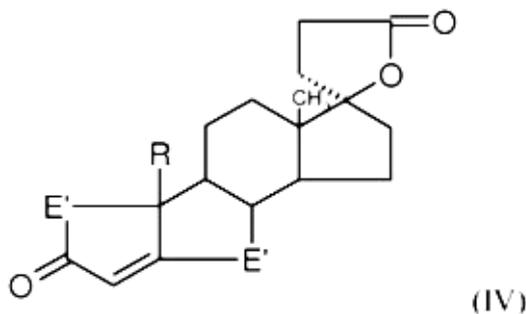
en la que R es alquilo inferior, ejemplos entre los cuales se incluyen grupos alquilo inferior de metilo, etilo, propilo y butilo. Los compuestos específicos de interés incluyen:

- 20
- $\gamma$ -lactona del ácido 3 $\beta$ ,21-dihidroxi-17 $\alpha$ -pregna-5,15-dieno-17-carboxílico;
  - 3-acetato de  $\gamma$ -lactona del ácido 3 $\beta$ ,21-dihidroxi-17 $\alpha$ -pregna-5,15-dieno-17-carboxílico;
  - $\gamma$ -lactona del ácido 3 $\beta$ ,21-dihidroxi-17 $\alpha$ -pregn-5-eno-17-carboxílico;
  - 3-acetato de  $\gamma$ -lactona del ácido 3 $\beta$ ,21-dihidroxi-17 $\alpha$ -pregn-5-eno-17-carboxílico;
  - $\gamma$ -lactona del ácido 21-hidroxi-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-eno-17-carboxílico;
- 25
- $\gamma$ -lactona del ácido 21-hidroxi-3-oxo-17 $\alpha$ -pregna-4,6-dieno-17-carboxílico;

- $\gamma$ -lactona del ácido 21-hidroxi-3-oxo-17 $\alpha$ -pregna-1,4-dieno-17-carboxílico;
- $\gamma$ -lactona del ácido 7 $\alpha$ -aciltio-21-hidroxi-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-eno-17-carboxílico; y
- $\gamma$ -lactona del ácido 7 $\alpha$ -acetiltio-21-hidroxi-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-eno-17-carboxílico.

5 Los métodos para fabricar los compuestos de Fórmula III se describen en la patente de Estados Unidos n.º 3.257.390 de Patchett, expedida el 21 de junio de 1966.

Otra familia de compuestos no epoxi esteroideos de interés se representa por la Fórmula IV:

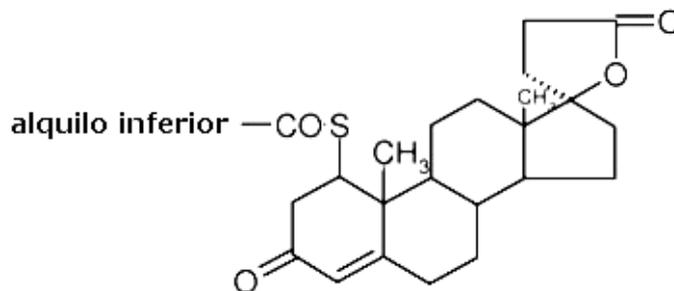


10

en la que E' se selecciona entre el grupo que consiste en radicales etileno, vinileno y (alcanoilo inferior)tioetileno, E'' se selecciona entre el grupo que consiste en radicales etileno, vinileno, (alcanoilo inferior)tioetileno y (alcanoilo inferior)tiopropileno; R es un radical metilo excepto cuando E' y E'' son radicales etileno y (alcanoilo inferior)tioetileno, respectivamente, en cuyo caso R se selecciona entre el grupo que consiste en radicales hidrógeno y metilo; y la selección de E' y E'' es tal que al menos está presente un radical (alcanoilo inferior)tio.

15

Una familia de compuestos no epoxi esteroideos en la Fórmula IV se representa por la Fórmula V:

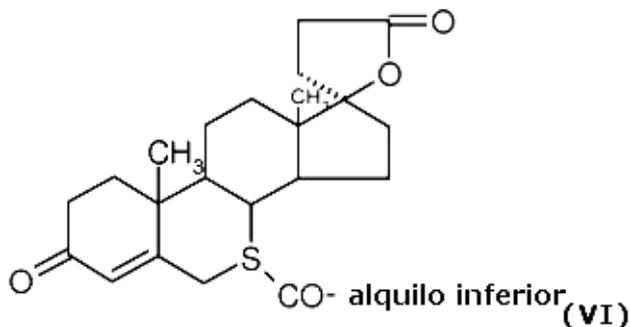


20

Otro compuesto de Fórmula V es lactona de 1-acetiltio-17 $\alpha$ -(2-carboxietil)-17 $\beta$ -hidroxi-androst-4-en-3-ona.

Otra familia de compuestos no epoxi esteroideos en la Fórmula IV se representa por la Fórmula VI:

25

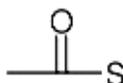


Los compuestos ejemplares en la Fórmula VI incluyen los siguientes:

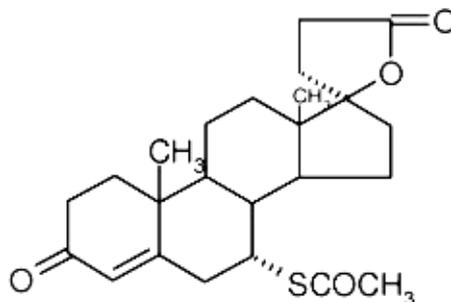
- 30 - lactona de 7 $\alpha$ -acetiltio-17 $\alpha$ -(2-carboxietil)-17 $\beta$ -hidroxi-androst-4-en-3-ona;
- lactona de 7 $\beta$ -acetiltio-17 $\alpha$ -(2-carboxietil)-17 $\beta$ -hidroxi-androst-4-en-3-ona;

- lactona de 1 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diacetiltio-17 $\alpha$ -(2-carboxietil)-17 $\beta$ -hidroxi-androsta-4,6-dien-3-ona;
- lactona de 7 $\alpha$ -acetiltio-17 $\alpha$ -(2-carboxietil)-17 $\beta$ -hidroxi-androsta-1,4-dien-3-ona;
- lactona de 7 $\alpha$ -acetiltio-17 $\alpha$ -(2-carboxietil)-17 $\beta$ -hidroxi-19-norandrost-4-en-3-ona; y
- lactona de 7 $\alpha$ -acetiltio-17 $\alpha$ -(2-carboxietil)-17 $\beta$ -hidroxi-6 $\alpha$ -metilandrost-4-en-3-ona.

5 En las Fórmulas IV-VI, el término "alquilo" tiene por objeto abarcar radicales alquilo lineales y ramificados que contienen de uno a aproximadamente ocho carbonos. El término "(alcanoilo inferior)tio" abarca radicales de alquilo inferior de fórmula



10 Resulta de particular interés el compuesto de espirolactona (acetato de  $\gamma$ -lactona del ácido 17-hidroxi-7 $\alpha$ -mercapto-3-oxo-17 $\alpha$ -pregn-4-eno-21-carboxílico) que presenta la siguiente estructura:



15 Los métodos para fabricar los compuestos de Fórmula IV-VI se describen en la patente de Estados Unidos n.º 3.013.012 de Cella *et al.* expedida el 12 de diciembre de 1961. La espirolactona se comercializa por G. D. Searle & Co., Skokie, Ill., bajo la marca registrada "ALDACTONE", en forma de dosificación de comprimidos en dosis de 25 mg, 50 mg y 100 mg por comprimido.

25 Otra familia de antagonistas del receptor de mineralocorticoides esteroideos se ejemplifica por drospirenona, (6R-(6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8 $\beta$ ,9 $\alpha$ ,10 $\beta$ ,13 $\beta$ ,14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ ))-1,3',4',6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,20,21-hexadecahidro-10,13-dimetilespiro[17H-diciclopropano(6,7:15,16)ciclopentano(a)fenantreno-17,2'(5'H)-furan]3,5'(2H)diona, número de registro CAS 67392-87-4. Los métodos para fabricar y utilizar drospirenona se describen en la patente Británica 1550568 1979, prioridad Alemana 2652761 1976.

30 Se han identificado formas cristalinas fácilmente manipulables, reproducibles en forma, de fácil preparación, estables y no higroscópicas para el antagonista del receptor de mineralocorticoides, eplerenona. Estas incluyen la Forma H, Forma L, diferentes solvatos cristalinos y eplerenona amorfa. Estas formas, los métodos para fabricar estas formas, y el empleo de estas formas para la preparación de composiciones y medicamentos, se desvelan en Barton *et al.*, documento WO 01/41535 y Barton *et al.*, documento WO 01/42272.

35 Las moléculas orgánicas pequeñas que pueden emplearse como antagonistas del receptor de mineralocorticoides según la invención también pueden ser no esteroideas. Por ejemplo, acaban de surgir en los últimos años clases de antagonistas del RM no esteroideos (Meyers, Marvin J1; Hu, Xiao *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, volumen 17, número 1, enero de 2007, págs. 17-23(7). Recientemente, se ha demostrado que las dihidropirimidinas muestran el antagonismo del RM (*Activation of Mineralocorticoid Receptors by Exogenous Glucocorticoids and the Development of Cardiovascular Inflammatory Responses in Adrenalectomized Rats*. Young MJ, Morgan J, Brolin K, Fuller PJ, Funder JW. *Endocrinology*. 21 de abril de 2010). Además, Arhancet *et al.*, desvelan otra clase de antagonistas del RM no esteroideos (Arhancet GB, Woodard SS, Dietz JD, Garland DJ, Wagner GM, Iyanar K, Collins JT, Blinn JR, Numann RE, Hu X, Huang HC. *Stereochemical Requirements for the Mineralocorticoid Receptor Antagonist Activity of Dihydropyridines*. *J Med Chem*. 21 de abril de 2010). Otros antagonistas del receptor de mineralocorticoides no esteroideos similares incluyen, entre otros, a los descritos en la publicación de la solicitud de 45 la patente de Estados Unidos US 20090163472, documentos WO2004052847, WO 2008053300.

50 Por ejemplo el documento WO 06/076202 (publicado el 20 de julio de 2006) describe una clase de carboxamidas de imidazol como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 06/012642 (publicado el 2 de febrero de 2006) describe una clase de carboxamidas de pirrol como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 04/052847 (publicado el 24 de junio de 2004) describe una clase de

dibenzosuberanos como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 05/066161 (publicado el 21 de julio de 2005) describe una clase de dibenzosuberanos como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 03/078394 (publicado el 25 de septiembre de 2003) describe una clase de 3,3-bisaril oxindoles como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 05/097118 (publicado el 20 de octubre 2005) describe una clase de 4-aril-1,4-dihidropiridinas como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 04/067529 (publicado el 12 de agosto de 2004) describe una clase de 3-bencil indoles como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 06/077821 (publicado el 27 de julio de 2006) describe una clase de benzoxazinonas y tetrahidroquinolinas como antagonistas del receptor de mineralocorticoides. El documento WO 06/010142 (publicado el 26 de enero de 2006) describe una clase de aril benzoxazinonas/tionas como antagonistas del receptor de mineralocorticoides.

Otro ejemplo de antagonista incluye una sal del ácido canrenoico. El ácido canrenoico es un profármaco que se metaboliza en canrenona en el cuerpo. Para la administración intraocular, puede ser apta una sal del ácido canrenoico, tal como canrenoato de potasio.

Alternativamente, el antagonista del receptor de mineralocorticoides puede consistir asimismo en un anticuerpo (incluyendo el término "fragmento de anticuerpo"). En particular, el antagonista del receptor de mineralocorticoides puede consistir en un anticuerpo dirigido contra el receptor de mineralocorticoides, de manera tal que dicho anticuerpo antagoniza el receptor.

Los anticuerpos pueden cultivarse según métodos conocidos al administrar el antígeno o epítipo apropiado a un animal huésped seleccionado, p. ej., en cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Pueden emplearse diversos adyuvantes conocidos en la materia para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, resultan preferentes los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse y aislarse empleando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y aislamiento incluyen, entre otros, la técnica de hibridoma; la técnica de hibridoma de células B humanas; y la técnica de hibridoma de EBV. De manera alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase, p. ej., la patente de Estados Unidos n.º 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena simple del antirreceptor de mineralocorticoides. El antagonista del receptor de mineralocorticoides (p. ej., agonista, agonista parcial o antagonista) útil en la práctica de la presente invención también incluye fragmentos de anticuerpos del antirreceptor de mineralocorticoides incluyendo, entre otros, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, que pueden producirse por medio de la digestión con pepsina de una molécula intacta de anticuerpo, y fragmentos Fab, que pueden producirse al reducir los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, las bibliotecas de expresión de Fab y/o Fvcs pueden construirse para permitir la rápida identificación de fragmentos que presentan la especificidad deseada en el receptor de mineralocorticoides.

Los anticuerpos humanizados y sus fragmentos de anticuerpos también pueden prepararse según técnicas conocidas. Los "anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (p. ej., roedor) que contienen una secuencia mínima obtenida a partir de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable (CDRs) del receptor se sustituyen con residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que presenta la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (Rm) de la inmunoglobulina humana se sustituyen con los correspondientes residuos no humanos. Es más, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se hallan en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para mejorar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá considerablemente la totalidad de al menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las Rm son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Se describen métodos para fabricar anticuerpos humanizados, por ejemplo, en Winter (patente de Estados Unidos n.º 5.225.539) y Boss (Celltech, patente de Estados Unidos n.º 4.816.397).

Como se ha descrito previamente tras el cultivo de anticuerpos, el experto en la materia puede seleccionar fácilmente aquellos que antagonizan el receptor de mineralocorticoides.

En otra realización, el antagonista del receptor de mineralocorticoides es un aptámero. Los aptámeros son una clase de moléculas que representan una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias oligonucleotídicas u oligopeptídicas con capacidad para reconocer casi cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos pueden aislarse por medio de la evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (ESLEE) de una biblioteca de secuencia aleatoria, según se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La biblioteca de secuencia aleatoria se obtiene mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado de forma química, de una secuencia única. Se han analizado posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de

moléculas en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable del anticuerpo limitada de forma conformacional mostrada por una plataforma proteica, tal como tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan a partir de bibliotecas combinatorias mediante dos métodos híbridos (Colas *et al.*, 1996). El aptámero en base al oligopéptido puede fusionarse en una secuencia de penetración, tal como la secuencia TAT o VP22.

5 Tras cultivar los aptámeros dirigidos contra los receptores de mineralocorticoides como se ha descrito previamente, el experto en la materia puede seleccionar fácilmente aquellos que antagonizan el receptor de mineralocorticoides.

10 La presente invención se refiere a un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para su uso en el tratamiento de la acumulación de líquido en y/o bajo la retina asociada con la coriorretinitis serosa central.

15 Los inhibidores de la expresión para su uso en la presente invención pueden basarse en constructos de oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido, incluyendo moléculas de ARN antisentido y moléculas de ADN antisentido, actuarán para bloquear directamente la traducción del ARNm del receptor de mineralocorticoides uniéndose al mismo y por consiguiente prevenir la traducción proteica o aumentar la degradación del ARNm, disminuyendo así el nivel de receptor de mineralocorticoides, y en consecuencia la actividad, en una célula. Por ejemplo, pueden sintetizarse los oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia del transcrito de ARNm codificante del receptor de mineralocorticoides, p. ej., por medio de técnicas de fosfodiéster convencionales y administrarse p. ej., por inyección o infusión intravenosa. Se conocen adecuadamente en la materia los métodos para emplear técnicas antisentido que inhiben de manera específica la expresión génica de los genes cuya secuencia se conoce (p. ej., véanse las patentes de Estados Unidos n.º 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321; y 5.981.732).

25 Los ARN inhibidores pequeños (ARNips) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión para su uso en la presente invención. La expresión génica del receptor de mineralocorticoides puede reducirse poniendo en contacto un sujeto o célula con un ARN bicatenario pequeño (ARNbc), o un vector o constructo que provoca la producción de un ARN bicatenario pequeño, de manera tal que la expresión génica del receptor de mineralocorticoides se inhibe de manera específica (es decir, ARN de interferencia o ARNi). Se conocen bien en la materia métodos para seleccionar un ARNbc o vector codificante de ARNbc para genes cuya secuencia se conoce (p. ej., véanse Tuschl, T. *et al.* (1999); Elbashir, S. M. *et al.* (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. *et al.* (2002); Brummelkamp, TR. *et al.* (2002); patentes de Estados Unidos n.º 6.573.099 y 6.506.559; y publicación de las patentes internacionales n.º WO 01/36646, WO 99/32619, y WO 01/68836). Se protege ventajosamente la totalidad o parte de los enlaces fosfodiéster de los ARNips de la invención. Esta protección se lleva a cabo generalmente a través de la ruta química empleando métodos conocidos en la materia. Los enlaces fosfodiéster pueden protegerse, por ejemplo, por un grupo funcional tiol o amina o por medio de un grupo fenilo. Los extremos 5' y/o 3' de los ARNips de la invención se protegen asimismo ventajosamente, por ejemplo, empleando la técnica descrita previamente para la protección de los enlaces fosfodiéster. Las secuencias de ARNips comprenden ventajosamente al menos doce dinucleótidos contiguos o sus derivados.

40 Como se utiliza en el presente documento, el término "derivados de ARNip" con respecto a las secuencias de ácido nucleico presentes se refiere a un ácido nucleico que presenta un porcentaje de identidad de al menos 90 % con eritropoyetina o su fragmento, preferentemente de al menos 95 %, como ejemplo de al menos 98 %, y más preferentemente de al menos 98 %.

45 Como se utiliza en el presente documento, "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácido nucleico, significa que el porcentaje del ácido nucleico idéntico, entre las dos secuencias a comparar, se obtiene con el mejor alineamiento de dichas secuencias, siendo puramente estadístico este porcentaje y las diferencias entre estas dos secuencias se distribuyen al azar en las secuencias de los ácidos nucleicos. Como se utiliza en el presente documento, "mejor alineamiento" u "alineamiento óptimo", significa el alineamiento para el cual el porcentaje determinado de identidad (véase más adelante) es el más alto. La comparación de secuencias entre dos secuencias de ácido nucleico se realiza por lo general comparando estas secuencias alineadas previamente según el mejor alineamiento; esta comparación se realiza en segmentos de comparación a fin de identificar y comparar las regiones locales de similitud. El mejor alineamiento de secuencias para llevar a cabo la comparación puede realizarse, además de forma manual, mediante el algoritmo de homología global desarrollado por SMITH y WATERMAN (*Ad. App. Math.*, vol. 2, pág.: 482, 1981), mediante el algoritmo de homología local desarrollado por NEDDLEMAN y WUNSCH (*J. Mol. Biol.*, vol. 48, pág.: 443, 1970), mediante el método de búsqueda de similitud desarrollado por PEARSON y LIPMAN (*Proc. Natl. Acd. Sci. EE. UU.*, vol. 85, pág.: 2444, 1988), mediante programas informáticos que utilizan este tipo de algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA del paquete de software genético de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, EE. UU.), mediante algoritmos de alineamiento múltiple MUSCLE (Edgar, Robert C., *Nucleic Acids Research*, vol. 32, pág.: 1792, 2004). Para obtener el mejor alineamiento local, puede utilizarse preferentemente el software BLAST. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico se determina comparando estas dos secuencias alineadas de manera óptima, siendo capaces las secuencias de ácido nucleico de comprender adiciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia con el fin de obtener el alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre estas dos secuencias, dividiendo este

número por el número total de posiciones comparadas, y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

5 Los ARNhc (ARN de horquilla corta) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión para su uso en la presente invención.

10 Las ribozimas pueden funcionar igualmente como inhibidores de la expresión para su uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. El mecanismo de acción ribozímica implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima al ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima en horquilla genéticamente modificadas o de motivo en cabeza de martillo que catalizan específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de las secuencias de ARNm del receptor de mineralocorticoides resultan por tanto útiles en el alcance de la presente invención. Los sitios específicos de escisión ribozímica en cualquier ARN diana potencial se identifican inicialmente explorando la molécula diana en los sitios de escisión de ribozima, que normalmente incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU, y GUC. Una vez identificadas, las secuencias de ARN cortas de aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión pueden evaluarse para las características estructurales predichas, tales como estructura secundaria, que pueden procesar la secuencia oligonucleotídica inadecuada.

20 Tanto los oligonucleótidos antisentido como las ribozimas útiles como inhibidores de la expresión pueden prepararse por métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para la síntesis química, tales como, p. ej., síntesis química por fosforamadita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN antisentido pueden generarse por transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN codificantes de la molécula de ARN. Dichas secuencias de ADN pueden incorporarse en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa aptos  
25 tales como los promotores de la polimerasa T7 o SP6. Pueden introducirse diversas modificaciones de los oligonucleótidos de la invención como medio para aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las posibles modificaciones incluyen, entre otros la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos en los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de enlaces fosfodiesterasa en el esqueleto oligonucleotídico.

30 Los oligonucleótidos antisentido, ARNips, ARNhcs y ribozimas de la invención pueden administrarse solamente *in vivo* o junto con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del oligonucleotido antisentido, ARNip, ARNhc o ácido nucleico ribozima a las células y preferentemente a las células que expresan el receptor de mineralocorticoides. Preferentemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con degradación reducida en relación con el grado de degradación que se produce en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, entre otros, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos obtenidos a partir de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado por la inserción o incorporación de secuencias de oligonucleótidos antisentido, ARNip, ARNhc o de ácido nucleico ribozima. Los vectores virales resultan un tipo preferente de vector e incluyen, entre otros, secuencias de ácido nucleico de los  
40 siguientes virus: retrovirus, tales como virus de la leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del tumor mamario murino, y virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adeno-asociados; virus de tipo SV40; poliovirus; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus vacuna; virus de la poliomielitís; y virus de ARN, tal como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la materia.

45 Los vectores virales preferentes se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que se han sustituido genes no esenciales con el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (p. ej., lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa del ARN viral genómico en ADN con integración proviral posterior en ADN celular del huésped. Se han aprobado retrovirus para ensayos de terapia génica humana. Son más útiles los retrovirus que son deficientes en replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retrovirales alterados genéticamente tienen utilidad general para la transducción con alta eficacia de genes *in vivo*. Se proporcionan protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes en replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una célula de empaquetado revestida con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por el empaquetado del linaje celular, recogida de partículas virales de medios de cultivo de tejidos e  
50 infección de las células diana con partículas virales) en Kriegler, 1990 y en Murry, 1991.

60 Los virus preferentes para ciertas aplicaciones son los adenovirus y los virus adeno-asociados (VAA), virus de ADN bicatenario que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica. En realidad, se conocen 12 serotipos diferentes de VAA (VAA1 a 12), cada uno con diferentes tropismos tisulares (Wu, *Z Mol Ther* 2006; 14:316-27). Los VAA recombinantes se obtienen a partir del VAA2 dependiente de parvovirus (Choi, *VW J Virol* 2005; 79:6801-07). El virus adeno-asociado de tipo 1 a 12 puede modificarse genéticamente para ser deficiente en replicación y es capaz de infectar un amplio intervalo de tipos y especies celulares (Wu, *Z Mol Ther* 2006; 14:316-27). Tiene además ventajas, tales como estabilidad al calor y disolventes lípidos; altas frecuencias de transducción en células de  
65 diversos linajes, incluyendo células hemopoyéticas; y carencia de inhibición de superinfección, permitiendo así series múltiples de transducciones. Según se ha informado, el virus adeno-asociado puede integrarse en ADN

celular humano de manera específica para el sitio, minimizando de este modo la posibilidad de mutagénesis insercional y variabilidad de la característica de la expresión génica insertada de infección retroviral. Además, se han observado infecciones por virus adeno-asociado de tipo natural en cultivos tisulares en más de 100 países en ausencia de presión selectiva, implicando que la integración genómica del virus adeno-asociado es un suceso  
5 relativamente estable. El virus adeno-asociado también puede funcionar de manera extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito extensamente en la materia y son muy conocidos por los expertos en la materia. Véase, p. ej., Sambrook *et al.*, 1989. En los últimos años, los  
10 vectores plasmídicos se han utilizado como vacunas de ADN para administrar genes que codifican antígenos a las células *in vivo*. Son particularmente ventajosos puesto que no tienen los mismos problemas de seguridad como con los numerosos vectores virales. Sin embargo, estos plásmidos que presentan un promotor compatible con la célula huésped, pueden expresar un péptido a partir de un gen operativamente codificado en el plásmido. Algunos plásmidos empleados comúnmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son muy conocidos por los expertos en la materia. Es más, los plásmidos pueden diseñarse a medida  
15 utilizando enzimas de restricción y reacciones de ligamento para separar y añadir fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos pueden administrarse por diversas vías parenteral, mucosa y tópica. Por ejemplo, el plásmido de ADN puede inyectarse por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea, o por otras vías. También puede administrarse mediante pulverizadores o gotas intranasales, supositorio rectal y oral. Igualmente puede administrarse en la epidermis o en una superficie mucosa utilizando una pistola génica. Los plásmidos pueden  
20 administrarse en una solución acuosa, secarse en partículas de oro o junto con otro sistema de administración de ADN que incluye, entre otros, liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

En una realización preferente, el oligonucleótido antisentido, secuencia de ARNip, ARNhc o ácido nucleico ribozima está sujeto al control de una región reguladora heteróloga, p. ej., un promotor heterólogo. El promotor puede ser  
25 específico para células gliales de Müller, células de la microglía, células endoteliales, células pericitos y astrocitos. Por ejemplo, una expresión específica en las células gliales de Müller puede obtenerse por el promotor del gen de la glutamina sintetasa adecuado. El promotor también puede ser, p. ej., un promotor viral, tal como el promotor CMV o cualquier promotor sintético.

Además, los inventores creen que los efectos antiedematosos de los corticosteroides en la retina se explican principalmente por una acción a través de la vía de RM, más que por una acción en la vía de RG. Los inventores han observado en efecto que la administración de un glucocorticoide (p. ej., acetónido de triamcinolona) proporciona el mismo efecto que un antagonista de RM en la expresión de AQP4. Por consiguiente, los antagonistas de RM  
30 sinergizan los efectos de los glucocorticoides en el tratamiento de la acumulación de líquido en y/o bajo la retina, pero también previenen los efectos secundarios graves de los glucocorticoides.

En consecuencia, un aspecto adicional de la invención se refiere a una combinación de un glucocorticoide y un antagonista de RM o un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para su uso en el  
40 tratamiento de la acumulación de líquido en y/o bajo la retina asociada con la retinopatía diabética, glaucoma, isquemia, miopía, coriorretinitis serosa central, o las formas exudativas de la degeneración macular asociada a la edad.

La combinación de un antagonista de RM y un glucocorticoide potencia el efecto de los glucocorticoides y permite reducir las dosis de glucocorticoides, limitando por ello sus efectos secundarios adversos.  
45

Como se utiliza en el presente documento, el término "glucocorticoide" adquiere su significado general en la materia y se refiere a compuestos que se unen y activan el receptor de glucocorticoides (RG) también conocido como NR3C1 (receptor nuclear de la subfamilia 3, grupo C, miembro 1).

Los glucocorticoides que pueden emplearse según la invención incluyen, entre otros, 21-acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluazacort, flucloronida, flumetasona, flunisolida, fluocinolona acetónida, fluocinonida, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednideno, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortol, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, etabonato de loteprednol, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, furoato de mometasona, parametasona, prednicartrato, prednisolona, 25-dietilamino-acetato de prednisolona, fosfato de sodio de prednisolona, prednisona, prednival, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, triamcinolona acetónida, triamcinolona benetonida, triamcinolona hexacetónida, acetato de anecortave y cualquiera de sus derivados.  
60

La presente también se refiere a una composición farmacéutica (según se describe a continuación en el presente documento) que comprende una cantidad de al menos un glucocorticoide y una cantidad de al menos un antagonista de RM o un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para su uso en el tratamiento de la  
65 acumulación de líquido en y/o bajo la retina asociada con la coriorretinitis serosa central.

La presente invención también se refiere a un kit que comprende al menos un glucocorticoide y al menos un antagonista de RM o un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para su uso en el tratamiento de la acumulación de líquido en y/o bajo la retina asociada con la coriorretinitis serosa central.

5 La presente invención también se refiere a un antagonista de RM o a un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para su uso en la prevención de los efectos secundarios inducidos por glucocorticoides durante el tratamiento de la acumulación de líquido en y/o bajo la retina asociada con la coriorretinitis serosa central.

10 Como se utiliza en el presente documento, el término "agonista del receptor de mineralocorticoides (RM)" es un compuesto natural o sintético que se une al receptor de mineralocorticoides para activar dicho sitio receptor de mineralocorticoides para iniciar una vía de señalización y otros procesos biológicos.

15 Generalmente, el agonista de RM es aldosterona o su análogo. Como se utiliza en el presente documento, el término "análogo" se refiere a un agente que es estructuralmente similar a otro, pero difiere ligeramente en la composición, por ejemplo la sustitución de un átomo con un átomo de un elemento diferente o grupo funcional. Por ejemplo, un análogo de aldosterona es fludrocortisona que es 9-fluoro-11,17-dihidroxi-17-(2-hidroxiacetil)-10,13-dimetil-1,2,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidrociclopenta[a]fenantren-3-ona.

20 De acuerdo con la invención, los principios activos de la invención (p. ej., antagonistas o agonistas de RM) se administran al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del principio activo para tratar la acumulación de líquido en y/o bajo la retina en una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

25 Ha de entenderse que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención se decidirá por el médico de cabecera en el alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto particular dependerá de diversos factores incluyendo el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración, y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o de forma simultánea con el polipéptido específico empleado; y los factores muy conocidos en las materias médicas. Por ejemplo, es adecuado en la experiencia de la materia comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta alcanzar el efecto deseado. No obstante, la dosificación diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto al día. Preferentemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación del sujeto a tratar. Un medicamento contiene en general aproximadamente de 35 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del principio activo, preferentemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del principio activo. Se proporciona normalmente una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, en especial aproximadamente de 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal al día.

45 Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferentemente, un sujeto según la invención es un humano.

Los principios activos de la invención (p. ej., antagonista o agonistas de RM) pueden combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente con matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones farmacéuticas.

50 El término "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras perjudiciales cuando se administra a un mamífero, especialmente a un ser humano, según proceda. Un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un material de relleno sólido no tóxico, semisólido o líquido, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, los principios activos de la invención pueden administrarse en una forma unitaria de administración, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas por 60 vía oral, tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

65 Preferentemente, las vías oculares locales deben utilizarse como inyecciones intravítreas, tópicas, perioculares (subconjuntival, peribulbar, bulbar lateral, retrobulbar, sub-tenoniana, supracoroidea), implantes intra o perioculares

(intraescleral, periescleral, epiescleral), implantes intravítreos o implantes supracoroideos o partículas o composición polimérica, o cualquier sistema de liberación, tal como emulsiones, implantes o comprimidos sólidos no biodegradables o degradables, mini bombas o cualquier formulación tópica.

5 Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de inyectarse. Estas pueden ser, en particular, soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, sodio, potasio, cloruro de magnesio o calcio y similares o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que tras la adición, en función del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

10 Las formas farmacéuticas aptas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma ha de ser estéril y fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Ha de ser estable en condiciones de fabricación y almacenamiento y ha de preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias, virus y hongos.

15 Las soluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada de forma adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Del mismo modo las dispersiones pueden prepararse en glicerol, en polietilenglicoles líquidos, en sus mezclas y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

20 Los principios activos de la invención pueden formularse en una composición en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) que se obtienen a partir de ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o de ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos sódico, potásico, amónico, cálcico, o férrico, y de bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

25 El transportador también puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, utilizando un revestimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y utilizando tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede realizarse por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

30 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los principios activos de la invención en la cantidad requerida en el disolvente apto con diferentes ingredientes indicados más arriba, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados previamente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

35 Tras la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como soluciones inyectables descritas anteriormente, aunque también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármaco y similares.

40 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se tampona adecuadamente en caso necesario y el diluyente líquido se hace primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Dichas soluciones acuosas particulares son especialmente apropiadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse se conocerán por los expertos en la materia a tenor de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1.000 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio propuesto de infusión. Aparecerá necesariamente cierta variación en la dosificación en función de la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en todo caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

45 Además de los principios activos de la invención formulados para administración parenteral, tales como inyección

intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p. ej., comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación lenta; y cualquier otra forma utilizada actualmente.

- 5 El principio activo puede asimismo administrarse directamente en el ojo por inyección en el tejido ocular, tal como inyecciones periocular, conjuntival, sub-tenoniana, intracameral, intravítrea, intraocular, subretiniana, subconjuntival, retrobulbar, supracoroidea o intracanaliculares; por aplicación directa en el ojo empleando un catéter u otro dispositivo de colocación, tal como un pellet de retina, inserto intraocular, supositorio o un implante que comprende un material poroso, no poroso, o gelatinoso; con gotas o ungüentos tópicos oculares; o mediante un dispositivo de liberación lenta en el fondo de saco o implantado junto a la esclerótica (transesclerótica) o en la esclerótica (intraesclerótica) o supracoroidea o dentro del ojo. La inyección intracameral puede realizarse por la córnea en la cámara anterior para permitir que el agente alcance la malla trabecular. La inyección intracanalicular puede realizarse en los canales colectores venosos que drenan el canal de Schlemm o en el canal de Schlemm.
- 10
- 15 Para la administración oftálmica, un principio activo puede combinarse con conservantes, codisolventes, tensioactivos, potenciadores de la viscosidad, potenciadores de la penetración, tampones oftalmológicamente aceptables, cloruro sódico, o agua para formar una suspensión o solución acuosa, estéril oftálmica. Las formulaciones en solución pueden prepararse disolviendo el principio activo en un tampón acuoso isotónico fisiológicamente aceptable. Además, la solución puede incluir un tensioactivo aceptable que ayude a disolver el principio activo. Los agentes que aumentan la viscosidad, tales como hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, o similares, pueden añadirse a las composiciones de la presente invención para mejorar la retención del compuesto.
- 20

- 25 Con el fin de preparar una formulación de pomada oftálmica estéril, el principio activo se combina con un conservante en un vehículo apropiado, tal como aceite mineral, lanolina líquida o vaselina blanca. Las formulaciones con gel oftálmico estéril pueden prepararse suspendiendo el principio activo en una base hidrófila preparada a partir de la combinación, por ejemplo, de CARBOPOL®-940 (BF Goodrich, Charlotte, NC), o similares, según los métodos conocidos en la materia. Puede utilizarse, por ejemplo, VISCOAT® (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) para la inyección intraocular. Otras composiciones de la presente invención pueden contener agentes potenciadores de la penetración, tales como cremophor y TWEEN® 80 (monolaurato de polioxietileno sorbitán, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), en el caso de que el ingrediente activo sea menos penetrante en el ojo.
- 30

- 35 En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención es una formulación de gotas oftálmica. El colirio se proporciona en cualquier formulación generalmente utilizada, por ejemplo, en forma de colirio acuoso, tal como colirio en solución acuosa, colirio en suspensión acuosa, colirio en solución viscosa, colirio en solución solubilizada y similares, o en forma de un colirio no acuoso, tal como un colirio en solución no acuosa, colirio en suspensión no acuosa y similares. Cuando la composición de la presente invención se prepara como un colirio acuoso, contiene preferentemente un aditivo que se utiliza generalmente en un colirio acuoso. Los ejemplos de dicho aditivo incluyen conservantes, agentes isotónicos, agentes tamponantes, estabilizadores, reguladores del pH o similares.
- 40

En otra realización particular, los principios activos de la invención se administran por un implante ocular biodegradable.

- 45 Los implantes pueden formarse de manera tal que el principio activo se distribuya o disperse homogéneamente en la matriz polimérica biodegradable. Adicionalmente, los implantes pueden formarse para liberar el principio activo en una región ocular del ojo durante diversos periodos de tiempo. Por consiguiente, el principio activo puede liberarse de los implantes fabricados según la presente invención durante un periodo de tiempo, por ejemplo, de 30-200 días.
- 50 El principio activo puede comprender aproximadamente 10 % a aproximadamente 90 % en peso del implante. En una variante, el agente es aproximadamente 40 % a aproximadamente 80 % en peso del implante. En una variante preferente, el agente comprende aproximadamente 60 % en peso del implante.

- 55 En una realización particular, el principio activo puede dispersarse de forma homogénea en el polímero biodegradable del implante. El implante puede fabricarse, por ejemplo, por un método de extrusión secuencial o doble. La selección del polímero biodegradable utilizado puede variar con la cinética de liberación deseada, la tolerancia del paciente, la naturaleza de la enfermedad a tratar, y similares. Las características del polímero que se consideran incluyen, entre otras, la biocompatibilidad y la biodegradabilidad en el sitio de implante, la compatibilidad con el principio activo de interés, y las temperaturas de procesamiento. La matriz polimérica biodegradable comprende habitualmente al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, o al menos aproximadamente 90 por ciento en peso del implante. En una variante, la matriz polimérica biodegradable comprende aproximadamente 40 % a 50 % en peso del implante.
- 60
- 65

Los polímeros biodegradables que pueden utilizarse incluyen, entre otros, polímeros fabricados de monómeros, tales

como ésteres o éteres orgánicos, que cuando se degradan producen productos de degradación fisiológicamente aceptables. Igualmente pueden utilizarse anhídridos, amidas, ortoésteres o similares, solos o en combinación con otros monómeros. Los polímeros son generalmente polímeros de condensación. Los polímeros pueden ser reticulados o no reticulados. Si son reticulados, por lo general, no son más que ligeramente reticulados, y están reticulados menos de 5 %, por lo general reticulados menos de 1 %. De particular interés son los polímeros de ácidos carboxílico hidroxialifático, ya sean homo- o copolímeros, y polisacáridos. Se incluyen entre los poliésteres de interés homo- o copolímeros de ácido D-láctico, ácido L-láctico, ácido láctico racémico, ácido glicólico, caprolactona y sus combinaciones. Los copolímeros de ácido glicólico y láctico son de particular interés, en los que la velocidad de biodegradación se controla por la relación de ácido glicólico con respecto a ácido láctico. El porcentaje de cada monómero en el copolímero poli(ácido láctico-co-glicólico) (PALG) puede ser 0 a 100 %, aproximadamente 15-85 %, aproximadamente 25-75 %, o aproximadamente 35-65 %. En ciertas variantes, se utilizan copolímeros de 25/75 PALG y/o 50/50 PALG. En otras variantes, los copolímeros de PALG se emplean en combinación con polímeros de polilactida o poliuretanos.

Se pueden emplear otros agentes en la formulación para diversos fines. Por ejemplo, pueden emplearse agentes tamponantes y conservantes. Los conservantes que pueden emplearse incluyen, entre otros, bisulfito de sodio, bisulfato de sodio, tiosulfato de sodio, cloruro de benzalconio, clorobutanol, timerosal, acetato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, metilparabeno, alcohol polivinílico y alcohol feniletílico. Ejemplos de agentes tamponantes que pueden emplearse incluyen, entre otros, carbonato de sodio, borato de sodio, fosfato de sodio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, y similares, aprobados por la ADA para la vía de administración deseada. Los electrolitos tales como cloruro de sodio y cloruro de potasio también pueden incluirse en la formulación.

Los implantes oculares biodegradables pueden incluir asimismo compuestos hidrófilos o hidrófobos adicionales que aceleran o retrasan la liberación del principio activo. Adicionalmente, los moduladores de liberación tales como los descritos en la patente de Estados Unidos n.º 5.869.079 pueden incluirse en los implantes. La cantidad de modulador de liberación empleada dependerá del perfil de liberación deseado, la actividad del modulador, y del perfil de liberación del principio activo en ausencia de modulador. Cuando el agente tamponante o potenciador o modulador de liberación sea hidrófilo, también puede actuar como un acelerador de la liberación. Los aditivos hidrófilos actúan al aumentar la velocidad de liberación a través de una disolución más rápida del material que rodea las partículas de fármaco, que incrementa el área superficial del fármaco expuesto, aumentando de este modo la velocidad de difusión del fármaco. De manera similar, un agente tamponante o potenciador o modulador hidrófobo puede disolverse más lentamente, ralentizando la exposición de las partículas del fármaco, y de modo tal que retrase la velocidad de difusión del fármaco.

La cinética de liberación de los implantes de la presente invención puede depender en parte del área superficial de los implantes. Un área superficial mayor expone más polímero y principio activo al fluido ocular, causando erosión más rápida de la matriz polimérica y disolución de las partículas del principio activo en el fluido. Por lo tanto, el tamaño y la forma del implante también pueden utilizarse para controlar la velocidad de liberación, el periodo de tratamiento, y la concentración de principio activo en el sitio del implante. Con las mismas cargas de principios activos, los implantes de mayor tamaño administrarán una dosis proporcionalmente mayor, pero en función de la relación de superficie a masa, pueden poseer una velocidad de liberación más lenta. Para el implante en una región ocular, el peso total del implante oscila preferentemente, p. ej., de aproximadamente 200-15.000 [mu] g, usualmente de aproximadamente 1.000-5.000 [mu] g. En una variante, el peso total del implante es de aproximadamente 1.200 a aproximadamente 1.800 [mu] g. En otra variante, el peso total del implante es de aproximadamente 2.400 a aproximadamente 3.600 [mu] g. Preferentemente, el implante tiene un peso entre aproximadamente 100 [mu] g y aproximadamente 2 mg.

Los implantes de la invención son en general sólidos, y pueden formarse como partículas, láminas, parches, placas, películas, discos, fibras, varillas, y similares, o pueden presentar cualquier tamaño o forma compatible con el sitio seleccionado de implante, siempre que los implantes posean la cinética de liberación deseada y administren una cantidad de principio activo que sea terapéutica para la afección médica prevista del ojo. El límite superior para el tamaño del implante se determinará por factores tales como la cinética de liberación deseada, la tolerancia al implante en el sitio de implante, las limitaciones de tamaño en la inserción, y su sencilla manipulación. Por ejemplo, la cámara vítrea es capaz de acomodar implantes relativamente grandes en forma de varilla, que poseen generalmente diámetros de aproximadamente 0,05 mm a 3 mm y una longitud de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mm. En una variante, las varillas poseen diámetros de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm. En otra variante, las varillas poseen diámetros de aproximadamente 0,3 mm a aproximadamente 0,75 mm. En otra variante adicional, también pueden utilizarse otros implantes que poseen geometrías variables pero volúmenes aproximadamente similares.

Los implantes biodegradables pueden insertarse en el ojo mediante diversos métodos, incluyendo la colocación por fórceps, por trocar, o por otros tipos de aplicadores, después de realizar una incisión en la esclerótica. En algunos casos, un trocar o aplicador puede utilizarse sin realizar una incisión. En una variante preferente, se utiliza un aplicador manual para insertar uno o más implantes biodegradables en el ojo. El aplicador manual comprende normalmente una aguja de acero inoxidable 18-30 GA, una manilla, un actuador, y un émbolo. Los dispositivos aptos para insertar un implante o implantes en una región o sitio ocular posterior incluyen los descritos en la solicitud de la

patente de Estados Unidos n.º 10/666.872.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras. Sin embargo, estos ejemplos no han de interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

**EJEMPLO 1: LA NEURORRETINA ES UNA DIANA INNOVADORA DE MINERALOCORTICOIDES: LA ALDOSTERONA AUMENTA LOS CANALES IÓNICOS Y DE AGUA EN LAS CÉLULAS GLIALES DE MÜLLER**

**Resumen**

Los glucocorticoides (G) reducen el edema macular diabético, pero los mecanismos subyacentes a los efectos de los G se esclarecen de manera limitada. G pueden unirse a los receptores de glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM). Se supone que la activación de RM puede influir en la hidratación de la retina. El efecto de aldosterona, agonista de RM, (24 h) en la expresión de los canales iónicos/de agua (PCR en tiempo real, membrana de western, inmunofluorescencia) se investigó en células gliales retinianas de Müller (GRM) cultivadas, que contribuyen a la homeostasis de líquido en la retina), en explantes retinianos de rata Lewis y en retinas con inyección de aldosterona en los ojos. Resultó evidente la expresión específica de la célula de RM, RG y 11-beta hidroxisteroide deshidrogenasa tipo II. La aldosterona potencia de manera significativa la expresión de los canales de sodio y potasio CNaE- $\alpha$  (6,5 veces) y Kir4.1 (1,9 veces) por la ocupación de RM y RG, mientras que el aumento de la acuaporina 4 (AQP4, 2,9 veces) es selectivo en RM. La inyección intravítrea de aldosterona induce la inflamación de la retina (aumento del 24 % en comparación con la inyección simulada en los ojos) y la activación de GRM. Se promueve la localización adicional de Kir4.1 y AQP4 hacia las microvellosidades apicales de GRM. Nuestros resultados ponen de manifiesto la sensibilidad de los mineralocorticoides de la neurorretina y muestran que la aldosterona controla la hidratación de la retina saludable a través de la regulación de la expresión de los canales iónicos/de agua en GRM. Estos resultados proporcionan una base para futuras investigaciones de la señalización de RM anormal en la retina patológica.

**Introducción**

Los canales iónicos y las acuaporinas se expresan diferencialmente en células retinianas, y desempeñan un papel importante en los movimientos iónicos y del agua que son cruciales para el control adecuado de la hidratación de la retina. Particularmente, las células gliales retinianas de Müller (GRM) son elementos clave en el control de la hidratación y la homeostasis retinianas de potasio, ya que establecen por una parte una conexión anatómica y funcional entre las neuronas de la retina y los vasos sanguíneos de la retina, y por otra parte con el vítreo y el espacio subretinal. Cualquier alteración en los procesos de deshidratación de la retina conduce a un edema en la retina.

Las elevadas dosis de corticosteroides se inyectan en este momento en la cavidad vítrea de los pacientes con edema macular debido a sus efectos antiinflamatorios y antiedematosos en la retina, pero se asocian con efectos secundarios frecuentes y ocasionalmente graves como hipertensión o toxicidad intraocular debido a la reducción de la viabilidad celular retiniana por paraptosis. Los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos de los glucocorticoides en el ojo siguen siendo en gran parte desconocidos, por más que las hormonas glucocorticoides actúen a través de la unión al receptor de glucocorticoides (RG) y también al receptor de mineralocorticoides (RM). De hecho, el RM presenta una elevada afinidad similar para la aldosterona y para las hormonas glucocorticoides que prevalecen en gran medida en el plasma. Se evita la ocupación permanente del RM por los glucocorticoides circulantes en gran medida por la enzima metabolizante 11-beta hidroxisteroide deshidrogenasa tipo II (HSD2) en tejidos sensibles a mineralocorticoides que coexpresan RM y HSD2. Tanto RG como RM son factores de transcripción dependientes del ligando que pertenecen a los receptores nucleares de la superfamilia. Mientras RG ejerce efectos pleiotrópicos sobre la homeostasis y el metabolismo celular, el RM se implica de manera clásica en la regulación de la reabsorción renal de sodio. De hecho, la vía de aldosterona/RM aumenta la actividad del canal de sodio epitelial (CNaE) en el conducto colector renal, a través de una compleja cascada de eventos y también favorece la excreción de potasio a través de la regulación de los canales de K.

La identificación progresiva de tejidos diana de RM innovadores (corazón, vasos, cerebro, piel, adipocitos, macrófagos...) resolvió papeles inesperados de este receptor. Curiosamente, en el ojo, también se expresa el RM pero la información sobre su actividad biológica y relevancia clínica potencial es insuficiente. Particularmente, en la retina, las funciones y la expresión específica de la célula de RM, RG y HSD2 están lejos de establecerse completamente. Cuándo y cómo las hormonas corticosteroides y particularmente la aldosterona contribuyen a la homeostasis de la retina normal permanecen sin determinar. Se plantea que el RM puede implicarse en la homeostasis de los líquidos de la retina.

En este contexto, este estudio se concibió para documentar la respuesta a la aldosterona (24 h) como un regulador de los canales iónicos y de agua. Se demuestra que el RM, RG y HSD2 se coexpresan en el neurorretina de rata. Se halló que la inyección intraocular aguda de aldosterona aumenta el grosor de la retina, presumiblemente por la acumulación de líquido en la neurorretina. En GRM, la aldosterona aumenta la expresión de los canales de potasio de rectificación interna Kir4.1 y de la subunidad  $\alpha$  de CNaE a través de la activación de RM y principalmente de RG,

mientras que la acuaporina 4 (AQP4) aumenta de manera específica por la vía de aldosterona/RM. La aldosterona favorece también la localización de Kir4.1 y AQP4 hacia las microvellosidades apicales de las células de Müller. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la neuroretina y más específicamente las células GRM son innovadoras dianas de aldosterona. Por tanto, la hormona puede considerarse como una nueva pieza en la regulación de la homeostasis y la hidratación de la retina saludable.

### **Materiales y métodos**

**Animales:** Todos los experimentos se realizaron según la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas 86/609/CEE y se aprobaron por los comités éticos locales. Se utilizaron ratas Lewis adultas hembra (8-12 semanas de vida, Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Francia) para la preparación de cultivos primarios de GRM, cultivos organotípicos retinianos y experimentos *in vivo*. Las ratas se sacrificaron por inhalación de dióxido de carbono.

**Cultivo primario de GRM en rata:** Se obtuvieron células GRM de rata descritas en (de Kozak, Y., Naud, M. C., Bellot, J., Faure, J. P., y Hicks, D. (1994) *Differential tumor necrosis factor expression by resident retinal cells from experimental uveitis-susceptible and -resistant rat strains*. J Neuroimmunol 55, 1-9). En pocas palabras, se sacrificaron las ratas postnatales (PN) al día 17 (cuando las células GRM son maduras) y se enuclearon los ojos. Los globos oculares se mantuvieron intactos en MEMD durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad, y después se incubaron 45 min con 2 mg/ml de tripsina/colagenasa I a 37 °C. Las retinas neurales se separaron de la lente y el vítreo, se cortaron en pequeños fragmentos y se sembraron en placas de Petri que contenían MEMD suplementado con STF al 10 %, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y anfotericina B al 0,2 %. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 5 a 6 días, los cultivos se lavaron extensamente con medio de modo que solo se mantuvo una población celular plana fuertemente adherente.

**Tratamientos con corticosteroides de las células cultivadas:** Las células de Müller se sembraron en placas de cultivo tisular de 6 pocillos (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francia). Las células GRM de rata PN17 se mantuvieron en sus placas de Petri iniciales. Las células subconfluentes (80 %) se incubaron en medio suplementado con STF (tratado con carbón) libre de esteroides al 10 % durante 24 horas. Los tratamientos con corticosteroides (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Francia) se aplicaron a continuación, respectivamente, durante un periodo de 24 h: 10 nM de aldosterona, 10 nM de aldosterona más 1 µM de RU38486 (antagonista específico para RG), 10 nM de aldosterona más 1 µM de RU26752 (antagonista específico para RM) o 1 µM de dexametasona. Los esteroides se disolvieron previamente en medio STF libre de esteroides al 2 % que contiene etanol al 0,1 %. Las células de control se trataron con etanol al 0,1 % en medio. La adición de solo los antagonistas (es decir, en ausencia de aldosterona) también se realizó en células de Müller y no indujo la expresión de los genes analizados.

**Explantado retiniano en rata:** Tras la enucleación, las retinas de ratas se aislaron de inmediato en condiciones asépticas y se cortaron en 4 partes. Posteriormente se trasladaron a una membrana de policarbonato de 0,2 µm Cyclopore (Whatman, Maidstone, Inglaterra), y se montaron horizontalmente con la cara vítrea hacia arriba. Las membranas de soporte se colocaron en placas de cultivo tisular de 6 pocillos que contenían 2 ml de MEMD suplementado con STF libre de esteroides al 10 %, penicilina-estreptomina al 1 % y anfotericina B al 0,1 %. Los explantes se trataron con corticosteroides como se describe para las células cultivadas. Del mismo modo, el efecto dependiente de la dosis de aldosterona (0,1-100 nM) se analizó en explantes retinianos en experimentos separados.

**Transcripción inversa y PCR en tiempo real:** ARN total se aisló de las células GRM tratadas y de los explantes retinianos utilizando el mini kit RNeasy (Qiagen, Courtaboeuf, Francia). ADNc de primera cadena se sintetizó después del tratamiento con DNasa I (Qiagen) utilizando cebadores aleatorios (Invitrogen) y transcriptasa inversa superscript II (Invitrogen). Los niveles de transcritos de CNaE- $\alpha$ , Kir4.1 y AQP4 se analizaron por PCR en tiempo real realizado en un sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), ya sea con detección TaqMan® (Applied Biosystems) o SYBR® Green (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia). Se utilizó 18S como control interno.

**Membrana de Western:** Los explantes retinianos se homogeneizaron en tampón Np40 en presencia de inhibidores de la proteasa. La concentración proteica se determinó por el método de Bradford. Cantidades iguales de proteína (12 µg) se separaron con gel de Tris-Glicina Novex® al 4 %-12 % (Invitrogen), se transfirieron a nitrocelulosa, y las membranas se incubaron con anticuerpos primarios a 4 °C durante la noche. Las membranas se lavaron, se incubaron con IgG de cabra anti-conejo conjugada a peroxidasa de rábano picante (1:3000, Vector, AbCys, Paris, Francia) durante 1 h a temperatura ambiente, y se desarrollaron utilizando reactivos de detección de inmunoelectrotransferencia ECL Plus (GE healthcare, Orsay, Francia). La  $\beta$ -actina se utilizó como control interno. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: CNaE de conejo anti-alfa (1:500, Abcam, Cambridge, MA, EE. UU.), conejo anti-Kir4.1 (1:400, Alomone Labs, Jerusalén, Israel), conejo anti-AQP4 (1:750, Millipore, St Quentin en Yvelines, Francia) y conejo anti- $\beta$ -actina (1:1000, Abcam).

**Inyección intravítrea en ojos de ratas:** La anestesia en las ratas se indujo por inyección intramuscular de ketamina (100 mg/kg, Virbac, Carros, Francia) y clorpromazina (0,65 mg/kg, LARGACTIL®, Sanofi Aventis, Livron sur Drôme,

Francia). Las inyecciones intravítreas se realizaron con jeringas microfinas (300  $\mu$ l) con agujas 30G con anestesia tópica (tetracaina al 1 %, Aldrich, Lyon, Francia). En los ojos de rata se inyectaron 5  $\mu$ l de aldosterona diluida en solución salina al 0,9 % para obtener una concentración de 200 nM para la inyección, que corresponde a una concentración final de 20 nM en el vítreo. En los ojos de rata del control se inyectaron 5  $\mu$ l de solución salina. Veinticuatro horas después de la inyección, se sacrificaron las ratas. Los ojos se eliminan a continuación para el montaje plano retiniano, inmunohistoquímica y análisis morfológico, respectivamente.

**Montaje plano retiniano:** Los ojos se fijaron durante 15 minutos en paraformaldehído al 4 % (PFA, LADD, Inland Europe, Conflans-sur-Lanterne, Francia). Tras el lavado, se aislaron las retinas, se cortaron en 4 incisiones ortogonales y se fijaron posteriormente con acetona al 100 % a -20 °C durante 15 min. A continuación se rehidrataron con solución tampón fosfato salino (TFS) que contiene Triton X-100 al 1 %, y se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo contra AQP4 (1:100) o un anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína ácida fibrilar de la glía (PAFG, 1:100, Dako, Trappes, Francia) a temperatura ambiente con agitación durante la noche. Después de lavarse con TFS, se aplicó una IgG de cabra anti-conejo conjugada a Alexa Fluor 488 (1:100, Molecular Probes, Leiden, Holanda) durante 1 h. Los vasos sanguíneos se tiñeron con lectina marcada con TRITC de *Bandeiraea simplicifolia* BS-1 (1:100, Sigma-Aldrich). Las retinas se montaron en plano utilizando un montaje en gel (Biomedica Corp., VWR, Fontenay-sous-Bois, Francia). Las imágenes se realizaron empleando un microscopio de barrido láser confocal Zeiss LSM 710 (Oberkochen, Alemania).

**Inmunofluorescencia:** Los ojos se congelaron instantáneamente en el compuesto Tissue-Tek OCT (Bayer Diagnostics, Puteaux, Francia). Se fijaron secciones de criostato de diez  $\mu$ m de ojos de rata en PFA al 4 % durante 15 minutos y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % durante 30 minutos. Los sitios de unión no específicos se bloquearon con suero de cabra normal al 5 % durante 1 h. Las secciones se incubaron después con anticuerpos primarios durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron en TFS, y se incubaron adicionalmente con anticuerpos secundarios durante 1 h. Tras el lavado, los portaobjetos se tiñeron durante 5 minutos con 4',6-Diamidino-2-Fenil-Indol (DAPI, 1:3000, Sigma-Aldrich), se volvieron lavar, y se montaron con montaje de gel. Las secciones de control se tiñeron sin anticuerpos primarios. Las imágenes se realizaron empleando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, Rungis, Francia) equipado con una cámara CCD (Olympus DP70). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: CNaE de conejo anti-alfa (1:100), conejo anti-Kir4.1 (1:200), conejo anti-AQP4 (1:200), IgG de cabra anti-conejo acoplada a Alexa Fluor 488 (1:200), y IgG de cabra anti-conejo conjugada a Alexa Fluor 596 (1:200, Molecular Probes).

**Inmunohistoquímica:** Los ojos enucleados se fijaron en PFA al 4 % durante 2 horas, se deshidrataron e incluyeron en parafina. Secciones de diez  $\mu$ m se desparafinaron en xileno, se hidrataron en una serie de alcohol graduado, y se lavaron en TFS-Tween (TFST). Tras la recuperación del antígeno por calentamiento en tampón citrato y la inactivación de la peroxidasa endógena por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 %, las secciones se incubaron con suero de caballo normal al 3 % o con un tampón de bloqueo en el kit de amplificación de la señal con tiramida (AST) (Perkin Elmer, Courtaboeuf, Francia) para reducir la señal no específica. Los anticuerpos primarios se aplicaron durante la noche a 4 °C. Tras lavarse en TFST, las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios biotinilados durante 45 min a temperatura ambiente. Se obtuvo la amplificación de la señal con el kit de AST o el kit VECTASTAIN ABC (Vector) según las instrucciones del fabricante. La señal se reveló con tetrahidrocluro 3,3'-diaminobenzidina (Dako). Las secciones renales de rata se utilizaron como controles positivos. Se realizaron controles negativos sin anticuerpos primarios. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: 6G1 monoclonal de ratón anti-RM (1:100, proporcionado amablemente por C. Gomez-Sanchez, División de Endocrinología del Centro Médico de la Universidad de Mississippi, Jackson, MS), HSD2 de oveja anti-11 $\beta$  (1:2000, Millipore), conejo anti-RG (1:2000, Santa Cruz, Heidelberg, Alemania), CNaE de conejo anti-alfa (1:200), IgG de caballo anti-ratón biotinilada BA2000 (1:250, Vector), IgG de conejo anti-oveja biotinilada BA6000 (1:400, Vector) e IgG de cabra anti-conejo biotinilada BA1000 (1:500, Vector).

**Morfología:** Los ojos enucleados se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en tampón cacodilato (0,1 M, pH 7,4). Después de 30 min, los ojos se diseccionaron a nivel del limbo y la lente se separó. La parte posterior se fijó durante 5 h, se deshidrató en una serie de alcohol graduado (50 %, 70 %, 95 % y 100 %) y se fijó con resina epoxi. Las secciones semifinas (1  $\mu$ m) se cortaron utilizando un ultramicrotomo (Reichert Ultracut E, Leica, Wetzlar, Alemania), y se tiñeron con azul de toluidina. La morfología se analizó con un microscopio de luz (DMRB, Leica). El grosor de la retina se midió manualmente cada 100  $\mu$ m desde la periférica al polo posterior. Para el análisis, la retina se dividió en 3 zonas: periferia, medio y polo posterior. En cada zona, se realizaron 3-4 mediciones individuales en cada sección. Se analizaron dos a 6 secciones por rata (3 ratas con inyección intravítrea de aldosterona y 3 con inyección simulada).

**Estadística:** Los datos se expresaron como media  $\pm$  E.E. El análisis estadístico se realizó empleando el programa Graphpad Prism5 (Graphpad Software, San Diego, CA, EE. UU.). El ensayo de t Student se utilizó para dos grupos, el ensayo de ANOVA de una vía seguido por comparación de Bonferroni para múltiples grupos. P < 0,05 considerado significativo.

## 65 **Resultados**

**RM RG y HSD2 se coexpresan en las células retinianas:** Como prerrequisito para buscar efectos dependientes de aldosterona, se ha analizado la expresión del receptor de corticosteroides en la retina de rata (las diferentes zonas de la retina se proporcionan en una sección semifina de una retina de rata normal para su comprensión). Se halló que el RG se expresa en varias zonas de la retina y que el RM se expresa también en las mismas regiones de la retina, es decir, en los núcleos de las células ganglionares (capa de células ganglionares, CCG) y de las células en la capa nuclear interna (CNI) que contiene células bipolares, células amacrinas, células horizontales y células GRM. Los núcleos de las células GRM se encuentran principalmente en la parte central de la CNI. Para evaluar la especificidad de la inmunohistoquímica de RM de la retina, se utilizó el anticuerpo de RM en secciones del riñón, mostrando inmunomarcaje restringido en la nefrona distal, como era de esperar. La enzima protectora de RM HSD2 presenta una localización similar al RM, en las células ganglionares y en las células de la CNI, así como en la nefrona distal, proporcionada como control positivo. Aunque la inmunohistoquímica no es un método cuantitativo, la intensidad comparable de marcaje de RM y HSD2 en la retina y en los conductos colectores renales sugiere que su nivel significativo de expresión en el ojo debe permitir totalmente efectos de aldosterona/específicos de RM como en el riñón.

**La aldosterona induce la acumulación de líquido intrarretinal:** Una única inyección de aldosterona (20 nM) en la cavidad vítrea de ratas Lewis induce cambios morfológicos en la retina 24 h más tarde. El examen de las secciones semifinas muestra la acumulación de líquido en toda la retina, especialmente entre los núcleos de la capa nuclear externa (CNE) en comparación con la inyección simulada en la retina. Los procesos apicales de las prolongaciones celulares GRM o sus espacios extracelulares circundantes parecían inflamados. El grosor de la retina aumenta significativamente con la inyección de aldosterona en los ojos en comparación con la inyección simulada.

**La aldosterona potencia la activación glial:** La PAFG es una proteína de filamento intermedio presente en la GRM y en los astrocitos de la retina. Su aumento es un evento temprano en condiciones de estrés de la retina. La aldosterona potencia la activación glial como sugiere la distribución de PAFG a lo largo de las prolongaciones de células GRM con la inyección de aldosterona en las retinas en comparación con la inyección simulada en las retinas. Con la inyección simulada en las retinas, PAFG se expresa sobre todo en los pies terminales de GRM y en los astrocitos de la capa de fibra nerviosa (CFN). Con la inyección de aldosterona en las retinas, la inmunotinción de PAFG se potencia en la CFN y se extiende a lo largo de las prolongaciones GRM hasta los procesos apicales en la membrana limitante externa (MLE).

**La aldosterona y la dexametasona aumentan los CNaE- $\alpha$  en las células GRM:** El canal de sodio CNaE es una diana principal de mineralocorticoides en células de los conductos colectores renales que transportan sodio. Se halló que CNaE se expresa en células retinianas, y su expresión se regula por corticosteroides. La aldosterona (10 nM durante 24 h) induce un aumento significativo de la expresión del ARNm de la subunidad  $\alpha$  del CNaE en cultivos primarios de GRM de rata y en explantes retinianos de rata. El aumento de los transcritos de la subunidad  $\alpha$  de CNaE se inhibe por ambos antagonistas de RM (RU26752) y RG (RU38486) que indican que el aumento de CNaE- $\alpha$  inducido por aldosterona se produce tanto por RM y en su mayoría dependiente de RG. Esto se confirma además por la eficacia del agonista de glucocorticoides dexametasona para aumentar la expresión de CNaE- $\alpha$ . La aldosterona aumenta los transcritos de CNaE- $\alpha$  de manera dependiente de la dosis; su expresión a nivel proteico también se aumenta y la proteína de CNaE inducida por aldosterona no se redujo en presencia del antagonista de RM RU 26752.

La inmunolocalización de CNaE en la retina a partir de la inyección de solución salina en ratas muestra que CNaE- $\alpha$  se expresa en las células de la CNI con algunas localizaciones en la membrana celular. Con la inyección de aldosterona en los ojos, la intensidad de la expresión de CNaE- $\alpha$  y el número de células que expresan CNaE- $\alpha$  se aumenta en la CNI. Los experimentos de control que utilizan el mismo anticuerpo de CNaE en secciones renales (inmunohistoquímica peroxidasa) confirman la especificidad del marcaje de CNaE- $\alpha$  restringida en los conductos colectores, mientras que la histoquímica sin el primer anticuerpo es negativa.

**La aldosterona y dexametasona controlan la expresión del canal de potasio Kir4.1 en la retina:** Kir4.1 se considera como el canal de potasio principal en células GRM y se ha documentado su patrón de expresión. En los cultivos primarios de GRM en rata y en explantes retinianos, tanto la aldosterona como la dexametasona aumentan Kir4.1; el antagonista de RG RU38486 es completamente eficaz en reducirla, mientras que el antagonista de RM presenta un efecto más débil (o no). El aumento dependiente de la dosis en los transcritos parece totalmente saturado en 10 nM de aldosterona. El canal de expresión a nivel proteico también aumenta por la aldosterona; la proteína Kir4.1 inducida por aldosterona se reduce en presencia del antagonista de RM RU 26752. No se ha facilitado ninguna explicación evidente de los efectos variables de RU 26752 en ARNm y en la proteína, pero se cree que el efecto observado por la membrana de Western puede reflejar mejor la regulación de aldosterona de Kir4.1. Por consiguiente, en su conjunto, se proporcionan datos que indican que Kir4.1 puede regularse por la vía de RM (además de ser dependiente de RG).

Asimismo, se observó un cambio en la localización de Kir4.1 en la retina con la inyección de aldosterona en los ojos de ratas Lewis. Con la inyección simulada en ratas, Kir4.1 se encuentra principalmente en torno a los vasos en la CNI, en la capa plexiforme interna, y en el pie terminal de Müller a nivel de la membrana limitante interna. La aldosterona intravítrea permite potenciar la inmunofluorescencia de Kir4.1 en las microvellosidades apicales de GRM

en la MLE. Estos resultados muestran que la aldosterona no solo aumenta la expresión de Kir4.1 sino que también modifica su distribución espacial en las células GRM.

#### **La aldosterona aumenta AQP4 en las células GRM por la activación de RM específica y en la retina de rata *in vivo*:**

Las células de Müller se involucran en la regulación del volumen de la retina, evitando el exceso de acumulación de agua durante la actividad neuronal. Esto se consigue mediante flujos de agua facilitados a través de AQP4. Cuando se añadió aldosterona a cultivos primarios de GRM o a explantes retinianos, se observó un aumento en la expresión de ARNm de AQP4 mientras que el agonista de glucocorticoides dexametasona es ineficaz. El efecto de la aldosterona se suprime por completo por el antagonista de RM RU26752, indicando que depende principalmente de la activación de RM. El antagonista de RG RU38486 reduce de alguna manera la inducción de la aldosterona de AQP4 en muestras de rata, posiblemente debido a las diferencias entre especies (la expresión de AQP4 puede depender parcialmente de RG activada por la aldosterona en la retina de rata, no en las células humanas). El aumento dependiente de aldosterona en el ARNm se satura a 10 nM. La hormona también aumenta la expresión de AQP4 a nivel proteico que se bloquea por RU26752. En general, AQP4 aparece como una diana específica de mineralocorticoides auténtica en las células de Müller.

Se descubrió que la aldosterona cambia el patrón de expresión de AQP4 en la retina. Con la inyección simulada en ratas, AQP4 se encuentra en los pies terminales de GRM y en las prolongaciones celulares GRM en torno a los vasos pero no se expresa a nivel de MLE. Con la inyección de aldosterona en los ojos, la expresión de AQP4 no solamente se potencia en los pies terminales de GRM y en torno a los vasos, sino que también se extiende a lo largo de las prolongaciones de GRM hasta la MLE en sus microvellosidades apicales.

Las imágenes confocales de la retina de rata montada plana con la inyección simulada o de aldosterona en los ojos ilustran los cambios en la localización de AQP4 inducidos por aldosterona *in vivo*. Con la inyección de aldosterona en los ojos, la fluorescencia de AQP4 perivascular es más intensa en los vasos superficiales situados en la CCG y en CFN así como en torno a los capilares profundos en comparación con la inyección simulada en los ojos. Es más, se produce mucha más señal de AQP4 en la MLE con la inyección de aldosterona en los ojos en comparación con la inyección simulada en los ojos. Por lo tanto, la aldosterona aumenta el nivel de expresión de AQP4 en las células GRM y modifica su distribución celular *in vivo*.

#### **Discusión**

La aldosterona y el receptor de mineralocorticoides son importantes moduladores de la reabsorción renal de sodio en las partes distales del túbulo renal, y también actúan en varios tejidos no renales, incluyendo las células no epiteliales, como cardiomiocitos, células endoteliales vasculares, queratinocitos o neuronas. Mientras que las vías de señalización subyacentes permanecen en gran parte sin determinar, una característica sorprendente de efectos extrarrenales reside en los enlaces entre la activación excesiva de mineralocorticoides y la patología. Por ejemplo, los informes sobre los efectos beneficiosos del antagonismo de RM en la insuficiencia cardíaca llevaron a la idea de que la señalización excesiva de RM produce daño cardiovascular. En el cerebro, RM neuronal es probable que participe en la modulación de la ansiedad, como se deduce en la sobreexpresión específica del cerebro de RM en ratones. Más recientemente, se ha demostrado que el ojo también expresa el RM y se ha mostrado su implicación en la patología vascular retiniana en un modelo de rata de retinopatía inducida por oxígeno. Mientras que la aldosterona no favoreció *per se* la angiogénesis retiniana, el antagonismo de RM redujo la angiogénesis patológica asociada con la inflamación y el estrés oxidativo en este modelo. Este informe también documentó la expresión de RM en la retina. El presente estudio confirma que RM se expresa en las células ganglionares y en las células de la capa nuclear interna. La expresión de RM también se encontró en cultivos primarios de GRM de rata y en explantes retinianos de rata. Además, se proporciona el patrón de expresión de RG específico de las células en la retina, que no se determinó previamente. También se mostró que el RM se coexpresa con la enzima protectora de MR HSD2, permitiendo de este modo la ocupación de RM específica de aldosterona y efectos en células GRM. La inactivación de la mayoría de glucocorticoides por HSD2, asociada a los mecanismos de selectividad postreceptora debe proporcionar las condiciones para las acciones de aldosterona específicas en la retina.

Como primer paso para esclarecer los efectos de la aldosterona primarios en la retina saludable, se demostró que la inyección de aldosterona en el vítreo del ojo conduce a un aumento en el grosor de la retina 24 h más tarde (reminiscencia de la acumulación de líquido). La aldosterona también activa las células GRM como se pone de manifiesto por la inmunotinción de PAFG. Dicha activación indica estrés de GRM no específico. Para documentar la participación de las células GRM, se evaluó los efectos del tratamiento con aldosterona 24 horas en células GRM cultivadas y en explantes retinianos. Apenas se ha evocado previamente la noción de que las células GRM pueden ser sensibles a la aldosterona en la literatura. Hay que destacar que hace 40 años se señaló que la aldosterona era casi tan potente como los glucocorticoides para inducir la actividad de la glutamina sintetasa (una enzima específica de GRM) en el desarrollo de la retina del embrión de pollo.

En el conducto colector renal, CNaE es una diana clásica de aldosterona/RM. Se ha indicado previamente la existencia de los canales de sodio sensibles a amilorida en GRM, y se ha propuesto que CNaE podría implicarse en la regulación del volumen celular. Nuestro hallazgo en la expresión de CNaE- $\alpha$  potenciada en GRM tras las exposiciones de mineralo- y glucocorticoides compara varios informes realizados sobre las células epiteliales. Se

plantea el papel de las hormonas corticosteroides y CNaE en adaptarse a la inflamación celular y/o participar en la eliminación de líquido de los espacios retinianos a los vasos retinianos o vítreo. Por consiguiente, la entrada de Na mediada por aldosterona puede ocurrir en células GRM tras la exposición hormonal.

5 Este estudio indica que la aldosterona aumenta el canal de potasio de Kir 4.1 y el canal de agua de AQP4. Kir4.1 es el principal canal de potasio de la GRM, en el que su expresión polarizada permite la entrada de K en GRM, desde el espacio extracelular que rodea las neuronas activadas, y su administración a los vasos sanguíneos retinianos y al vítreo, un proceso conocido como "sifonaje de potasio". Se ha demostrado que el canal de agua de AQP4 permite el movimiento del agua dentro y fuera de las células GRM. Se ha aportado la prueba de que el flujo de agua a través de AQP4 es importante para controlar la inflamación de la retina y el edema citotóxico. La coexpresión y la interacción funcional de Kir4.1 con AQP4 garantizan la homeostasis osmótica de la retina interna. Recientemente se ha cuestionado esta interacción funcional, ya que la distribución de Kir4.1 no se ve afectada en GRM de AQP4 de ratones con desactivación genética, y la reducción de la permeabilidad en agua en GRM de AQP4 de ratones con desactivación genética no va acompañada de alteraciones de las corrientes de K.

15 Los datos referidos en este caso se han obtenido después del tratamiento de tejidos/células con 10 nM de aldosterona, es decir, una concentración que se encuentra generalmente para provocar un efecto de mineralocorticoides *ex vivo* (mientras que de hecho son eficaces dosis más bajas *in vivo*); por ejemplo, se informó de las respuestas mediadas por RM que se producen después de la exposición con al menos 10 nM de aldosterona en las células renales, en las células endoteliales de la aorta o de la retina. Para documentar la especificidad de la respuesta observada, se combinó la información expedida a partir de 1) efectos de aldosterona dependiente de la dosis y experimentos de competición con antagonistas clásicos de RM y RG y 2) tratamiento con dexametasona. En total (y a pesar de cierta diferencia en la respuesta en función del contexto de especie/tejido/célula y cierto grado de superposición entre el control de aldosterona y glucocorticoides de la expresión génica en células retinianas), parece que CNaE y Kir4.1 pueden estar bajo control coordinado de RG/RM, mientras que AQP4 se regula esencialmente por la activación de RM mediante la aldosterona. En general, se considera que RM y RG ejercen un control de superposición parcial de la expresión génica, aunque con variaciones en la contribución relativa de cada receptor, según el contexto celular. Sin embargo, RM y RG no son redundantes, ya que la inactivación de cada receptor produce la mortalidad perinatal que no puede rescatarse por el otro receptor.

30 Se descubrió que el tratamiento de aldosterona de 24 h también favorece la localización de Kir4.1 y AQP4 hacia la región apical de GRM en la retina exterior orientada al epitelio pigmentario retiniano (EPR) que forma la barrera entre la neurorretina y los vasos coroideos. Esto indica que la potenciación de la señalización de mineralocorticoides en una retina saludable puede modificar la homeostasis de los líquidos normal en los diferentes compartimentos de la retina. El grosor potenciado de la retina observado tras la inyección intravítrea de aldosterona sugiere la acumulación de líquido. La relocalización de canales en la región de las células de Müller orientadas a EPR y a los capilares coroideos debe favorecer el movimiento del líquido de las células de Müller al espacio subretiniano. Sin embargo, la eliminación de líquido de la retina a través de EPR a los capilares coroideos puede ser insuficiente para superar los movimientos del líquido mediados por AQP4/Kir4.1 estimulados por aldosterona en la parte más externa de la retina, causando la inflamación de la retina. Se ha informado sobre un aumento en la expresión de AQP4 en la retina hipóxica, que presenta inflamación de astrocitos y células de Müller. En consecuencia, nuestros resultados están en consonancia con la noción de que AQP4 desempeña un papel importante en la inflamación de la retina.

45 En la diabetes, la actividad excesiva de RM se ha deducido a partir de la eficacia del antagonismo de RM para limitar la lesión del tejido, como se refleja en el tejido renal. Aún no se ha investigado si se puede implicar la señalización de aldosterona/RM alterada en la constitución del edema crónico retiniano, como en la retinopatía diabética. Esto es obviamente un asunto crucial, puesto que la actividad de RM puede bloquearse mediante las inyecciones intravítreas de antagonistas como la espirolactona o eplerenona.

50 En conclusión, este informe identifica una nueva vía de señalización por la que la hormona de aldosterona contribuye a la homeostasis de los líquidos en la retina. Ha de proporcionarse una razón para una mayor investigación de la función de RM de la retina en la patología, en particular, en la diabetes.

55 **EJEMPLO 2: LA COADMINISTRACIÓN DE PEQUEÑAS CANTIDADES DE GLUCOCORTICOIDES CON ANTAGONISTAS DE RM ES PARTICULARMENTE APTA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ACUMULACIÓN DE LÍQUIDO EN Y/O BAJO LA RETINA ASOCIADA CON LA RETINOPATÍA DIABÉTICA, GLAUCOMA, ISQUEMIA, MIOPIA, CORIORRETINITIS SEROSA CENTRAL, O LAS FORMAS EXUDATIVAS DE LA DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA CON LA EDAD.**

60 Se realizaron varios experimentos. Estos resultados muestran lo siguiente:

- la aldosterona aumenta la expresión del ARNm del canal de agua de AQP4 en las células GRM; la coadministración de aldosterona y un antagonista específico de RM (RU26752) bloquean completamente la inducción, demostrando que el aumento de AQP4 se produce a través de la ocupación de RM.
- 65 - la triamcinolona (TA) reduce la expresión de AQP4, un efecto claramente opuesto al de la aldosterona, imitando así el efecto que produce el antagonista específico de RM. Por lo tanto, los glucocorticoides y antagonistas de

RM poseen un efecto comparable en la expresión de AQP4, sugiriendo que la administración de antagonistas de RM proporcionará efectos antiedematosos en la retina comparables a los observados durante el tratamiento con triamcinolona.

- 5 - la glucocorticoide dexametasona (Dex) reduce la expresión génica de RM, un efecto no invertido por la adición de los antagonistas de RM.

10 Por lo tanto, la administración de pequeñas cantidades de glucocorticoides con antagonistas de RM será particularmente apta para el tratamiento de la acumulación de líquido en y/o bajo la retina asociada con la retinopatía diabética, glaucoma, isquemia, miopía, coriorretinitis serosa central, o las formas exudativas de la degeneración macular asociada con la edad. De hecho, dicha combinación evitará los efectos perjudiciales inducidos por la activación de RM en la retina.

### EJEMPLO 3: CORIORRETINOPATÍA SEROSA CENTRAL

15 La coriorretinopatía serosa central (CRCS) es un desprendimiento agudo seroso de retina, que afecta sobre todo al polo posterior y más específicamente a la mácula. La enfermedad comienza con la dilatación de los vasos coroideos, seguido por la apertura de las uniones en las células del epitelio pigmentario retiniano (EPR) y a continuación la acumulación de líquido bajo y/o en la retina.

20 Entre los factores de riesgo reconocidos, se identifican corticoterapia y estrés como los principales eventos. Se desconoce el mecanismo por el que los esteroides inducen esta acumulación de líquido bajo la mácula.

25 La afección desaparece espontáneamente en aproximadamente tres meses en el 70 % de los casos pero puede observarse cronicidad y causa agudeza visual pobre. Aproximadamente en el 40 % de los casos, pueden observarse recurrencias que dan lugar a epitelopatía retiniana difusa. En afecciones crónicas de acumulación de líquido intrarretiniano macular, pueden observarse quistes formados con el tiempo.

30 Se ha planteado la hipótesis de que CRCS podría tratarse eficazmente con antagonistas de RM debido al hecho de que la activación no apropiada de RM en la retina por el cortisol endógeno o corticoterapia podría interferir con los mecanismos de drenaje de líquido endógeno.

35 En este caso se demostró que las ratas Brown Norway que transportan una mutación por ganancia de función en el gen de RM, y que reciben una inyección intraocular de aldosterona o corticosterona, el corticosteroide endógeno de la rata, desarrollan una patología retiniana muy próxima a la CRCS (Figura 1 y 2).

Los pacientes con epitelopatía difusa no resolutive o crónica con acumulación de líquido macular se han tratado con eplerenona oral, un antagonista específico de RM.

40 Las Figuras 3 y 4 muestran ejemplos de pacientes tratados con eplerenona. Como se muestra, la eplerenona induce una regresión muy rápida y eficaz del fluido subretiniano y/o intrarretiniano en la retina. La cinética de la eficacia se produce desde la primera semana de uso.

45 La Figura 3 muestra el caso de un paciente que padece CRCS y con un seguimiento durante 4 meses sin resolución de la acumulación de líquido subretiniano en la retina. Por el contrario, 4 meses más tarde y a 1 semana antes del comenzar el tratamiento, la cantidad de líquido se había acumulado. El paciente recibió 25 mg/día por vía oral de eplerenona, un antagonista del receptor de mineralocorticoides específico, durante 8 días, y mostró una reducción sorprendente en el fluido subretiniano. A continuación, la dosis de eplerenona se aumentó a 50 mg/día durante 8 días y se mostró de nuevo una mejora casi completa de la resolución después de 2 semanas de tratamiento. El tratamiento se interrumpió después de 4 semanas de tratamiento y a los 6 meses el paciente no mostró recurrencia alguna.

50 La Figura 4 muestra el caso de un paciente con una forma crónica de CRCS (o epitelopatía difusa). Tiene un extenso historial de CRCS recurrente en ambos ojos. En su ojo izquierdo (OS), presenta un edema macular con fluido subretiniano y quistes retinianos. La visión del ojo izquierdo se reduce a 1/10 y el edema es crónico desde hace más de 2 años.

55 Su ojo derecho (OD) es el único ojo funcional y presenta también desde hace unas pocas semanas una acumulación de fluido subretiniano.

60 Se ha tratado con 25 mg/día de eplerenona durante 8 días y después 50 mg/día durante 3 meses. A partir de 15 días después del tratamiento, se produce una resolución completa del fluido subretiniano en ambos ojos y de manera sorprendente también la resolución total de los quistes maculares que eran crónicos desde hace meses. Además, la visión en el ojo izquierdo se recuperó hasta 6/10. No se observó recurrencia alguna en ninguno de los ojos incluso a los 6 meses.

65

### Conclusiones

En conjunto, nuestros resultados experimentales, junto con los efectos clínicos de los antagonistas de RM, demuestran que la activación de RM induce la acumulación de fluido subretiniano y que los antagonistas de RM son eficaces en el tratamiento de pacientes que presentan acumulación de líquido subretiniano y/o intrarretiniano debido a CRCS o epitelio patía difusa.

5

#### **EJEMPLO 4: RESULTADOS ADICIONALES EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA**

Se han utilizado ratas Goto-Kakizaki (GK) como modelo para la retinopatía diabética.

10 Los animales utilizados en este trabajo se trataron según la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). Los procedimientos experimentales se presentaron y aprobaron por el comité de ética de la Universidad Descartes de París.

15 Las ratas GK (Taconic Europa, Dinamarca), un modelo Wistar no obeso de diabetes no insulino dependiente tipo 2, se utilizaron con diferentes edades de hiperglucemia. La glucemia se midió utilizando equipos compactos Accutrend GC y Accu-check (Roche) y la glucosa en plasma > 250 mg/dl se consideró como estado diabético. Las ratas diabéticas GK presentaban hiperglucemia a partir de 14 semanas después del nacimiento hasta el momento del sacrificio, en comparación con los controles. Los controles se seleccionaron a partir de ratas no diabéticas de la misma edad y con glucosa en plasma <150 mg/dl.

20

La Figura 5 muestra la patología en la retina que se produce en ratas GK a los 8 y 12 meses.

La Figura 6 muestra el efecto de la inyección intravítrea de espironolactona (1  $\mu$ M en el vítreo) en ratas GK.

25 24 horas después de la inyección (panel derecho), el grosor de la retina externa se reduce (flecha roja doble) y la acumulación de líquido en la capa nuclear externa (capa de fotorreceptores) (flecha amarilla) disminuyó.

En ratas GK de 18 meses de vida, se preformaron electroretinogramas (ERG). En los animales, la onda a y b se reducen significativamente en comparación con ERG realizados a los 3 meses, en el inicio de la diabetes.

30

Las ratas diabéticas de 18 meses de vida se trataron con inyecciones intravítreas (1  $\mu$ M) en el día 1, 3, 5 y los animales se volvieron a ensayar para ERGs 24 horas después de cada inyección.

35 24 horas después de la tercera inyección, los animales se sacrificaron y la retina se analizó utilizando secciones semifinas.

La Figura 7 muestra los ERG realizados antes del tratamiento y 24 horas después de la última inyección de espironolactona.

40 Como se muestra en este ejemplo, la onda b se aumenta significativamente después del tratamiento en comparación con antes del tratamiento (panel izquierdo) y después del tratamiento (panel derecho).

Tras el sacrificio, se seccionaron los ojos.

45 La Figura 8 muestra que las ratas GK que se han tratado con el vehículo presentan edema en la retina externa (flechas negras, panel izquierdo) y edema en la capa nuclear externa (flecha amarilla). Los coriocapilares se dilatan (flecha roja doble).

50 En el ojo tratado, el edema disminuyó tanto en los segmentos internos/externos (SI/SE) como en la capa nuclear externa (CNE). La vasodilatación se redujo en los coriocapilares.

#### **Conclusiones**

55 La espironolactona intraocular reduce eficientemente el edema retiniano de ratas diabéticas GK y mejora la formación de los segmentos externos. Estos cambios se relacionan con la mejora de la función de la retina como queda demostrado por los ERG.

Esto señala el efecto beneficioso de espironolactona intraocular en la acumulación de líquido de la retina diabética.

#### **Referencias**

60

Durante la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un antagonista del receptor de mineralocorticoides (RM) o un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides, para su uso en el tratamiento de la acumulación de líquido en y/o bajo la retina asociada con coriorretinitis serosa central.
2. El antagonista del receptor de mineralocorticoides (RM) o un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para su uso según la reivindicación 1 en combinación con un glucocorticoide.
- 10 3. El antagonista del receptor de mineralocorticoides (RM) o un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para su uso según la reivindicación 1 para la administración oftálmica.
- 15 4. El antagonista del receptor de mineralocorticoides (RM) o un inhibidor de la expresión génica del receptor de mineralocorticoides para su uso según la reivindicación 1, que se administra por medio de un implante biodegradable.

Figura 1

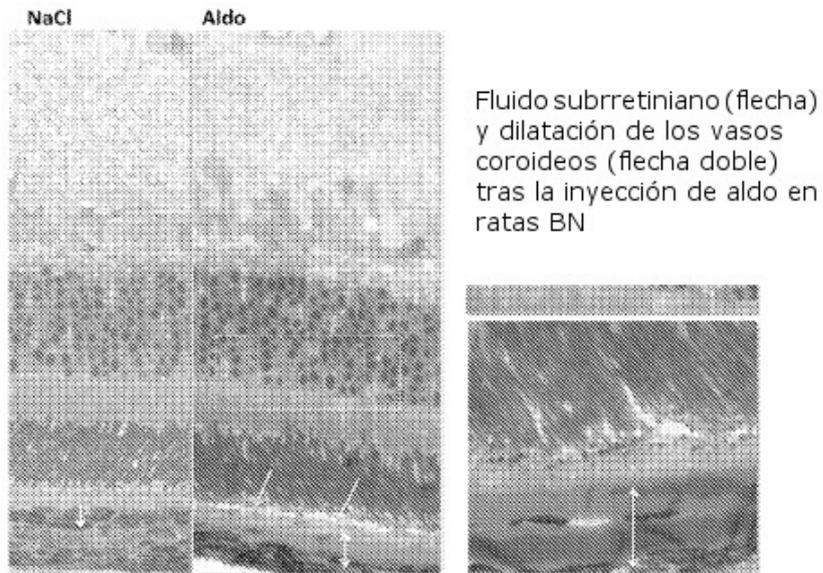
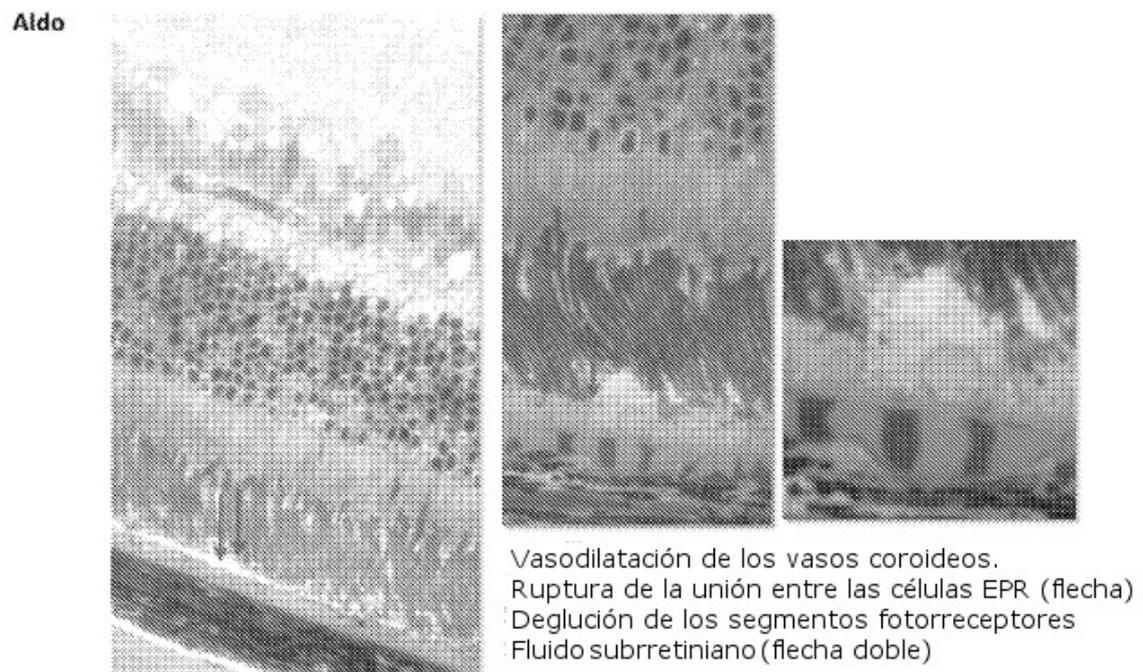


Figura 2



**Figura 3**

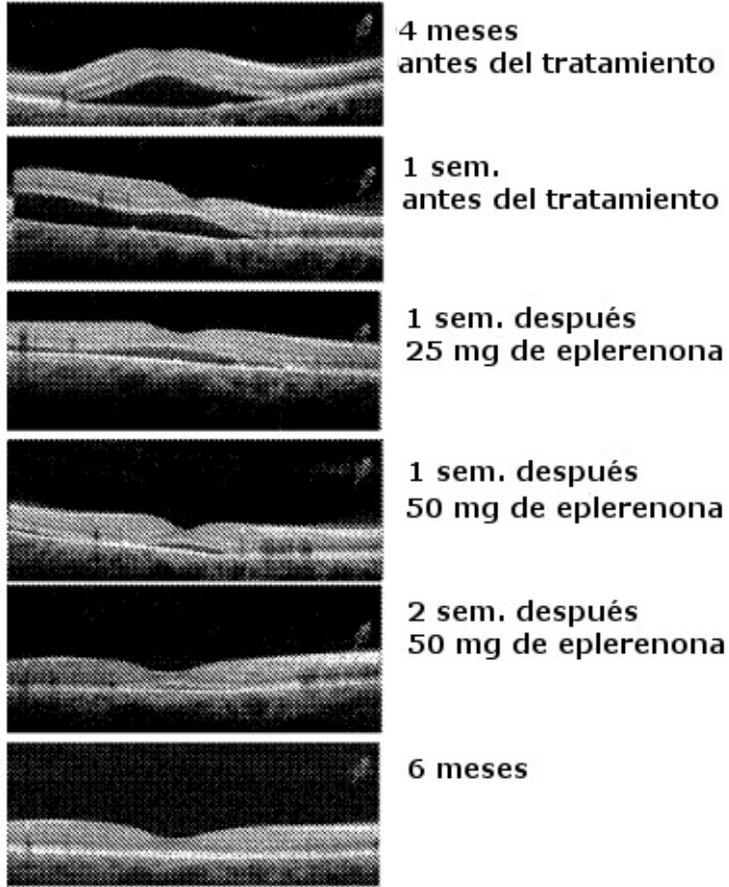


Figura 4

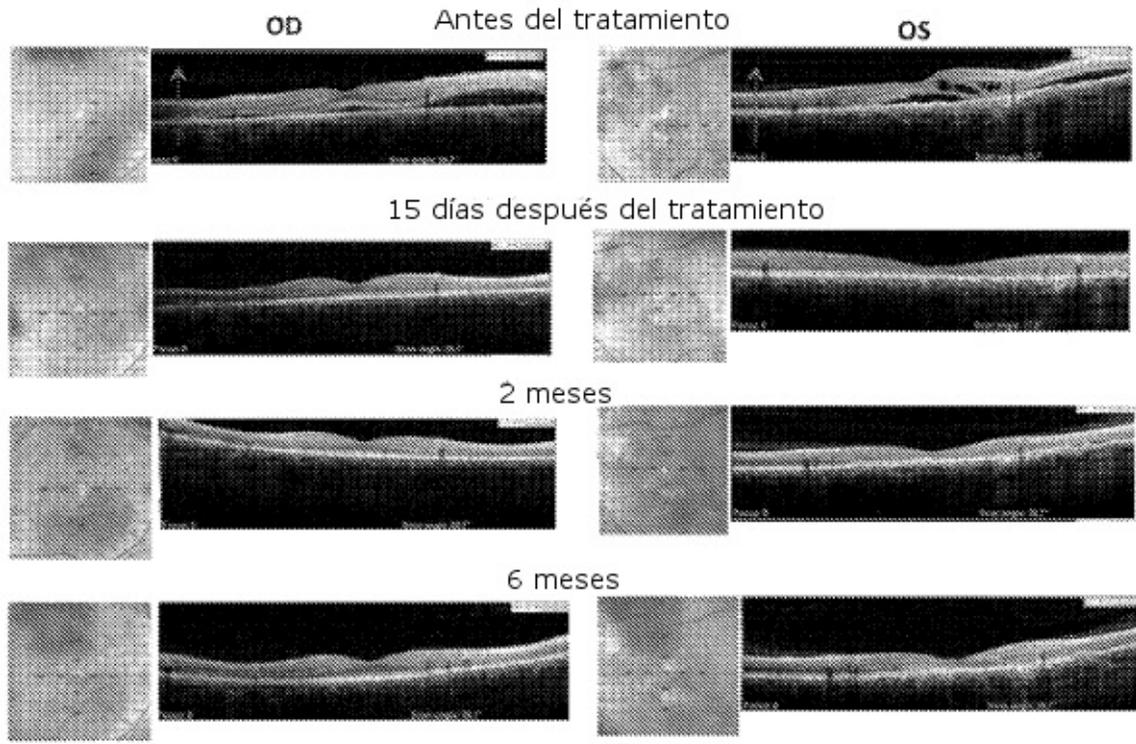


Figura 5

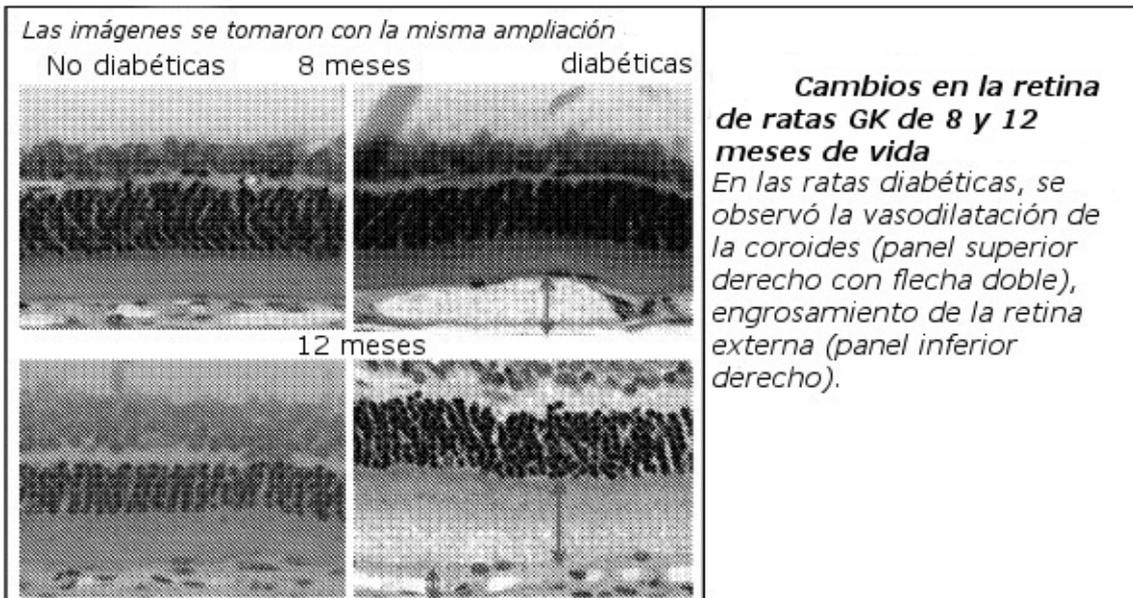


Figura 6

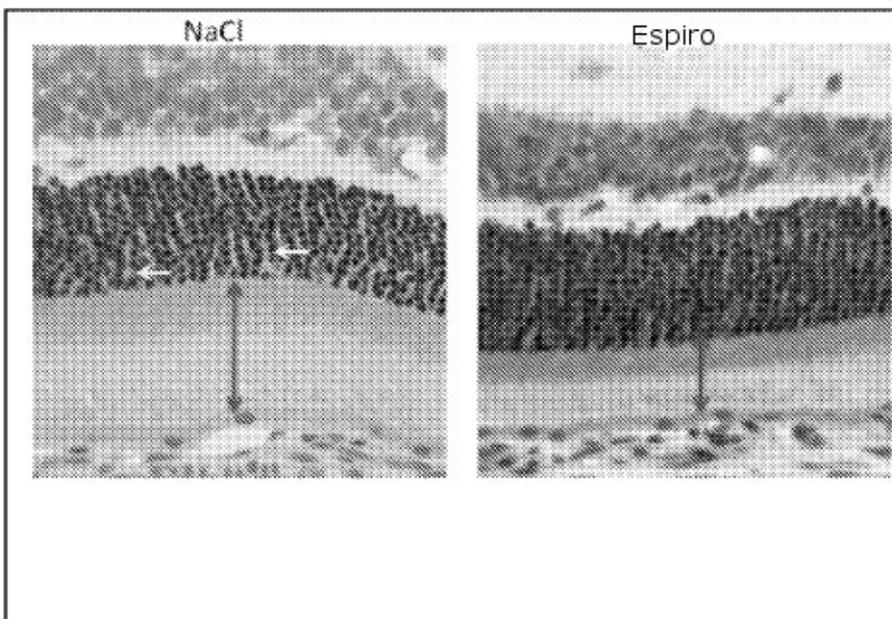


Figura 7

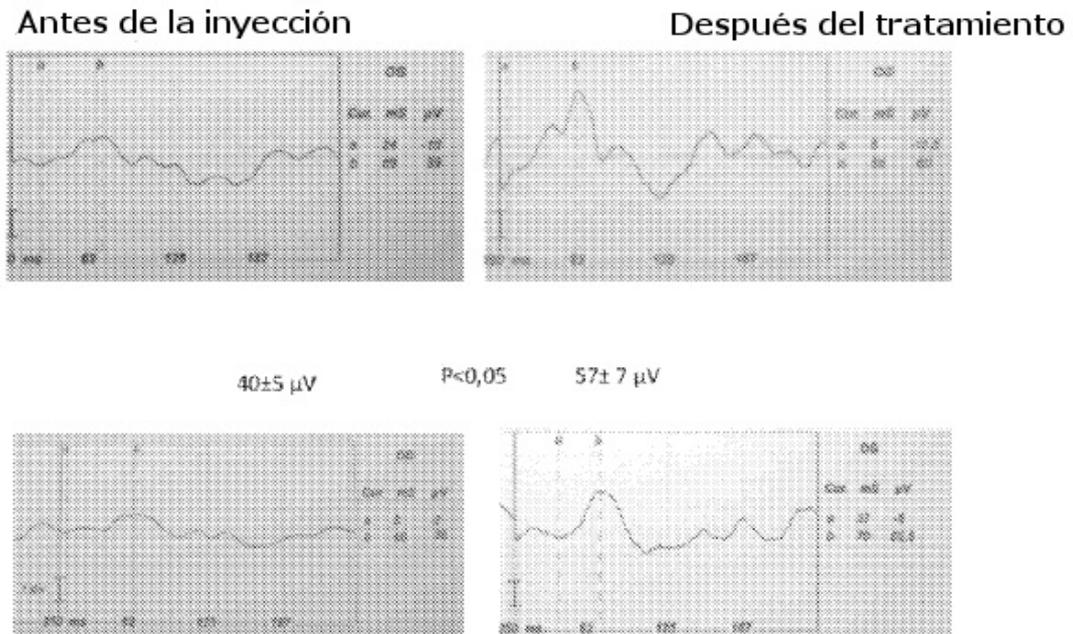


Figura 8

