

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 092**

21 Número de solicitud: 201530727

51 Int. Cl.:

**A61K 31/616** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**26.05.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.12.2016**

Fecha de concesión:

**27.09.2017**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**04.10.2017**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2016/070396**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PARA EL FOMENTO DE LA  
INVESTIGACIÓN SANITARIA Y BIOMÉDICA DE  
LA COMUNITAT VALENCIA (FISABIO) (75.0%)  
C/ Micer Mascó, 31  
46010 Valencia (Valencia) ES y  
UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA  
(25.0%)**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ TOLDOS, José Juan ;  
FERNANDEZ MARTÍNEZ, Cristian y  
RUIZ MORENO, José María**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **ACETILSALICILATO DE LISINA INTRAVÍTREO COMO TRATAMIENTO DE LA RETINOPATÍA  
DIABÉTICA**

57 Resumen:

Acetilsalicilato de lisina intravítreo como tratamiento de la retinopatía diabética.

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende acetilsalicilato de lisina para la fabricación de un medicamento en forma adecuada para su administración intravítrea para el tratamiento de la retinopatía diabética.

ES 2 595 092 B1

**Acetilsalicilato de lisina intravítreo como tratamiento de la retinopatía diabética.**

**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende acetilsalicilato de lisina para la fabricación de un medicamento en forma adecuada para su administración intravítrea para el tratamiento de la retinopatía diabética.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

10 La retinopatía diabética es la principal causa de ceguera legal en personas de edad inferior a 50 años en los países desarrollados y una de las principales causas de ceguera a nivel mundial. La diabetes mellitus afecta entre el 6 y el 18% de la población en España, una tercera parte tienen retinopatía diabética y una tercera parte a su vez tienen edema macular diabético, principal causa de pérdida de visión en los  
15 pacientes diabéticos. La OMS estima que existen 346 millones de diabéticos en todo el mundo.

Al inicio de la diabetes tipo 1 sólo entre el 0 y el 3% presenta algún grado de retinopatía diabética, pero el 67,1% de estos pacientes la padece antes de los 5 años  
20 de evolución de su diabetes. En el caso de la diabetes tipo 2 entre el 6 y el 30% de los pacientes ya presenta retinopatía en el momento del diagnóstico y en los casos de más de 20 años de evolución la prevalencia de la retinopatía diabética es del 82%.

Hasta el momento hay tres fármacos comercializados que se utilizan para el  
25 tratamiento del edema macular diabético (EMD) que presentan algunos pacientes con retinopatía diabética. Uno de ellos es ranibizumab (Lucentis®), un fragmento de inmunoglobulina humanizada cuya acción fundamental es el bloqueo de todos los subtipos del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). La lesión de los pequeños vasos sanguíneos (microangiopatía) que sucede en el transcurso de la  
30 retinopatía diabética deja sin flujo sanguíneo a los tejidos dañados produciendo isquemia. Estos tejidos isquémicos expresan moléculas angiogénicas con el objetivo de formar nuevos vasos que aporten nutrientes y solucionen la isquemia. Estos nuevos vasos son de carácter inmaduro y lejos de aportar adecuados flujos sanguíneos que permitan la supervivencia del tejido presentan una alta permeabilidad  
35 vascular contribuyendo al edema que se forma en la mácula. Ranibizumab bloquea la angiogénesis inducida por el VEGF-A produciendo una regresión de los neovasos e

induciendo con ello mejoras del edema retiniano. No obstante no modifica el curso evolutivo de la patología en tanto en cuanto no resuelve la isquemia ni modifica otras circunstancias y acontecimientos moleculares que hoy conocemos que ocurren en la retinopatía diabética. Otro de los fármacos es el aflibercept (Eylea®) que actúa de manera similar a ranibizumab pero inhibiendo a su vez otra molécula además del VEGF-A, como es el PlGF (factor de crecimiento placentario); este fármaco presenta efectos comparables a ranibizumab y también las mismas limitaciones. Otra opción terapéutica indicada es un esteroide, dexametasona, que se administra en inyección intravítrea en un dispositivo de liberación sostenida (Ozurdex®) aprobado para su uso como fármaco de primera línea o en caso de fracaso de los anti-VEGF anteriores. Está en vías de comercialización otro sistema de liberación sostenida de otro esteroide, en este caso fluocinolona (Iluvien®). Ambos esteroides tienen como inconveniente la alta tasa de efectos secundarios que inducen, tales como aumento de la presión intraocular y cataratas. Fuera de indicación se ha utilizado también bevacizumab (Avastin®) que es un inhibidor de todas las isoformas del VEGF; que aunque existen evidencias de no inferioridad respecto a ranibizumab carece de aprobación oficial para su uso intraocular.

Existen evidencias científicas que avalan la relevancia de fenómenos celulares inflamatorios en la patogenia de la retinopatía diabética, por ello productos con acción anti-inflamatoria como los esteroides o la invención que nos ocupa adquieren especial utilidad y relevancia especialmente por su eficacia en fases más avanzadas de la enfermedad donde los fenómenos inflamatorios son muy importantes.

Son cada vez más los estudios histoquímicos que demuestran que existe un problema inflamatorio de base que actúa como principal factor desencadenante de la retinopatía diabética atrayendo a las células especializadas en la respuesta inflamatoria, los leucocitos, y conduciendo con el tiempo a un fracaso y pérdida del endotelio vascular, un aumento de la permeabilidad vascular (causante de edema) y aumento de la agregación plaquetaria (contribuyendo a la obliteración de los vasos y a la isquemia retiniana).

Por otro lado, a diferencia del ranibizumab, el acetilsalicilato es capaz de actuar sobre diversas dianas terapéuticas implicadas en la inflamación; dianas que están presentes incluso en fases muy precoces de esta patología. Por tanto, el acetilsalicilato se

presenta como un fármaco potencialmente útil en estadios iniciales y avanzados de la retinopatía diabética.

5 Se ha descrito el uso del ácido acetil salicílico vía oral en el contexto de la retinopatía diabética tanto con perfil preventivo como terapéutico (ver L Zheng, SJ Howell, DA Hatala, K Huang, T S Kern. Salicylate-based anti-inflammatory drugs inhibit the early  
lesión of diabetic retinopathy. *Diabetes* 2007; 56:337-335. W Sun, C Gerhardinger, Z  
10 Dagher, T Hoehn, M Lorenzi. Aspirin at low-intermediate concentrations protects retinal vessels in experimental diabetic retinopathy through non-platelet-mediated effects. *Diabetes* 2005; 54:3418-3426. TS Kern, RL Engerman. Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy, aminoguanidine and aspirin. *Diabetes* 2001; 50:1636-1642.). De forma que se ha demostrado que existe un efecto beneficioso del salicilato sobre el curso evolutivo de la enfermedad y ningún efecto contraproducente sobre ella. No obstante se basa en el uso por vía oral del salicilato tanto en humanos como  
15 en animales lo que supone en muchos casos dosis altas y no tolerables con efectos adversos frecuentes y potencialmente graves.

Se ha descrito una composición de ácido acetil salicílico (AS) y aceite de silicona (SiO) de uso intravítreo (ver, por ejemplo, Kralinger M. T et al *Graefe's Arch Clin Exp*  
20 *Ophthalmol* 2001;239:208-216). En casos de retinopatía diabética muy avanzada que genera complicaciones muy graves en la retina como desprendimientos traccionales, roturas y proliferación fibrovascular se hace preciso la intervención quirúrgica. Esta intervención supone la eliminación del humor vítreo del paciente (vitrectomía), la eliminación de los tejidos fibrovasculares anómalos existentes en la retina de estos  
25 pacientes y la colocación de un sustituto del humor vítreo. El aceite de silicona se utiliza para sustituir el vítreo en estos casos. El SiO se caracteriza por ser un elemento denso, inerte y estable que ayuda a mantener la retina correctamente aplicada. Es un medio inmiscible para todo tipo de sustancias bien sean fármacos o moléculas inflamatorias y angiogénicas impidiendo que estas puedan difundir a través de la  
30 cavidad vítrea. No tiene ninguna acción química sobre la retina, no es capaz de actuar como reservorio de fármacos y no es útil como solvente (Abrams GW, Azen SP, McCuen BW, Flynn H, Lai MY, Ryan SJ, Silicone Study Group: Vitrectomy with silicone oil or long-acting gas in eyes with severe proliferative vitreoretinopathy: Results of additional long-term follow-up (Silicone Study Report #11). *Archives of*  
35 *Ophthalmology* 115: 335-344, 1997.).

Así pues sería deseable disponer de una composición para la administración intravítrea de acetil salicilato destinada al tratamiento de la retinopatía diabética que pueda ser inyectada en presencia de humor vítreo, es decir, que pueda administrarse en fases menos avanzadas de la enfermedad con el fin de evitar la progresión de la enfermedad e impedir que los pacientes precisen la cirugía.

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende acetilsalicilato de lisina para la fabricación de un medicamento en forma adecuada para su administración intravítrea.

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha mencionado anteriormente, para la fabricación de un medicamento en forma adecuada para su administración intravítrea para el tratamiento de una enfermedad de la retina.

En otra realización la invención se refiere a la composición tal y como se ha definido anteriormente, para la fabricación de un medicamento en forma adecuada para su administración intravítrea para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de edema macular uveítico, vitritis, retinitis no infecciosa, retinocoroiditis no infecciosa, vitreorretinopatía proliferativa, síndrome de Irving-Gass crónico, coriorretinopatía serosa central crónica y retinopatía diabética; y preferiblemente para el tratamiento de la retinopatía diabética.

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente, donde la concentración de acetilsalicilato de lisina es de entre 12 mg/ml de composición y 24 mg/ml de composición en el humor vítreo.

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente, donde la concentración de acetilsalicilato de lisina es de 12 mg/ml de composición, de 18 mg/ml de composición o de 24 mg/ml de composición.

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente, donde el pH de la composición es de entre 6 y 6,2; y preferiblemente donde el pH de la composición es de 6.

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente, donde:

5 la concentración de acetilsalicilato de lisina es de entre 12 mg/ml de composición y 24 mg/ml de composición, y preferiblemente donde la concentración de acetilsalicilato de lisina es de 12 mg/ml de composición, de 18 mg/ml de composición o de 24 mg/ml de composición; y

el pH de la composición es de entre 6 y 6,2, y preferiblemente donde el pH de la composición es de 6.

10

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente, que además comprende suero salino fisiológico, y preferiblemente que además comprende entre 2,6 ml y 5,6 ml de suero salino fisiológico.

15

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente, que además comprende agua, y preferiblemente que además comprende 5 ml de agua.

20

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente donde:

la concentración de acetilsalicilato de lisina es de entre 12 mg/ml de composición y 24 mg/ml de composición, y preferiblemente donde la concentración de acetilsalicilato de lisina es de 12 mg/ml de composición, de 18 mg/ml de composición o de 24 mg/ml de composición; y

25

que además comprende suero salino fisiológico, y preferiblemente que además comprende 2,6 ml, 4,5 ml ó 5,6 ml de suero salino fisiológico.

30

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente donde:

la concentración de acetilsalicilato de lisina es de entre 12 mg/ml de composición y 24 mg/ml de composición, y preferiblemente donde la concentración de acetilsalicilato de lisina es de 12 mg/ml de composición, de 18 mg/ml de composición o de 24 mg/ml de composición;

35

el pH de la composición es de entre 6 y 6,2, y preferiblemente donde el pH es de 6; y

que además comprende suero salino fisiológico, y preferiblemente que además comprende 2,6 ml, 4,5 ml ó 5,6 ml de suero salino fisiológico.

5 En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente donde:

la concentración de acetilsalicilato de lisina es de entre 12 mg/ml de composición y 24 mg/ml de composición, y preferiblemente donde la concentración de acetilsalicilato de lisina es de 12 mg/ml de composición, de 18 mg/ml de composición o de 24 mg/ml de composición; y

10 que además comprende agua, y preferiblemente que además comprende 5 ml de agua.

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente donde:

15 la concentración de acetilsalicilato de lisina es de entre 12 mg/ml de composición y 24 mg/ml de composición, y preferiblemente donde la concentración de acetilsalicilato de lisina es de 12 mg/ml de composición, de 18 mg/ml de composición o de 24 mg/ml de composición;

20 el pH de la composición es de entre 6 y 6,2, y preferiblemente donde el pH de la composición es de 6; y

que además comprende agua, y preferiblemente que además comprende 5 ml de agua.

25 En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente donde:

la concentración de acetilsalicilato de lisina es de entre 12 mg/ml de composición y 24 mg/ml de composición, y preferiblemente donde la concentración de acetilsalicilato de lisina es de 12 mg/ml de composición, de 18 mg/ml de composición o de 24 mg/ml de composición;

30 que además comprende suero salino fisiológico, y preferiblemente que además comprende 2,6 ml, 4,5 ml ó 5,6 ml de suero salino fisiológico; y

que además comprende agua, y preferiblemente que además comprende 5 ml de agua.

35 En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente donde:

la concentración de acetilsalicilato de lisina es de entre 12 mg/ml de composición y 24 mg/ml de composición, y preferiblemente donde la concentración de acetilsalicilato de lisina es de 12 mg/ml de composición, de 18 mg/ml de composición o de 24 mg/ml de composición;

5 el pH de la composición es de entre 6 y 6,2, y preferiblemente donde el pH de la composición es de 6;

que además comprende suero salino fisiológico, y preferiblemente que además comprende 2,6 ml, 4,5 ml ó 5,6 ml de suero salino fisiológico; y

10 que además comprende agua, y preferiblemente que además comprende 5 ml de agua.

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente donde:

15 la concentración de acetilsalicilato de lisina es de entre 12 mg/ml de composición y 24 mg/ml de composición, y preferiblemente donde la concentración de acetilsalicilato de lisina es de 12 mg/ml de composición, de 18 mg/ml de composición o de 24 mg/ml de composición;

el pH de la composición es de entre 6 y 6,2, y preferiblemente donde el pH de la composición es de 6;

20 que además comprende suero salino fisiológico, y preferiblemente que además comprende 2,6 ml, 4,5 ml ó 5,6 ml de suero salino fisiológico; y

que además comprende agua, y preferiblemente que además comprende 5 ml de agua,

25 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de la retina, preferiblemente para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de edema macular uveítico, vitritis, retinitis no infecciosa, retinocoroiditis no infecciosa, vitreorretinopatía proliferativa, síndrome de Irving-Gass crónico, coriorretinopatía serosa central crónica y retinopatía diabética; y más preferiblemente para el tratamiento de la retinopatía diabética.

30

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente, donde la cantidad total de ácido acetilsalicílico inyectado en el humor vítreo es de entre 0,6 mg y 1,2 mg.



En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente, donde la cantidad total de ácido acetilsalicílico inyectado en el humor vítreo es de 0,6 mg, 0,9 mg ó 1,2 mg.

5 En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente, donde:

la cantidad total de ácido acetilsalicílico inyectado en el humor vítreo es de entre 0,6 mg y 1,2 mg; y

el volumen final de la composición es de al menos 0,05 ml.

10

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha definido anteriormente, donde la cantidad total de ácido acetilsalicílico inyectado en el humor vítreo es de 0,6 mg, 0,9 mg ó 1,2 mg; y

el volumen final de la composición es de al menos 0,05 ml.

15

El uso de lisina como ingrediente de la composición favorece la solubilidad y mejora la estabilidad del principio activo formando la sal de acetilsalicilato de lisina.

20

La composición se puede utilizar en pacientes en los que no ha sido necesario extraer el humor vítreo. El humor vítreo actúa como reservorio de fármacos de forma que favorece la persistencia y la difusión del acetilsalicilato de lisina de la invención en el interior del ojo.

25

Como se ha mencionado anteriormente, la composición de la invención se administra de forma parenteral intravítrea. Así, las preparaciones inyectables, de acuerdo con la presente invención, para la administración parenteral, comprenden soluciones, suspensiones o emulsiones estériles, en un solvente acuoso o no acuoso como propilenglicol, polietilenglicol o aceites vegetales. Estas composiciones pueden también contener coadyuvantes, como humectantes, emulsionantes, dispersantes y

30 conservantes. Podrían ser esterilizadas por cualquiera de los métodos conocidos o preparadas como composiciones sólidas estériles que serán disueltas en agua o cualquier otro medio inyectable estéril inmediatamente antes del uso. También es posible partir de materias primas estériles y mantenerlas en estas condiciones durante todo el proceso de fabricación.

35

La composición mencionada se puede preparar siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

Forma farmacéutica: solución estéril.

5 Fórmula:

Acetilsalicilato de lisina	900 mg
Agua para inyección	5 ml
Suero salino fisiológico	6 ml

Material: Jeringas 1,5 ml, agujas, filtro 0,22 micras, frasco estéril.

10 Elaboración: En campana de flujo laminar,

1. Cargar 5 ml de agua estéril para inyección e inyectar en el vial que contiene 900 mg de acetilsalicilato de lisina. Agitar levemente hasta disolución completa. Obteniéndose una concentración de ácido acetilsalicílico de 100 mg/ml de composición = Acetilsalicilato de lisina 180 mg/ml de composición.

15

2. Para una solución de 12 mg/ml: cargar 0,4 ml (72 mg de Acetilsalicilato de lisina) de la disolución obtenida e introducir en un vial estéril, añadir 5,6 ml de suero salino fisiológico, con un pH resultante de 6.

20

3. Para una solución de 24 mg/ml: cargar 0,4 ml (72 mg de Acetilsalicilato de lisina) de la disolución obtenida e introducir en un vial estéril, añadir 2,6 ml de suero salino fisiológico, con un pH resultante de 6.

25

4. Para una solución más preferible de 18 mg/ml: cargar 0,5 ml (90 mg de Acetilsalicilato de lisina) de la disolución obtenida e introducir en un vial estéril, añadir 4,5 ml de suero salino fisiológico, con un pH resultante de 6.

30

5. El preparado final se filtrará (filtro 0,22 micras) antes de envasarlo en la jeringa de 1 ml, que se cargará con un volumen de 0,05 ml y se taponará con un tapón estéril.

6. Envasar y etiquetar. La etiqueta indicará la vía de administración, el principio activo, la concentración final, la fecha de preparación, el tipo de conservación y la caducidad

35

Envasado: Jeringa de volumen adecuado.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

10 **FIG. 1** representa el corte histológico teñido con H&E de retina central (obsérvese el nervio óptico en la parte central de la imagen).

**FIG. 2** representa el corte histológico teñido con H&E de retina periférica.

15 **FIG. 3** representa el corte histológico teñido con H&E donde se señalan la capa de células ganglionares (flecha de abajo) y capa plexiforme externa (flecha de arriba).

**FIG. 4** representa la correlación y el resultado del test de Spearman de la retina central plexiforme externa:  $n=50$ ;  $r=0,341$ ;  $p=0,015$ . Lo que significa que la correlación entre ambos es baja (el coeficiente de determinación que sería  $r^2$  es 0,116; es decir, el 11,6% de la variabilidad de los datos se explica por la relación entre ambas variables).

20 **FIG. 5** representa la correlación y el resultado del test de Spearman de la retina central ganglionar:  $n=50$ ;  $r=0,803$ ;  $p<0,001$ . Lo que significa que la correlación entre ambos es alta (el coeficiente de determinación que sería  $r^2$  es 0,645; es decir, el 64,5% de la variabilidad de los datos se explica por la relación entre ambas variables).

30 **FIG. 6** representa la correlación y el resultado del test de Spearman de la retina periférica plexiforme externa:  $n=50$ ;  $r=0,005$ ;  $p=0,973$ . Lo que significa que la correlación entre ambos es baja, casi nula (el coeficiente de determinación que sería  $r^2$  es 0,000025; es decir, el 0,0025% de la variabilidad de los datos se explica por la relación entre ambas variables).

35 **FIG. 7** representa la correlación y el resultado del test de Spearman de la retina periférica ganglionar:  $n=50$ ;  $r=0,737$ ;  $p<0,001$ . Lo que significa que la correlación entre

ambos no es muy alta (el coeficiente de determinación que sería  $r^2$  es 0,543; es decir, el 54,3% de la variabilidad de los datos se explica por la relación entre ambas variables).

5 **FIG. 8** representa la relación entre ICAM1 y vasos de la retina central ganglionar:  $n=50$ ;  $r=0,616$ ;  $p<0,001$ . Lo que significa que la correlación entre ambos no es muy alta (el coeficiente de determinación que sería  $r^2$  es 0,379; es decir, el 37,9% de la variabilidad de los datos se explica por la relación entre ambas variables).

10 **FIG. 9** representa la relación entre ICAM1 y vasos de la retina periférica ganglionar:  $n=50$ ;  $r=0,341$ ;  $p=0,015$ . Lo que significa que la correlación entre ambos es baja (el coeficiente de determinación que sería  $r^2$  es 0,116; es decir, el 11,6% de la variabilidad de los datos se explica por la relación entre ambas variables).

## 15 **EJEMPLOS**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

### EJEMPLO 1

#### 20 *Objetivos*

Valorar los efectos de la inyección intravítrea de una solución de acetilsalicilato de lisina en un modelo experimental de retinopatía diabética sobre 3 variables histológicas en la retina de los animales tratados comparándolos con un grupo control.

25 Las variables elegidas que han demostrado en diversos estudios estar afectadas de forma primordial en la retina diabética son:

1. Marcador leucocitario CD18: el leucocito es la célula efectora principal de la respuesta inflamatoria de los tejidos, cosa que también sucede en la retina. El CD18 es una molécula de superficie que se expresa en las membranas de los leucocitos activados en tejidos donde existe inflamación como es el caso de la retina diabética. Determinar su número absoluto y relativo ayuda a conocer si la solución inyectada es capaz de reducir la presencia de leucocitos activados en determinadas capas de la retina como parte de su acción antiinflamatoria.

35

2. Marcador endotelial ICAM-1: las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos en su interior han demostrado estar afectadas en la retinopatía diabética y por esta razón tienen una gran relevancia en la patogenia de la enfermedad. La ICAM-1 es una proteína transmembrana presente en las células endoteliales y prácticamente específica de ellas. Su marcaje inmunohistoquímico permite señalar y valorar cuantitativamente a las células endoteliales presentes en las distintas capas de tejido estudiadas y nos da información acerca de la vascularización de los tejidos estudiados y de la integridad de la pared vascular.

3. Densidad vascular: la inflamación crónica causada en la retinopatía diabética conlleva a una obliteración y muerte de los vasos sanguíneos. Esto deja áreas más o menos extensas de tejido sin recibir ningún tipo de aporte sanguíneo. Este escenario es un estadio final del fenómeno conocido como microangiopatía diabética. Por ello determinar el número de vasos presentes en cada sección de tejido nos puede dar información acerca de si el fármaco es capaz o no de influir positiva o negativamente en la densidad capilar de la retina (vasos/porción de tejido).

### *Metodología*

#### 1. Modelo experimental

Con la aprobación del comité de bioética para la investigación de la Universidad Miguel Hernández de Elche y basado en los estándares internacionales para el uso de animales de experimentación, 14 especímenes estabulados de Rata Wistar Macho de unos 200 gramos de peso fueron inducidos a padecer diabetes mediante la inyección de estreptozotocina intraperitoneal (75 mg/kg) en una única dosis. Los animales fueron monitorizados durante todo el estudio en constantes como el peso, la glucemia, pérdida de cabello y formación de catarata. Todos los animales fueron expuestos a los mismos parámetros de luz, oscuridad y disponibilidad de agua y alimento.

#### 2. Técnica de Inyección intravítrea

Para la inyección intravítrea los animales fueron anestesiados con una mezcla a proporción 1:1 de xylazina hidrocloreto (4 mg/kg) y ketamina hidrocloreto (10 mg/kg). Bajo midriasis con tropicamida al 0,5% se realizó la inyección intravítrea de la solución de acetilsalicilato de lisina bajo microscopio quirúrgico con jeringa de micro inyección

(Hamilton Co., Reno, NV) y aguja de 32 gauge a 1 milímetro del limbo temporal. Sólo la mitad de los animales diabéticos fueron tratados con la solución intravítrea, en el resto de los animales se dejó evolucionar la retinopatía diabética de forma natural. El "proceso de inyección intravítrea se repitió en la misma forma, técnica y dosis en los mismos animales 4 semanas después del tratamiento inicial. Resumen de la organización del ensayo experimental:

5

- Inicialmente se evaluaron los animales antes de incluirlos en el ensayo experimental para descartar aquellos con taras o alteraciones oculares de base.

10

- Se realizó la inducción de diabetes en todos los animales mediante la inyección de estreptozocina intraperitoneal.

15

- Se comprobaron los índices glucémicos a las 24 y 48 horas de la inyección para valorar si la inducción había tenido éxito.

- Una vez confirmada la diabetes se dividió a los animales en dos grupos formados por 8 ratas cada uno.

20

- Siguiendo el modelo de retinopatía diabética en rata se dejó evolucionar la diabetes de modo natural en ambos grupos durante las primeras 12 semanas. Es en este periodo donde se ha demostrado que comienzan a aparecer los signos de retinopatía diabética.

25

- En este momento a uno de los grupos se realiza una inyección intravítrea en los dos ojos de cada animal de acetilsalicílico en una dilución con lisina.

- A las 4 semanas (semana 16 de la inducción) se repite la inyección intravítrea de salicilato en el mismo grupo de animales.

30

- A las 4 semanas de la última inyección (20 semanas tras inducción) se sacrifican los animales de ambos grupos.

3. Cálculo de dosis y preparación de la solución

35

No existen referencias ni estudios dosimétricos realizados hasta la fecha para efectuar este cálculo. No obstante podemos realizar la siguiente aproximación:

Rango terapéutico:

Acción analgésica y antipirética 2,5-5,0 mg/dl

5 Acción antiinflamatoria 15-30 mg/dl

Rango tóxico:

40-50 mg/dl

10 Con una concentración de 25 mg/dl (0,25 µg/µl) en la biofase podríamos cubrir un rango terapéutico adecuado para valorar la existencia de efectos significativos en las variables a estudio.

15 El volumen de humor vítreo existente en el ojo de la rata adulta es de 56,5 + 2 microlitros. (Oxygen Distribution in the Mouse Retina. Dao-Yi Yu and Stephen J. Cringle. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006; vol. 47; 1109-1112)

20 Si se plantea un modelo farmacodinámico monocompartimental en el que consideramos C<sub>max</sub> como la concentración buscada en la biofase y V<sub>d</sub> (volumen de distribución) como el volumen de humor vítreo en el que el fármaco va a ser inyectado. Con ello se obtiene la dosis necesaria a administrar del fármaco:

$$C_{\max} = D/V_d, \text{ despejando } D = C_{\max} \times V_d$$

$$D = 0,25 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 57 \mu\text{l} = 14,3 \mu\text{g}$$

25 Por tanto para alcanzar una concentración terapéutica de acetilsalicilato en el vítreo de la rata tenemos que inyectar unos 15 microgramos de fármaco.

30 No obstante no podemos olvidar que el ojo no sigue un modelo monocompartimental estricto ya que tras la inyección del fármaco existe cierta difusión del mismo a cristalino y humor acuoso de manera que es probable que nos enfrentemos a un volumen de distribución superior a lo considerado inicialmente. Si consideramos que el cristalino de la rata tiene un volumen superior al del vítreo es muy probable que el volumen de distribución real sea más próximo a 100 microlitros en cuyo caso la dosis

a emplear para mantenerse en rango terapéutico estaría en 25 microgramos de salicilato que se preparó en 5  $\mu$ l de solución a una concentración de 5  $\mu$ l/ $\mu$ g (o 5 mg/ml).

- 5 Para evitar que la composición se degrade decidimos inyectar la solución inmediatamente después de su preparación. La solución utilizada en el ensayo experimental puede ser preparada de la siguiente manera:

Forma farmacéutica: solución estéril.

10 Fórmula:

Acetilsalicilato de lisina	900 mg
Agua para inyección	5 ml
Suero salino fisiológico	9,5 ml

Material: Jeringas 1,5 ml, agujas, filtro 0,22 micras, frasco estéril.

15 Elaboración: En campana de flujo laminar,

1. Cargar 5 ml de agua estéril para inyección e inyectar en el vial que contiene 900 mg de acetilsalicilato de lisina. Agitar levemente hasta disolución completa. Obteniéndose una concentración de ácido acetilsalicílico de 100 mg/ml de composición = Acetilsalicilato de lisina 180 mg/ml de composición.
- 20 2. Cargar 0,5 ml (90 mg de acetilsalicilato de lisina) de la disolución obtenida e introducir en un vial estéril, añadir 17,5 ml de suero salino fisiológico, obteniéndose una concentración de 5 mg/ml de composición (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) con un pH de 6.
3. El preparado final se filtrará (filtro 0,22 micras) antes de envasarlo en la jeringa
- 25 tipo Hamilton, que se carga con un volumen de 5  $\mu$ l y se tapa con un tapón estéril.
4. Envasar y etiquetar. La etiqueta indicará la vía de administración, el principio activo, la concentración final, la fecha de preparación, el tipo de conservación y la caducidad

Envasado: Jeringa de volumen adecuado.

30

#### 4. Estudio Inmunohistoquímico

Se realizaron secciones laminares de la retina de todos los animales, siendo sometidos a la acción de agentes conservantes tipo formaldehído al 4%. Para el

35 marcaje de las células endoteliales se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-ICAM1, asimismo utilizamos anticuerpos monoclonales anti-CD18 para el marcaje de los



leucocitos. Posteriormente a la fijación de las distintas secciones de tejido teñidas se procedió al conteo de las moléculas marcadas positivamente así como de la cantidad de vasos sanguíneos presentes bajo microscopio óptico (Leica® microsystem) en aumento de 10X.

5

A fin de valorar diferencias significativas entre las distintas regiones de la retina, en todos los tejidos se realizaron por separado los recuentos celulares y vasculares correspondientes a la retina central (comprendida entre nervio óptico y el área macular) y los correspondientes a la retina periférica (por fuera de las arcadas vasculares). Estos recuentos se realizaron de forma concreta sobre dos capas de la retina: la capa plexiforme externa y la capa de células ganglionares. Ambas capas retinianas son las que han demostrado mayor implicación en la etiología inflamatoria y afectación vascular en la retinopatía diabética (ver figura 1, figura 2 y figura 3).

10

15

#### 5. Estudio estadístico

Se utilizó la prueba de contraste U Mann-Whitney para muestras independientes. Para contrastar la correlación entre las variables se ha utilizado el test de Spearman.

20

#### Resultados

Para el análisis se incluyeron 108 muestras de tejido, 56 correspondientes a los especímenes tratados con el fármaco intravítreo y 52 correspondientes a los animales no tratados y en los que la retinopatía diabética evolucionaba de forma natural.

25

#### Retina central

En la capa plexiforme externa de la retina central existen significativamente mayor recuento de CD18, ICAM-1 y densidad vascular en los animales tratados, igualmente sucede en la capa ganglionar excepto en el caso del CD18 donde existe un mayor recuento en los animales control.

30

#### Retina periférica

35

En la capa plexiforme externa de la retina periférica ocurre también un incremento significativo en el recuento de todas las variables en el grupo tratado respecto al grupo

control. En la capa ganglionar existe un mayor recuento de ICAM-1 en el grupo tratado y también una mayor densidad de vasos. De forma similar a lo que sucede en la retina central el recuento de CD18 en la capa ganglionar no es significativo de diferencia entre un grupo y otro (ver resultados en Tabla 1).

VARIABLE	CASO	CONTROL	p valor*
<b>Retina central</b>			
<b>Plexiforme externa</b>			
CD18	16,5 (14,0-18,0)	12,0 (9,3-15,0)	<0,001
ICAM1	15,0 (14,0-17,5)	4,0 (2,0-5,0)	<0,001
VASOS	9,0 (7,0-11,0)	3,0 (2,0-4,0)	<0,001
<b>Ganglionar</b>			
CD18	5,0 (3,0-6,0)	7,0 (4,3-8,0)	<0,001
ICAM1	4,0 (3,0-5,0)	2,0 (1,3-4,0)	<0,001
VASOS	5,0 (2,8-6,0)	2,0 (1,0-3,0)	<0,001
<b>Retina periférica</b>			
<b>Plexiforme externa</b>			
CD18	8,0 (6,0-9,0)	4,0 (3,0-5,0)	<0,001
ICAM1	9,0 (7,0-11,0)	3,0 (2,0-4,8)	<0,001
VASOS	6,0 (5,0-7,0)	1,0 (1,0-2,0)	<0,001
<b>Ganglionar</b>			
CD18	3,0 (2,0-4,0)	3,0 (2,0-4,0)	0,972
ICAM1	2,0 (1,3-3,0)	1,0 (1,0-2,0)	<0,001
VASOS	3,0 (1,8-4,0)	1,0 (1,0-2,0)	<0,001

5 \* Prueba de U Mann-Whitney para muestras independientes

Tabla 1

10 Se ha estudiado la posible relación entre CD18 y vasos. En los controles no hay ninguna relación entre ambas variables, pero sí la hay en los tratados.

La figura 4, figura 5, figura 6 y figura 7 muestran la correlación y el resultado del test de Spearman.

15 Se ha estudiado también la relación entre ICAM1 y vasos. Solo hay relación en casos para las capas ganglionares (ver figura 8 y figura 9)

20 Dado que únicamente parece que puede haber una relación entre CD18 y vasos para las capas plexiforme y ganglionar tanto de retina central como de retina periférica para los animales tratados, se buscó un modelo que intentase explicar dicha relación en estos supuestos. El modelo se hizo mediante una regresión lineal:

- Retina central :  $CD18 = 0,950 + 0,800 * Vasos$  ( $p = 0,002$ )
- Retina periférica :  $CD18 = 1,066 + 0,536 * Vasos$  ( $p < 0,001$ )

5 *Discusión*

ICAM-1

10 Uno de los principales problemas de la evolución natural de la retinopatía diabética es la muerte y desaparición de las células del endotelio vascular, lo que conduce a una alteración en la integridad de los vasos y a un incremento de su permeabilidad. La molécula transmembrana ICAM-1 se expresa de forma casi exclusiva en la pared celular del endotelio vascular, siendo elemento de vinculación y comunicación entre la célula endotelial y otras células procedentes del flujo sanguíneo y que contienen  
15 ligandos específicos para esta proteína. La marcación inmunohistoquímica de las ICAM-1 que se ha realizado pone de manifiesto que existe un contaje significativamente más alto de células endoteliales en los animales tratados respecto a los que no recibieron ninguna dosis de salicilato intravítreo; esto demostraría un efecto beneficioso del tratamiento sobre la supervivencia de las células endoteliales respecto  
20 al grupo control. Este dato se mantiene significativo en todas las secciones de retina estudiadas tanto en los correspondientes al área macular como en la retina más periférica.

25 Un mayor número de células endoteliales supondría una mayor integridad de la función de barrera del endotelio y por tanto un mayor control de la permeabilidad vascular, esto evoca un efecto beneficioso directo del fármaco sobre el tratamiento del edema macular en la retinopatía diabética.

Densidad Vascular

30

La obliteración de la pared vascular es otro de los fenómenos más dañinos de todos los que acontecen en la retinopatía diabética. Conduce a una obstrucción directa de la llegada de oxígeno y nutrientes a la microcirculación retiniana y por tanto a las células de la retina. Esto conduce a una isquemia del tejido y una necrosis celular que afecta  
35 tanto a fotorreceptores como células de Müller entre otras. Además la isquemia desencadena una cascada de eventos celulares entre los que destacan la síntesis y

liberación de una mayor cantidad de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF por sus siglas en inglés) cuya función principal es la proliferación de vasos nuevos que puedan suplir a los que ya no funcionan. El problema es que por un lado estos neo-vasos que crecen en la superficie interna de la retina no sólo no cumplen con su hipotética función sino que inducen complicaciones serias para la retina tales como sangrados constantes que inundan el humor vítreo así como la llegada de células gliales a su superficie formando grandes “puentes” de proliferación fibrovascular que pueden inducir un desprendimiento de la retina debido a la tracción que ejercen sobre ella. Otro de los efectos de una mayor producción de VEGF es el incremento de la permeabilidad vascular que se ha asociado al mismo y su implicación en la formación del edema macular diabético.

El número de vasos funcionales y con contenido celular en su luz es significativamente superior en cada sección de tejido y en cada capa de retina incluida en el estudio, en el grupo de los animales tratados con salicilato. Esto demuestra una acción vasoprotectora del fármaco lo que podría tener un importante repercusión sobre la evolución natural de la retinopatía diabética, impidiendo no sólo la aparición de la isquemia retiniana tanto periférica como central o macular, sino también con implicaciones sobre el desarrollo del edema macular.

20

CD18

Diversos trabajos han evidenciado una participación importante de los leucocitos en la patogenia de la retinopatía diabética. La destrucción de las células endoteliales, la aparición de áreas de retina isquémicas, la presencia de un aumento de permeabilidad en los vasos y consecuentemente a ello la aparición de edema y exudados, promueven la síntesis y liberación de citocinas que actúan como factores quimiotácticos llamando a las células implicadas directamente en la inflamación: los leucocitos.

30

El acetilsalicilato no tiene un efecto inhibitorio directo sobre los leucocitos, es decir, ni los destruye ni modula su llegada a los tejidos. Pero sí puede interferir en otros procesos como el bloqueo de cascadas enzimáticas que promueven la síntesis y liberación de interleucinas que actúan como factores quimiotácticos, además de reducir el daño vascular y endotelial que acontece en esta patología, lo que también reduciría el ambiente pro-inflamatorio existente en el tejido.

35

El CD18 es una proteína presente en la superficie de los leucocitos y cuya función principal es servirle de anclaje al endotelio vascular antes de migrar desde aquí hacia el interior de los tejidos. En nuestro estudio utilizamos un anticuerpo selectivo frente a CD18 con el propósito de valorar si el salicilato produce algún cambio en el número global de leucocitos que infiltran la retina.

El test de correlación de Spearman encuentra una relación significativa y directamente proporcional entre la densidad vascular y el recuento de CD18. Se puede establecer una relación matemática entre esos dos factores con la siguiente fórmula:

$$\text{Retina central: } CD18 = 0,950 + 0,800 * \text{Vasos} \text{ (p= 0,002)}$$

$$\text{Retina periférica: } CD18 = 1,066 + 0,536 * \text{Vasos} \text{ (p<0,001)}$$

Si atendemos al modelo matemático de correlación, por cada vaso existente en cada sección de tejido de la capa plexiforme de la retina central deberían existir unos 2 leucocitos (1,75), sin embargo esto sólo se cumple en los animales control donde observamos un rango de contaje de vasos de entre 1-3 y un rango de contaje de leucocitos CD18 de entre 4-8. En los animales tratados el rango de vasos por sección de tejido oscila entre 3-6 con una media de 5 mientras que el recuento de CD18 oscila entre 3-6 con una media de 5. Por tanto, según la correlación matemática lo esperable es que en la retina central de los animales tratados existieran al menos 10 leucocitos de media por campo (teniendo en cuenta que la relación esperable entre ambas variables es de 2 leucocitos / 1 vaso). Es decir, en términos absolutos existen más leucocitos por campo en el grupo tratado pero en términos correlativos al número de vasos por campo existen la mitad de los leucocitos que cabría esperar si el grupo tratado hubiera evolucionado como el grupo control. Esto indica una inhibición real del número de leucocitos en el grupo tratado con salicilato.

Con todos los datos anteriores parece claro que existe un efecto principal del fármaco sobre el mantenimiento de la integridad endotelial y vascular lo que puede tener implicaciones importantes sobre la evolución natural y el pronóstico de la enfermedad tanto en lo que se refiere al edema macular como a la isquemia retiniana. Además los estudios de correlación ponen de manifiesto que existe una reducción significativa del número de leucocitos CD18 respecto a lo esperable dada la abundante y bien conservada red vascular en los animales tratados.

Según el estudio Wisconsin la prevalencia a 20 años de edema macular en diabéticos tipo 1 es del 29% y en tipo 2 del 28% siendo este porcentaje de pacientes el único susceptible de tratamiento farmacológico con ranibizumab.

5

Por tanto, mientras que ranibizumab sólo está indicado para el tratamiento del edema macular secundario a la retinopatía diabética el salicilato ha demostrado un efecto de preservación en la red vascular intrarretiniana lo que hace pensar que su aplicación no sólo permitiría controlar y mejorar el edema macular sino también evitar la isquemia de la retina más periférica teniendo un valor terapéutico para la totalidad de los pacientes con retinopatía diabética bien tengan edema macular, alteraciones vasculares o isquemia retiniana.

10

Por otro lado, se analizaron cuidadosamente los tejidos en busca de signos de toxicidad del fármaco tales como desestructuración de las capas retinianas, ausencia de células fotorreceptoras o alteraciones histológicas del nervio óptico. En ningún tejido se encontraron signos que evidenciaran alteraciones sugestivas de toxicidad.

15

#### EJEMPLO 2

Teniendo en cuenta que el volumen de humor vítreo en humanos es de 4 ml (J Sebag. Vitreous anatomy, aging, and anomalous posterior vitreous detachment. Encyclopedia of the Eye. 2010;307–315.) y siguiendo la metodología y las evidencias experimentales descritas en el ejemplo 1 se puede elaborar una solución de acetilsalicilato de lisina para alcanzar concentraciones intraoculares en rango de 15 a 30 mg/dl, buscando más preferiblemente una concentración de 25 mg/dl (0,25 mg/ml).

20

25

$$D = C_{\max} \times V_d$$

$$D = [0,15-0,30] \text{ mg/ml} \times 4 \text{ ml}$$

Para preparar la solución de acetilsalicilato de lisina destinada a su inyección en el vítreo humano se puede utilizar una dosis del principio activo de entre 0,6 mg y 1,2 mg siendo preferible una dosis de 0,9 mg. La concentración de la solución resultante debe ser preferentemente de entre 12 mg /ml y 24 mg/ml y más preferiblemente de 18 mg/ml, con un volumen mínimo de inyección de 0,05 ml (How to give intravitreal injections. ME Wilson, AW Scott. AAO EYenet. 2013) y un pH de 6.

30

35

La solución descrita puede ser preparada de la siguiente manera:

Forma farmacéutica: solución estéril.

Fórmula:

5	Acetilsalicilato de lisina	900 mg
	Agua para inyección	5 ml
	Suero salino fisiológico	6 ml

Material: Jeringas 1,5 ml, agujas, filtro 0,22 micras, frasco estéril.

Elaboración: En campana de flujo laminar,

10

1. Cargar 5 ml de agua estéril para inyección e inyectar en el vial que contiene 900 mg de acetilsalicilato de lisina. Agitar levemente hasta disolución completa. Obteniéndose una concentración de ácido acetilsalicílico de 100 mg/ml de composición = Acetilsalicilato de lisina 180 mg/ml de composición.

15

2. Para una solución de 12 mg/ml: cargar 0,4 ml (72 mg de Acetilsalicilato de lisina) de la disolución obtenida e introducir en un vial estéril, añadir 5,6 ml de suero salino fisiológico, con un pH resultante de 6.

20

3. Para una solución de 24 mg/ml: cargar 0,4 ml (72 mg de Acetilsalicilato de lisina) de la disolución obtenida e introducir en un vial estéril, añadir 2,6 ml de suero salino fisiológico, con un pH resultante de 6.

25

4. Para una solución más preferible de 18 mg/ml: cargar 0,5 ml (90 mg de Acetilsalicilato de lisina) de la disolución obtenida e introducir en un vial estéril, añadir 4,5 ml de suero salino fisiológico, con un pH resultante de 6.

30

5. El preparado final se filtrará (filtro 0,22 micras) antes de envasarlo en la jeringa de 1 ml, que se cargará con un volumen de 0,05 ml y se taponará con un tapón estéril.

6. Envasar y etiquetar. La etiqueta indicará la vía de administración, el principio activo, la concentración final, la fecha de preparación, el tipo de conservación y la caducidad

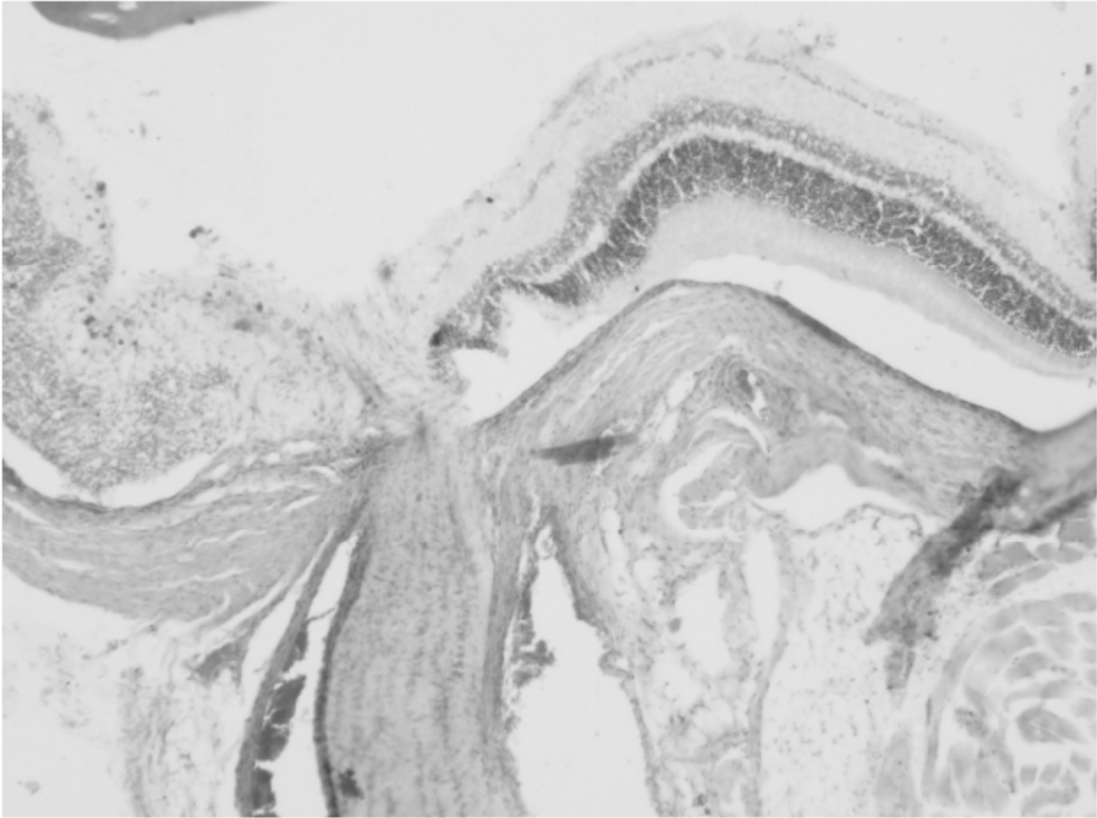
Envasado: Jeringa de volumen adecuado.

35

## REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de una composición que comprende acetilsalicilato de lisina para la fabricación de un medicamento en forma adecuada para su administración intravítrea.
- 5
- 2.- El uso de la composición según la reivindicación 1, para la fabricación de un medicamento en forma adecuada para su administración intravítrea para el tratamiento de una enfermedad de la retina.
- 10
- 3.- El uso de la composición según la reivindicación 2, para el tratamiento de la retinopatía diabética.
- 4.- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la concentración de acetilsalicilato de lisina es de entre 12 mg/ml de composición y 24 mg/ml de composición.
- 15
- 5.- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la concentración de acetilsalicilato de lisina es de 12 mg/ml de composición, de 18 mg/ml de composición o de 24 mg/ml de composición.
- 20
- 6.- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el pH de la composición es de entre 6 y 6,2.
- 7.- El uso de la composición según la reivindicación 6, donde el pH de la composición es de 6.
- 25
- 8.- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que además comprende suero salino fisiológico.





**FIG. 1**

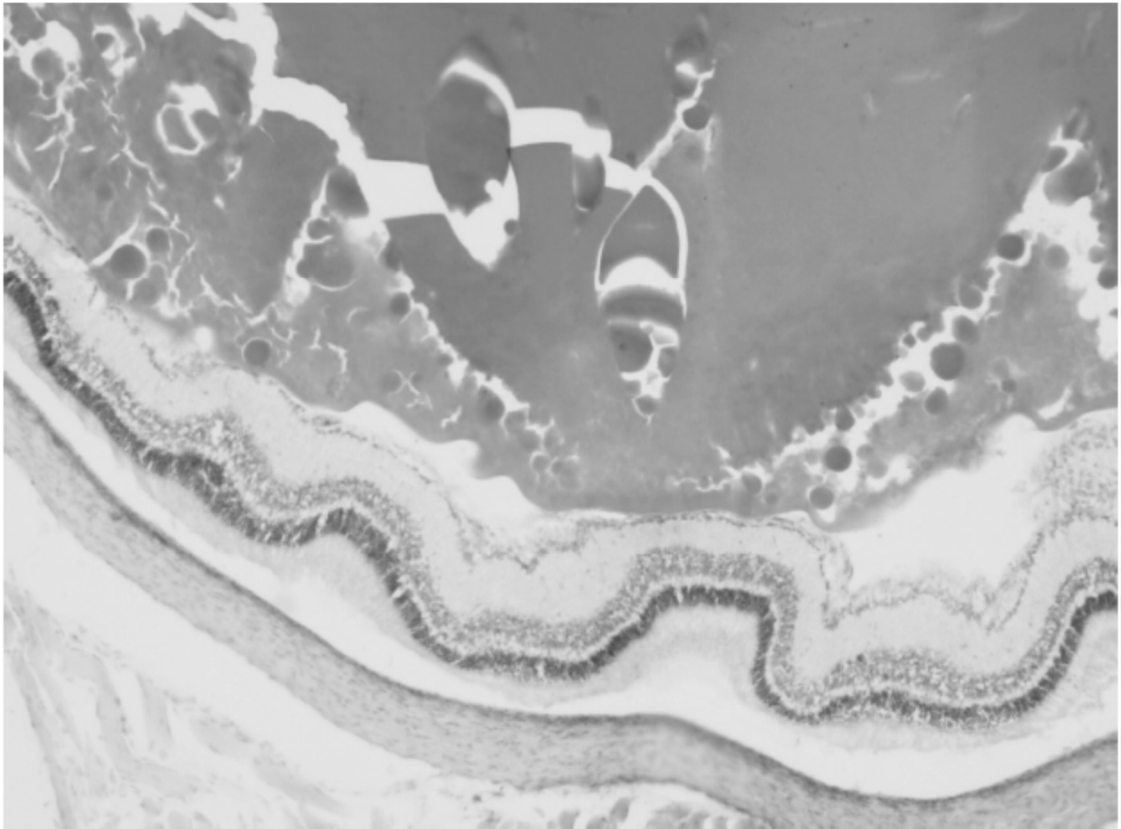
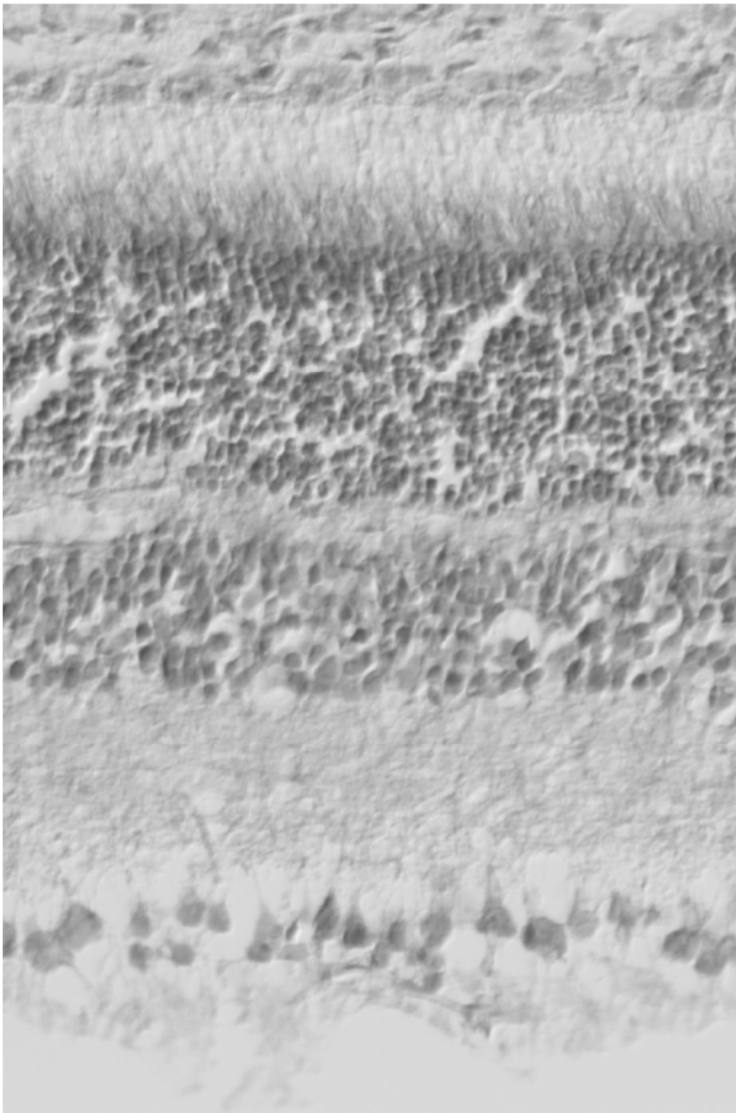


FIG. 2



**FIG. 3**

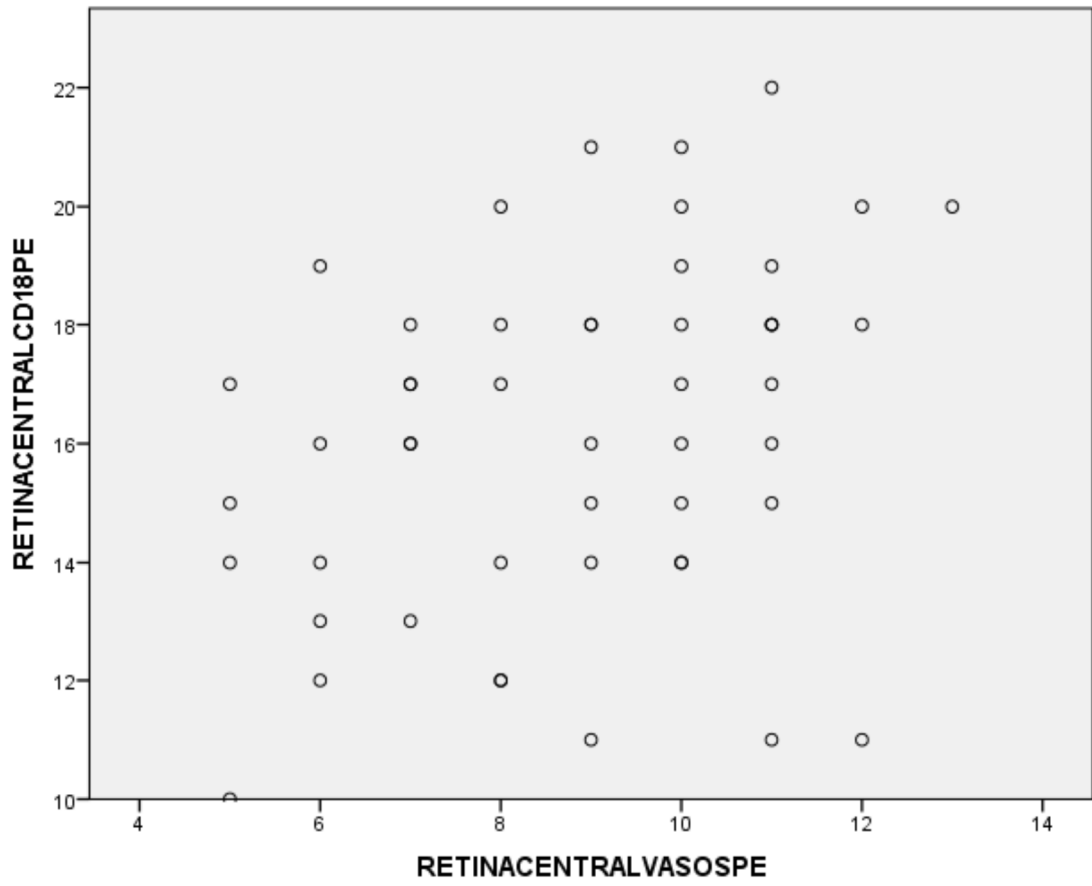


FIG. 4

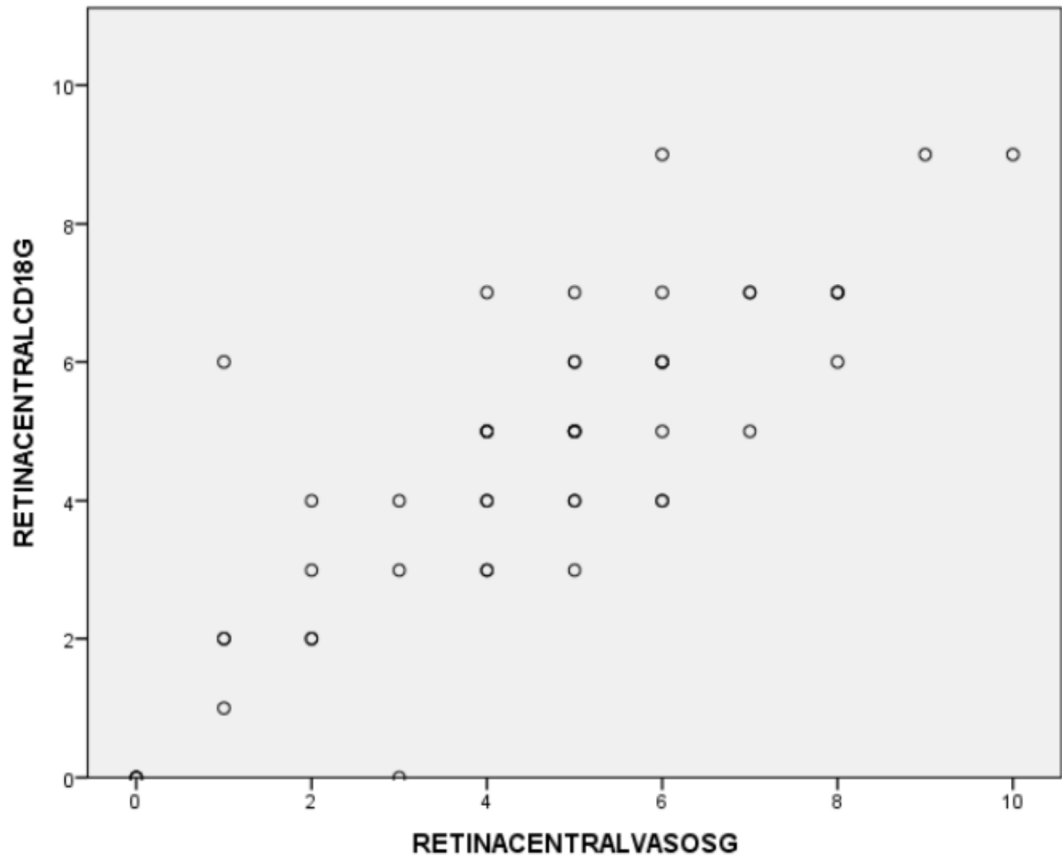


FIG. 5

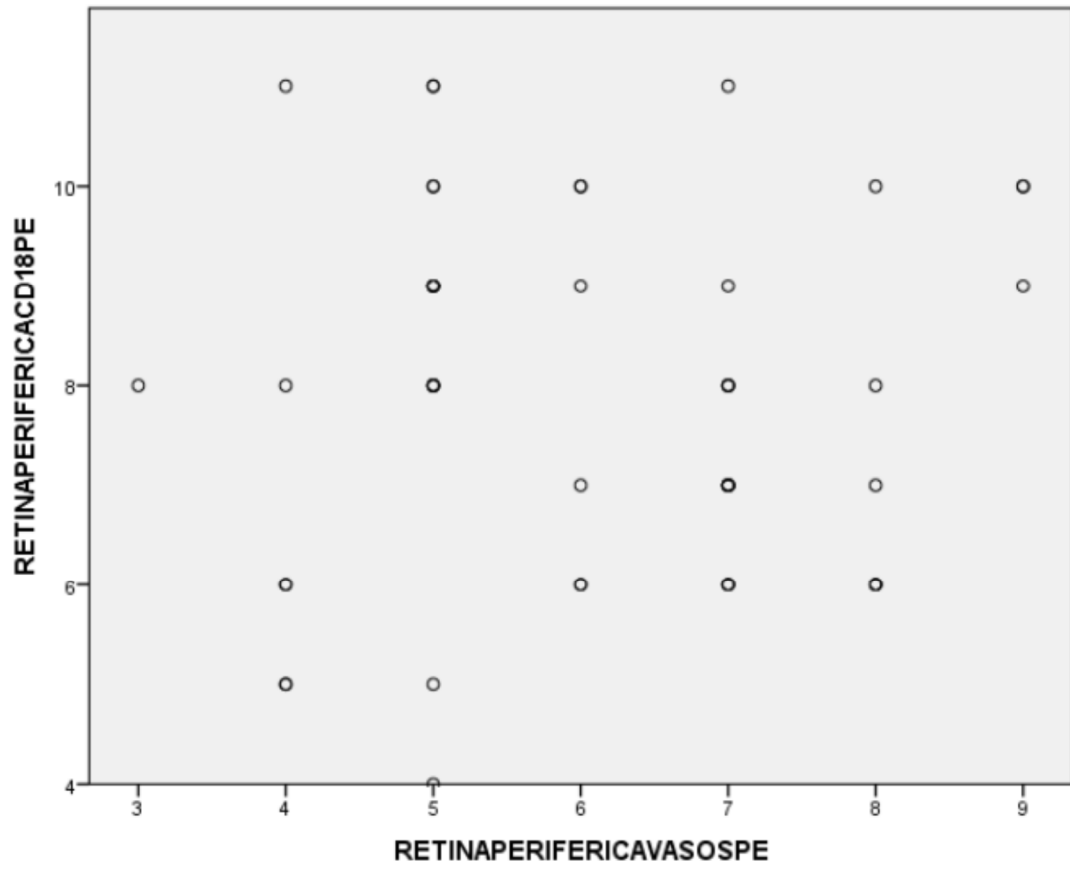


FIG. 6

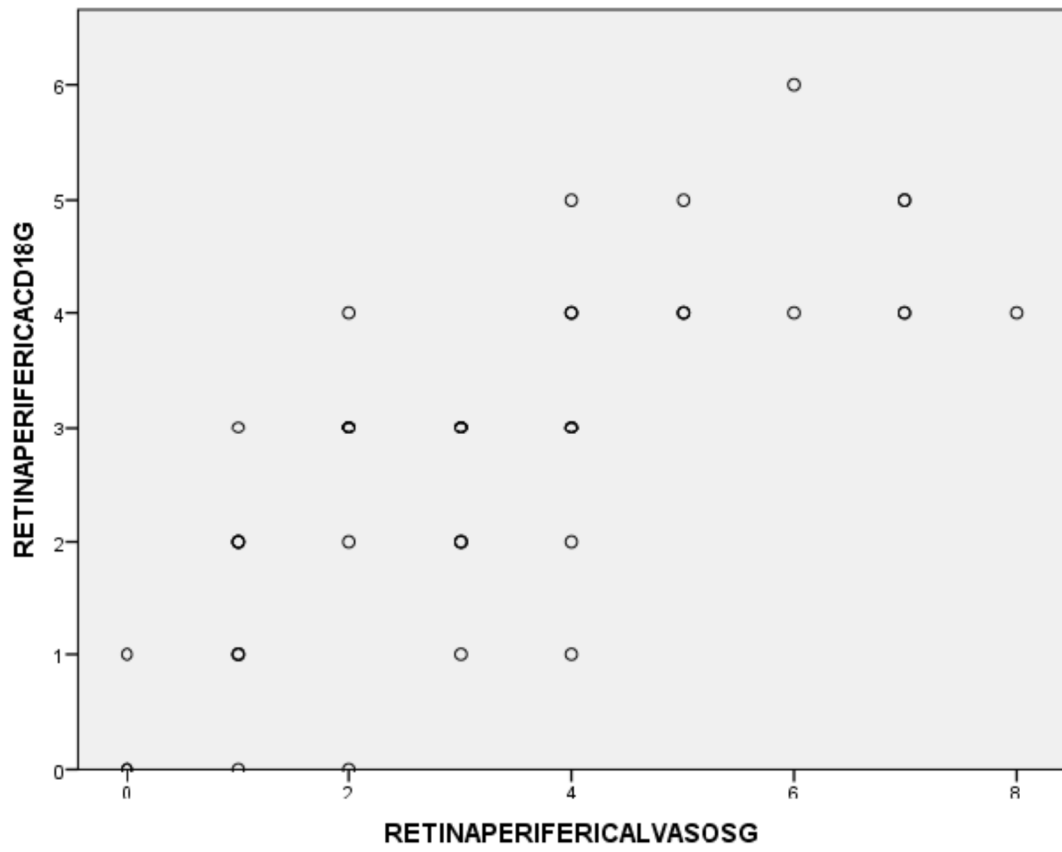


FIG- 7

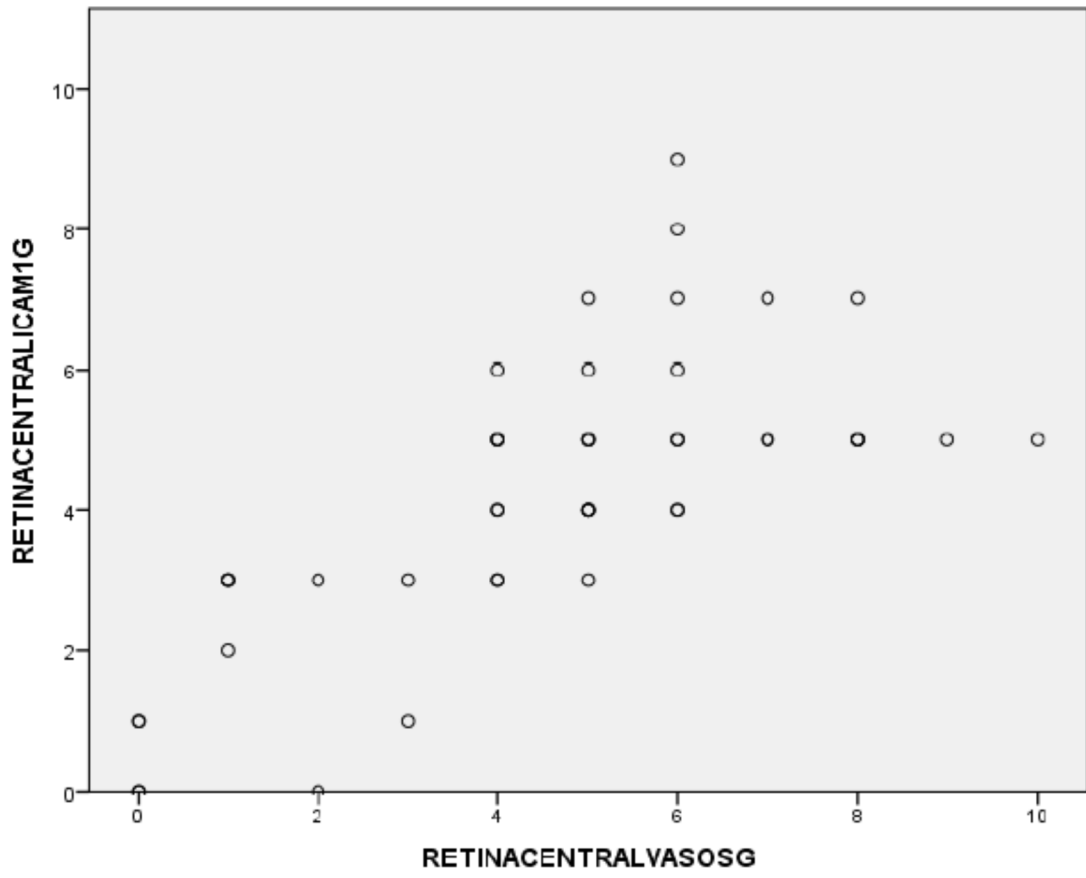


FIG. 8



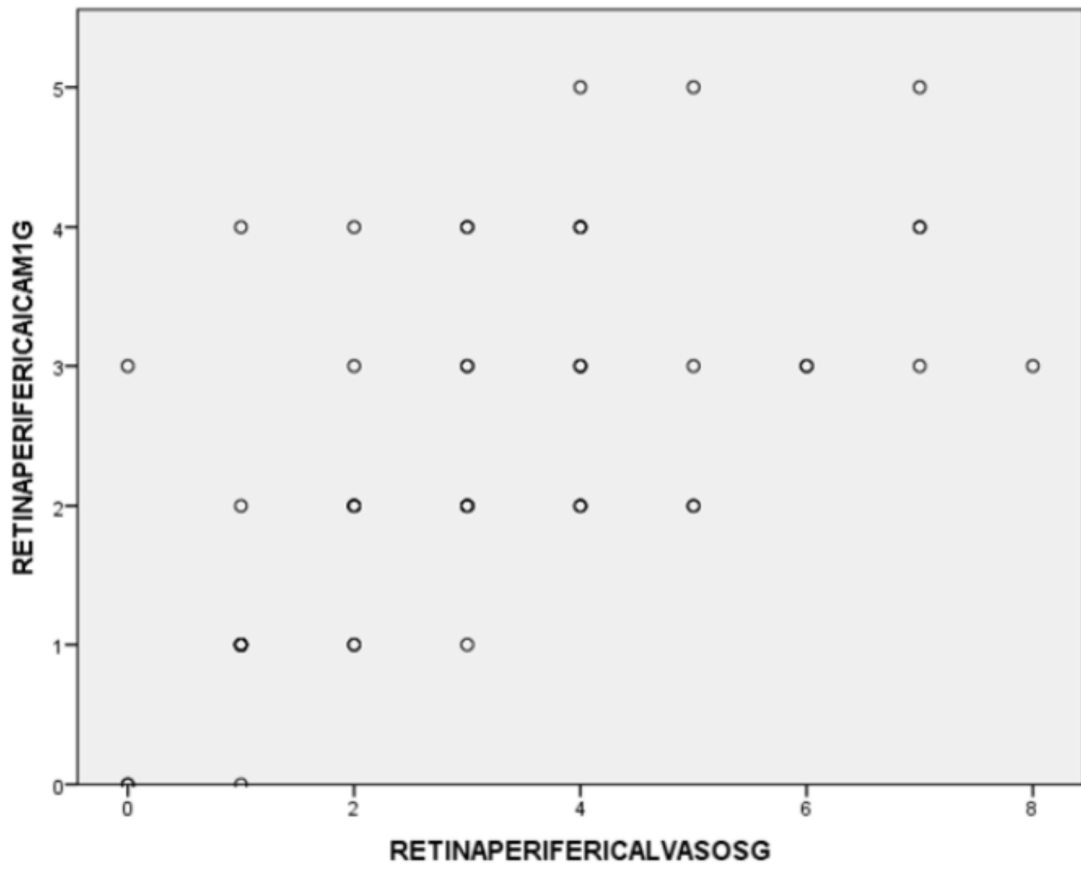


FIG. 9