

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 981**

51 Int. Cl.:

A61K 31/22 (2006.01)
A61K 31/225 (2006.01)
C07C 403/12 (2006.01)
C07C 403/10 (2006.01)
C07C 403/14 (2006.01)
C07C 403/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2005** **E 11163943 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017** **EP 2397132**

54 Título: **Derivados de retinal y métodos de uso de los mismos para el tratamiento de trastornos visuales**

30 Prioridad:

18.06.2004 US 580889 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF WASHINGTON (100.0%)
Intellectual Property and Technology Transfer,
4311, 11th Avenue NE Suite 500, Campus Box
354990
Seattle, WA 98105-4608, US**

72 Inventor/es:

**PALCZEWSKI, KRZYSZTOF y
BATTEN, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 644 981 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

Derivados de retinal y métodos de uso de los mismos para el tratamiento de trastornos visuales

5 Antecedentes de la invención

La disminución de la agudeza visual o la pérdida total de la visión pueden ser resultado de numerosas enfermedades o trastornos de los ojos causados por una disfunción de los tejidos o estructuras en el segmento anterior del ojo y/o el segmento posterior del ojo. Las enfermedades o trastornos del segmento posterior del ojo, en general, son enfermedades vasculares de la retina o la coroides o enfermedades hereditarias tales como la Amaurosis Congénita de Leber. La degeneración macular asociada con la edad (DMAE) es una de las enfermedades específicas asociadas con la parte posterior del globo ocular y es la causa principal de ceguera entre las personas mayores. La DMAE da como resultado daños en la mácula, una pequeña área circular en el centro de la retina. Debido a que la mácula es el área que se permite discernir pequeños detalles y leer o conducir, su deterioro puede provocar disminución de la agudeza visual e incluso ceguera. La retina contiene dos tipos de células receptoras de luz, los conos y los bastones, que cambian la luz por señales eléctricas. A continuación, el cerebro convierte estas señales en imágenes. La mácula es rica en células de cono, que proporcionan la visión central. Las personas con DMAE padecen deterioro de la visión central, pero por lo general conservan la vista periférica.

La visión ligeramente borrosa o distorsionada es el síntoma temprano más común de DMAE. La pérdida visual con DMAE seca, por lo general avanza lentamente mientras que la pérdida visual con DMAE húmeda avanza más rápidamente y puede producirse en días o semanas. Los pacientes con DMAE húmeda en un ojo tienen un mayor riesgo de desarrollar neovascularización coroidea (NVC) en el otro ojo. La magnitud del riesgo varía, dependiendo de la apariencia del segundo ojo. El riesgo es mayor en ojos con numerosas drusas grandes, con cambios anormales de pigmento en la mácula, y en pacientes con un historial de presión arterial alta. Las reacciones que tienen lugar en el EPR conducen a productos de oxidación que conducen a la muerte celular y a la neovascularización. Este exceso de metabolismo conduce a la formación de drusas bajo el EPR.

Otras enfermedades de los ojos también afectan a la función de los fotorreceptores en el ojo. La Retinitis Pigmentaria representa una enfermedad causada por defectos en muchos genes diferentes. Todos ellos tienen una vía final común de ceguera nocturna y pérdida de la visión periférica que puede conducir al estrechamiento del campo visual y a la eventual pérdida de toda la visión en muchos pacientes. Generalmente son afectados los fotorreceptores de los bastones principalmente y la mayoría de los defectos genéticos que conducen a la enfermedad se producen en genes que se expresan predominantemente o sólo en las células de los bastones.

Una forma autosómica dominante de la Retinitis Pigmentosa comprende una sustitución de aminoácido en la opsina, una sustitución de prolina por histidina en el aminoácido 23. Este defecto compromete 10-20% de todos los casos Retinitis Pigmentosa. Esta proteína opsina anormal forma un agregado proteico que finalmente lleva a la muerte celular.

La Amaurosis Congénita de Leber es una afección muy rara de la infancia que afecta a los niños desde el nacimiento o poco después. Afecta tanto a los conos como a los bastones. Hay algunos defectos genéticos diferentes que se han asociado con la enfermedad. Estos incluyen los genes que codifican las proteínas RPE65 y LRAT. Ambos dan como resultado la incapacidad de que la persona elabore 11-*cis*-retinal en cantidades adecuadas. En los individuos carentes de RPE65, los ésteres de retinilo se acumulan en el epitelio pigmentario de la retina (EPR). Los individuos carentes de LRAT no son capaces de elaborar ésteres y posteriormente secretar cualquier exceso de retinoides.

Retinitis Punctata Albesciens es otra forma de Retinitis Pigmentosa que presenta un déficit de 11-*cis*-retinal en los bastones. El envejecimiento también conduce a la disminución de la visión nocturna y a la pérdida de la sensibilidad al contraste debido a una escasez de 11-*cis*-Retinal. Se cree que el exceso de opsina no unida excita aleatoriamente el sistema de transducción visual. Esto puede crear ruido en el sistema, y por lo tanto es necesario más luz y más contraste para ver bien.

La Ceguera Nocturna Estacionaria Congénita (CNEC) y el Fundus Albipunctatus son un grupo de enfermedades que se manifiestan en forma de ceguera nocturna, pero no hay una pérdida progresiva de la visión como en la Retinitis Pigmentaria. Algunas formas de CNEC se deben a un retraso en el reciclado del 11-*cis*-Retinal. Hasta hace poco se pensaba que el Fundus Albipunctatus era un caso especial de CNEC, en el que la apariencia de la retina es anormal con cientos de pequeños puntos blancos que aparecen en la retina. Se ha demostrado recientemente que ésta es también una enfermedad progresiva aunque mucho más lenta que la Retinitis Pigmentosa. Es causada por un defecto genético que conduce a un retraso en la ciclación del 11-*cis*-Retinal.

El documento de Patente de Estados Unidos n.º 6696069 describe métodos y composiciones cosméticas para el cuidado de la piel que comprenden un sulfato o fosfato de un alcohol ramificado. La composición puede contener un retinoide, que puede ser tartrato de retinilo.

Noll, Vision Research, 1984 24 (11) 1615-1622 revisa la idoneidad de los isómeros todo trans, 9-*cis* y 11-*cis* del retinol, el retinal y el palmitato de retinilo para la regeneración de rodopsina blanqueada en retinas aisladas de rana.

En la actualidad, existen pocos tratamientos para la deficiencia de retinoides. Un tratamiento, una combinación de vitaminas antioxidantes y zinc, produce sólo un pequeño efecto restaurador. Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones y métodos para la restauración o la estabilización de la función de los fotorreceptores y el alivio de los efectos de niveles deficientes de retinoides endógenos.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona compuestos y tales compuestos para su uso para restaurar y/o estabilizar la función de los fotorreceptores en un sistema visual de vertebrado. Los derivados de retinal sintéticos se pueden administrar a sujetos vertebrados humanos o no humanos para restaurar o estabilizar la función de los fotorreceptores, y/o para mejorar los efectos de una deficiencia en los niveles de retinoides.

En un aspecto, se proporcionan derivados sintéticos de retinal. La presente invención proporciona un éster de 9-*cis*-retinilo, en el que el sustituyente del éster es un radical carboxilato de un ácido policarboxílico C₃ a C₂₂, con la condición de que el sustituyente del éster no sea tartrato. El sustituyente del éster es un radical carboxilato de un ácido policarboxílico C₃ a C₂₂ (policarboxilato). Por ejemplo, el sustituyente puede ser succinato, citrato, cetoglutaratato, fumarato, malato y oxaloacetato.

El éster de retinilo es un éster de 9-*cis*-retinilo de un carboxilato C₃ a C₂₂. En otras realizaciones, el éster de retinilo es un éster de 9-*cis*-retinilo de un carboxilato C₃ a C₁₀.

Preferentemente, el éster de retinilo es un éster de 9-*cis*-retinilo seleccionado entre succinato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, cetoglutaratato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo y oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo.

Más preferentemente, el éster de 9-*cis*-retinilo es succinato de 9-*cis*-retinilo.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el derivado de retinal sintético y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El derivado sintético de retinal puede ser un derivado de Fórmula I como se representa en la página 14 (párrafo [0060]). El derivado sintético de retinal es un éster de retinilo, que es un éster de 9-*cis*-retinilo. El sustituyente del éster es un radical carboxilato de un ácido policarboxílico C₃ a C₂₂. La composición farmacéutica se puede componer, por ejemplo, como una composición oftalmológica en un vehículo oftalmológicamente aceptable para la administración al ojo por vía tópica o por inyección intraocular.

En una realización, la composición farmacéutica se formula para administración local a un ojo de un sujeto humano.

En otra realización como la composición farmacéutica se formula para administración oral, administración intravenosa, o administración intramuscular, administración de liberación temporal, o administración de liberación controlada o administración profiláctica.

En una realización adicional, la composición farmacéutica se formula para inyección.

En una realización, la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento de un trastorno visual que comprende administrar la composición a un ojo de un mamífero, en el que el derivado sintético de retinal complementa o reemplaza el 11-*cis*-retinal endógeno del ojo.

Preferentemente, el trastorno visual se selecciona entre Retinitis Pigmentosa (RP), Amaurosis Congénita de Leber (LCA), Retinitis Punctata Albesciens, Ceguera Nocturna Estacionaria Congénita, Fundus Albipunctatus, Degeneración Macular Relacionada con la Edad, pérdida de visión nocturna y sensibilidad de contraste.

En una realización, el éster retinilo de la invención se selecciona entre el grupo que consiste en oxalato de 9-*cis*-retinilo, malonato de 9-*cis*-retinilo, succinato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo, glutarato de 9-*cis*-retinilo, adipato de 9-*cis*-retinilo, pimelato de 9-*cis*-retinilo, suberato de 9-*cis*-retinilo, azelato de 9-*cis*-retinilo, sebacato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo y cetoglutaratato de 9-*cis*-retinilo.

En otro aspecto, los autores de la presente invención proporcionan compuestos para uso en un método para restaurar la función de los fotorreceptores en un mamífero. El método incluye administrar a un sujeto mamífero que tiene una deficiencia de retinoide endógeno una cantidad eficaz de un derivado de retinal sintético, en donde el derivado de retinal sintético se convierte en un retinal capaz de formar un complejo de opsina/retinal funcional. El derivado de retinal sintético es un éster de 9-*cis*-retinilo. El sustituyente éster puede ser un radical carboxilato de un ácido policarboxílico C₃ a C₂₂. Por ejemplo, el sustituyente éster puede ser succinato, citrato, cetoglutaratato, fumarato, malato y oxaloacetato. El sujeto mamífero puede ser, por ejemplo, un ser humano u otro mamífero.

En otro aspecto, los autores de la presente invención proporcionan compuestos para su uso en un método para mejorar la pérdida de la función de los fotorreceptores en un mamífero. El método incluye administrar una cantidad eficaz de un derivado de retinal sintético en el ojo de los vertebrados, en donde el derivado sintético de la retina se convierte en un retinal capaz de formar un complejo de opsina/retinal funcional. El derivado de retinal sintético es un éster de 9-*cis*-retinilo. El sustituyente del éster es C₃ a C₂₂. En otras realizaciones, el sustituyente éster comprende un radical carboxilato de un ácido policarboxílico de C₃ a C₁₀. Por ejemplo, el sustituyente éster puede ser succinato, citrato, cetoglutarato, fumarato, malato y oxaloacetato. El sujeto mamífero puede ser, por ejemplo, un ser humano u otro mamífero.

En un aspecto, los autores de la presente invención describen las composiciones para su uso en un método de restauración de la función de los fotorreceptores en un ojo de vertebrado. El método puede incluir la administración al vertebrado que lo necesita, que tiene una deficiencia de retinoide endógeno, de una cantidad eficaz de un derivado sintético de retinal en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el derivado de retinal sintético se convierte en un retinal capaz de formar un complejo de opsina/retinal funcional. El derivado sintético de retinal puede ser un derivado de Fórmula I.

En algunos métodos, el derivado de retinal sintético es un éster de 9-*cis*-retinilo, tal como, por ejemplo, acetato de 9-*cis*-retinilo, succinato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, cetoglutarato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo, u oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo.

El derivado sintético de retinal se puede administrar a un vertebrado que lo necesite. Por ejemplo, el vertebrado puede tener, o estar predispuesto a desarrollar, una deficiencia de retinoide endógeno asociada con Degeneración Macular Asociada con la Edad, la Amaurosis Congénita de Leber, la Retinitis Punctata Albesciens, la Ceguera Nocturna Estacionaria Congénita, el Fundus Albipunctatus u otra enfermedad o afección asociada con una deficiencia de retinoide endógeno.

El derivado de retinoide sintético se puede administrar localmente, por ejemplo por medio de gotas oculares, inyección intraocular, inyección periocular o similar. El derivado sintético de retinal se puede administrar por vía oral al vertebrado. Preferentemente, el vertebrado es un ser humano.

En otro aspecto, los autores de la presente invención describen compuestos para su uso en un método de moderación del requerimiento de retinoide endógeno en un ojo de vertebrado. El método puede incluir la administración al ojo de un derivado de retinal sintético en un vehículo farmacéuticamente u oftalmológicamente aceptable, en donde el derivado de retinal sintético se convierte en un retinal capaz de formar un complejo de opsina/retinal funcional. El derivado sintético de retinal puede ser un derivado de Fórmula I.

En algunos métodos, el derivado de retinal sintético es un éster de 9-*cis*-retinilo, tal como, por ejemplo, succinato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, cetoglutarato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo, u oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo.

En algunos aspectos, el derivado de retinal sintético se puede administrar a un vertebrado que lo necesite. Por ejemplo, el vertebrado puede tener, o puede estar predispuesto a desarrollar, una deficiencia de retinoide endógeno asociada a la Degeneración Macular Asociada con la Edad, la Amaurosis Congénita de Leber, la Retinitis Punctata Albesciens, la Ceguera Nocturna Estacionaria Congénita, el Fundus Albipunctatus u otra enfermedad o afección asociadas con una deficiencia de retinoide endógeno.

En algunos aspectos, el derivado de retinoide sintético se puede administrar localmente, por ejemplo por medio de gotas oculares, inyección intraocular, o inyección periocular. En otros aspectos, el derivado de retinal sintético se puede administrar por vía oral al vertebrado. En algunos aspectos, el vertebrado es un ser humano.

En otro aspecto más, se proporcionan compuestos para su uso en un método de alivio de la pérdida de función de los fotorreceptores en un ojo de vertebrado. El método puede incluir la administración de una cantidad profilácticamente eficaz de un derivado de retinal sintético en un vehículo farmacéuticamente u oftalmológicamente aceptable para el ojo de los vertebrados, en donde el derivado de retinal sintético se convierte en un retinal capaz de formar un complejo de opsina/retinal funcional. El derivado sintético de retinal puede ser un derivado de Fórmula I.

En algunos aspectos, el derivado de retinal sintético es un éster de 9-*cis*-retinilo, tal como, por ejemplo, succinato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, cetoglutarato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo, u oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo.

En algunos aspectos, el derivado de retinoide sintético se puede administrar localmente, por ejemplo, por medio de gotas oculares, inyección intraocular, o inyección periocular. En otros métodos, el derivado de retinal sintético se puede administrar por vía oral al vertebrado. En algunos métodos, el vertebrado es un ser humano.

Los autores de la presente invención también describen un método de selección de un tratamiento para un sujeto que tiene su capacidad visual disminuida. El método puede incluir la determinación de si el sujeto tiene un nivel de

retinoide endógeno deficiente, en comparación con un sujeto patrón, y la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un derivado de retinal sintético en un vehículo farmacéuticamente aceptable (p. ej., un vehículo oftalmológicamente aceptable), en donde el derivado de retinal sintético se convierte en un retinal capaz de formar un complejo de opsina/retinal funcional. El derivado sintético de retinal puede ser, por ejemplo, un derivado de Fórmula I.

En algunos métodos, el derivado de retinal sintético es un éster de 9-*cis*-retinilo, tal como, por ejemplo, succinato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, cetoglutarato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo, u oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo.

En algunos aspectos, el retinoide endógeno es un éster de 11-*cis*-retinilo. En algunos aspectos, el derivado de retinoide sintético se puede administrar localmente, por ejemplo por medio de gotas oculares, inyección intraocular, o inyección periocular. En otros aspectos, el derivado de retinal sintético se puede administrar por vía oral al vertebrado. En algunos aspectos, el vertebrado es un ser humano.

En otro aspecto adicional, se proporcionan composiciones farmacéuticas y formas de dosificación oral. Las composiciones incluyen el derivado de retinal sintético de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable (p. ej., un vehículo oftalmológicamente aceptable). El derivado sintético de retinal puede ser un derivado de Fórmula I.

En algunos aspectos, el derivado de retinal sintético es un éster de 9-*cis*-retinilo, tal como, por ejemplo, succinato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, cetoglutarato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo, u oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo.

La composición farmacéutica puede ser, por ejemplo, una solución inyectable intraocular o una solución inyectable periocular. La forma de dosificación oral puede ser, por ejemplo, una píldora, comprimido, cápsula, o cápsula de gel.

En otro aspecto más, los autores de la presente invención describen compuestos para su uso en un método de tratamiento de la Amaurosis Congénita de Leber en un sujeto humano. El método generalmente incluye administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un derivado de retinal sintético en un vehículo farmacéuticamente u oftalmológicamente aceptable. El derivado sintético de retinal puede ser un derivado de Fórmula I.

En algunos aspectos, el derivado de retinal sintético es un éster de 9-*cis*-retinilo, tal como, por ejemplo, succinato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, cetoglutarato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo, u oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo.

En algunos aspectos, el derivado retinoide sintético se puede administrar localmente, por ejemplo por medio de gotas oculares, inyección intraocular, o inyección periocular. En otros aspectos, el derivado de retinal sintético se puede administrar por vía oral al vertebrado. En algunos aspectos, el vertebrado es un ser humano.

En otro aspecto, los autores de la presente invención describen compuestos para su uso en un método de tratamiento de la retinitis Punctata Albesciens, la Ceguera Nocturna Estacionaria Congénita o el Fundus Albipunctatus en un sujeto humano. El método puede incluir la administración al sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un derivado de retinal sintético en un vehículo farmacéuticamente u oftalmológicamente aceptable. El método generalmente incluye administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un derivado de retinal sintético en un vehículo farmacéuticamente u oftalmológicamente aceptable. El derivado sintético de retinal puede ser un derivado de Fórmula I.

En algunos aspectos, el derivado de retinal sintético es un éster de 9-*cis*-retinilo, tal como, por ejemplo, succinato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, cetoglutarato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo, u oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo.

En algunos aspectos, el derivado de retinoide sintético se puede administrar localmente, por ejemplo por medio de gotas oculares, inyección intraocular, o inyección periocular. En otros métodos, el derivado de retinal sintético se puede administrar por vía oral al vertebrado. En algunos métodos, el vertebrado es un ser humano.

En otro aspecto más, los autores de la presente invención describen compuestos para su uso en un método de tratamiento de la Degeneración Macular Asociada con la Edad en un sujeto humano se proporciona. El método puede incluir la administración al sujeto que lo necesite de una cantidad eficaz de un derivado de retinal sintético en un vehículo farmacéuticamente u oftalmológicamente aceptable. El derivado sintético de retinal puede ser un derivado de Fórmula I.

En algunos aspectos, el derivado de retinal sintético se convierte en un retinal sintético que se une a opsina libre en el ojo. En algunos aspectos, el derivado de retinal sintético es un éster de 9-*cis*-retinilo, tal como, por ejemplo, succinato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, cetoglutarato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo, u oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo.

En algunos aspectos, el derivado de retinoide sintético se puede administrar localmente, por ejemplo por medio de gotas oculares, inyección intraocular, o inyección periocular. En otros aspectos, el derivado de retinal sintético se puede administrar por vía oral al vertebrado. En algunos aspectos, el vertebrado es un ser humano.

En un aspecto adicional más, los autores de la presente invención describen compuestos para su uso en un método para tratar o prevenir la pérdida de visión nocturna o de sensibilidad al contraste en un sujeto humano de edad avanzada. El método puede incluir la administración al sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un derivado de retinal sintético en un vehículo farmacéuticamente u oftalmológicamente aceptable. El derivado sintético de retinal puede ser un derivado de Fórmula I.

En algunos aspectos, el derivado de retinal sintético se convierte en un retinal sintético que se une a opsina libre en el ojo. En algunos aspectos, el derivado de retinal sintético es un éster de 9-*cis*-retinilo, tal como, por ejemplo, succinato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, cetoglutarato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo, u oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo.

En algunos aspectos, el derivado retinoide sintético se puede administrar localmente, por ejemplo por medio de gotas oculares, inyección intraocular, o inyección periocular. En otros aspectos, el derivado de retinal sintético se puede administrar por vía oral al vertebrado. En algunos aspectos, el vertebrado es un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Cromatograma de HPLC que muestra la elución de retinoide en tejido de ojo e hígado de ratón tratado y de control. (a). Ojos de ratón LRAT-/- adaptado a la oscuridad. (b). Ojos de ratón LRAT-/- adaptado a la oscuridad alimentado por sonda con 5 mg de palmitato de todo-*trans*-retinilo 2 días antes. (c). Ojos de ratón LRAT-/- adaptado a la oscuridad alimentado por sonda con 5 mg de acetato de todo-*trans*-retinilo 2 días antes. (d). Ojos de ratón LRAT-/- adaptado a la oscuridad alimentado por sonda 6,5 mg de acetato de 9-*cis*-retinol 3 días antes. (e). Tejido hepático de ratón LRAT-/- adaptado a la oscuridad. (f). Tejido hepático de ratón LRAT-/- adaptado a la oscuridad alimentado por sonda con 5 mg de palmitato de todo-*trans*-retinol 2 días antes. (g). Tejido hepático de ratón LRAT-/- adaptado a la oscuridad alimentado por sonda con 5 mg de acetato de todo-*trans*-retinilo 2 días antes. (h). Tejido hepático de ratón LRAT-/- adaptado a la oscuridad alimentado por sonda con 6,5 mg de acetato de 9-*cis*-retinol 3 días antes.

Figura 2. Oximas de 9-*cis*-retinal y 9-*cis*-retinol de ojo en el curso del tiempo, sonda 20 μ M.

Figura 3. Isomerización UV de acetato de todo-*trans*-retinilo a acetato de 9-*cis*-retinilo.

Figura 4. Separación por HPLC de acetato de 13-*cis*-retinilo (1), acetato de 9-*cis*-retinilo (2), y acetato de todo-*trans*-retinilo (3).

Figura 5. Niveles de oximas de 9-*cis*-retinal en los ojos de ratones Lrat-/- después de una dosis única o múltiple de acetato de 9-*cis*-R. (a) Nivel de 9-*cis*-RAL en ojos de ratón Lrat-/- después de una dosis variable de Ac 9-*cis*-R. (b) Nivel de 9-*cis*-RAL en ojos de ratón Lrat-/- después de dosis de de tamaño variable y numerosas de Ac 9-*cis*-R.

Figura 6. Niveles de cromóforo (en forma de oximas de 9-*cis*-retinal) en los ojos de ratones Lrat-/- después de la administración de isómeros de todo-*trans*-retinoides o succinato de 9-*cis*-retinilo. También se muestran las estructuras de los isómeros todo-*trans*-retinoides y succinato de 9-*cis*-retinilo.

Figura 7. Comparación de los niveles de cromóforos (en forma de oximas de 9-*cis*-retinal) en los ojos de ratones Lrat-/- después de la administración de 9-*cis*-retinal o acetato de 9-*cis*-retinilo a dosis bajas y altas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona derivados de retinal sintéticos y tales derivados para su uso en métodos para restaurar o estabilizar la función de los fotorreceptores en un sistema visual de vertebrados. El derivado de retinal sintético es un derivado de 9-*cis*-retinal en el que se modifica el grupo aldehídico de la cadena de polieno. El derivado de retinal sintético se puede convertir directamente o indirectamente en un retinal o un análogo de retinal sintético. Por lo tanto, en algunos aspectos, los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden ser descritos como un pro-fármaco, que después de la transformación metabólica se convierte en 9-*cis*-retinal, o un análogo de retinal sintético del mismo. La transformación metabólica puede ocurrir, por ejemplo, por hidrólisis ácida, actividad esterasa, actividad acetiltransferasa, o la actividad deshidrogenasa.

El derivado de retinal sintético puede ser un sustituto de retinoide, que complementa los niveles de retinoide endógeno. En algunas realizaciones, el retinal sintético puede unirse a opsina, y funcionar como un agonista de opsina. Según se utiliza en la presente memoria, el término "agonista" hace referencia a un retinal sintético que se une a la opsina y facilita la capacidad de un complejo de opsina/retinal sintético para responder a la luz. Como

agonista de opsina, un retinal sintético puede moderar el requerimiento de retinoide endógeno (por ejemplo, 11-*cis*-retinal). Un retinal sintético también puede restaurar o mejorar la función (por ejemplo, fotorrecepción) para una opsina mediante la unión a la opsina y la formación de un complejo de opsina/retinal sintético funcional, por medio de lo cual el complejo de opsina/retinal sintético puede responder a los fotones cuando son parte de un bastón o membrana de cono.

Los derivados de retinal sintéticos se pueden administrar para restaurar o estabilizar la función de los fotorreceptores, y/o para mejorar los efectos de una deficiencia en los niveles de retinoides. La función de los fotorreceptores se puede restaurar o estabilizar, por ejemplo, proporcionando un derivado de retinal sintético como un sustituto de 11-*cis*-retinoide y/o un agonista de la opsina. El derivado de retinal sintético también puede mejorar los efectos de una deficiencia de retinoide en un sistema visual de vertebrado. El derivado de retinal sintético puede ser administrado profilácticamente o terapéuticamente a un vertebrado. Los vertebrados adecuados incluyen, por ejemplo, seres humanos y vertebrados no humanos. Los vertebrados no humanos adecuados incluyen, por ejemplo, mamíferos, tales como perros (caninos), gatos (felinos), caballos (equinos) y otros animales domésticos.

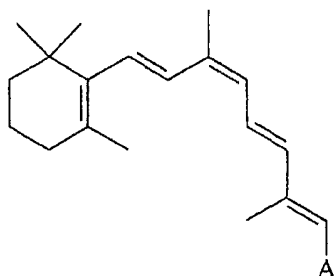
En un aspecto, se proporcionan derivados de retinal sintéticos. Los derivados de retinal sintéticos son derivados de 9-*cis*-retinal en los que el grupo aldehídico de la cadena de polieno se convierte en un éster, tal como se describe adicionalmente en este documento. Tales derivados de retinal sintéticos son ésteres de 9-*cis*-retinilo, como se describe a continuación en la presente memoria. El derivado de retinal sintético puede ser metabolizado para liberar un retinal natural o sintético, tal como, por ejemplo, 9-*cis*-retinal, 11-*cis*-retinal o un análogo de retinal sintético del mismo, tales como los descritos en la presente memoria o en la Solicitud Internacional co-pendiente Núm. PCT/US04/07937, presentada el 15 de Marzo de 2004.

En un aspecto, el derivado de retinal sintético es un éster de retinilo. El éster de retinilo es un éster de 9-*cis*-retinilo en el que el sustituyente éster es un ácido policarboxílico. Según se utiliza en la presente memoria, un "ácido policarboxílico" es un ácido carboxílico de orden di-, tri- o superior. En algunas realizaciones, el ácido carboxílico es un ácido policarboxílico C₃-C₂₂, C₃-C₂₂, C₃-C₂₂, C₃-C₁₀, C₄-C₁₀, C₄-C₈, C₄-C₆ o C₄.

Los grupos ácido carboxílico adecuados incluyen, por ejemplo, ácido oxálico (ácido etanodioico), ácido malónico (ácido propanodioico), ácido succínico (butanodioico), ácido fumárico (ácido butenodioico), ácido málico (ácido 2-hidroxi-butenodioico), ácido glutárico (ácido pentanodioico), ácido adípico (ácido hexanodioico), ácido pimélico (heptanodioico), ácido subérico (octanodioico), ácido azelaico (ácido nonanodioico), ácido sebácico (ácido decanodioico), ácido cítrico, ácido oxaloacético, o ácido cetoglutárico.

En una realización ilustrativa, el éster de retinilo es un éster de 9-*cis*-retinol o un éster de 11-*cis*-retinilo que incluye un sustituyente ácido policarboxílico C₃-C₁₀. (En este contexto, los términos "sustituyente" o "grupo" hacen referencia a un radical unido covalentemente al oxígeno terminal de la cadena de polieno). En otra realización ilustrativa, el éster de retinilo es un éster de 9-*cis*-retinilo que incluye un sustituyente ácido policarboxílico C₃-C₂₂. El sustituyente ácido policarboxílico puede ser, por ejemplo, succinato, citrato, cetoglutarato, fumarato, malato u oxaloacetato. En otra realización ilustrativa, el éster de retinilo es un éster de 9-*cis*-retinilo que incluye un sustituyente ácido di-carboxílico (di-ácido) C₃-C₂₂. El ácido policarboxílico no es tartrato de 9-*cis*-retinilo. En algunas realizaciones, el éster de retinilo no es un éster de retinilo de origen natural que normalmente se encuentra en el ojo. En algunas realizaciones, el éster de retinilo es un éster de retinilo aislado. Según se utiliza en la presente memoria, "aislado" hace referencia a una molécula que existe fuera de su entorno nativo y por lo tanto no es un producto de la naturaleza. Una molécula aislada puede existir en una forma purificada o puede existir en un entorno no nativo.

En otro aspecto, el derivado de retinal puede ser un éster de 9-*cis*-retinilo de la siguiente fórmula I:



(I)

En algunas realizaciones, A es CH₂OR, donde R puede ser un grupo carboxilato de un ácido dicarboxílico o de otro ácido carboxílico (por ejemplo, un hidroxiácido) para formar un éster de retinilo (algunos de los cuales también son referidos como ésteres de retinoilo). El ácido carboxílico puede ser, por ejemplo, ácido oxálico (ácido etanodioico), ácido malónico (ácido propanodioico), ácido succínico (butanodioico), ácido fumárico (ácido butenodioico), ácido málico (ácido 2-hidroxi-butenodioico), ácido glutárico (ácido pentanodioico), ácido adípico (ácido hexanodioico), ácido

pimélico (heptanodioico), ácido subérico (octanodioico), ácido azelaico (ácido nonanodioico), ácido sebácico (ácido decanodioico), ácido cítrico, ácido oxaloacético, o ácido cetoglutarico.

Los ejemplos de los derivados de retinal sintéticos adecuados incluyen, por ejemplo, succinato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, cetoglutarato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo, y oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo.

Métodos de fabricación de retinales sintéticos y derivados se describen, por ejemplo, en las siguientes referencias: Anal. Biochem. 272:232-42 (1999); Angew. Chem. 36:2089-93 (1997); Biochemistry 14:3933-41 (1975); Biochemistry 21:384-93 (1982); Biochemistry 28:2732-39 (1989); Biochemistry 33:408-16 (1994); Biochemistry 35:6257-62 (1996); Bioorganic Chemistry 27:372-82 (1999); Biophys. Chem. 56:31-39 (1995); Biophys. J. 56:1259-65 (1989); Biophys. J. 83:3460-69 (2002); Chemistry 7:4198-204 (2001); Chemistry (Europa) 5:1172-75 (1999); FEBS 158:1 (1983); J. Am. Chem. Soc. 104:3214-16 (1982); J. Am. Chem. Soc. 108:6077-78 (1986); J. Am. Chem. Soc. 109:6163 (1987); J. Am. Chem. Soc. 112:7779-82 (1990); J. Am. Chem. Soc. 119:5758-59 (1997); J. Am. Chem. Soc. 121:5803-04 (1999); J. American Chem. Soc. 123:10024-29 (2001); J. American Chem. Soc. 124:7294-302 (2002); J. Biol. Chem. 276:26148-53 (2001); J. Biol. Chem. 277:42315-24 (2004); J. Chem. Soc. - Perkin T. 1:1773-77 (1997); J. Chem. Soc. Perkin-T. 1:2430-39 (2001); J. Org. Chem. 49:649-52 (1984); J. Org. Chem. 58:3533-37 (1993); J. Physical Chemistry B 102:2787-806 (1998); Lipids 8:558-65; Photochem. Photobiol. 13:259-83 (1986); Photochem. Photobiol. 44:803-07 (1986); Photochem. Photobiol. 54:969-76 (1991); Photochem. Photobiol. 60:64-68 (1994); Photochem. Photobiol. 65:1047-55 (1991); Photochem. Photobiol. 70:111-15 (2002); Photochem. Photobiol. 76:606-615 (2002); Proc. Natl Acad. Sci. USA. 88:9412-16 (1991); Proc. Natl Acad. Sci. USA 90:4072-76 (1993); Proc. Natl Acad. Sci. USA. 94:13442-47 (1997); y Proc. R. Soc. Lond. Serie B, Biol. Sci. 233 (1270): 55-76 1988).

Los ésteres de retinilo se pueden formar por medio de métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, mediante esterificación catalizada por ácido de un retinol con un ácido carboxílico, mediante reacción de un haluro de acilo con un retinol, mediante transesterificación de un éster de retinilo con un ácido carboxílico, mediante reacción de un haluro primario con una sal carboxilato de un ácido retinoico, mediante reacción catalizada por ácido de un anhídrido con un retinol. En un ejemplo, los ésteres de retinilo se pueden formar por esterificación catalizada por ácido de un retinol con un ácido carboxílico, tal como, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido pelargónico, ácido cáprico, láurico ácido, ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido linoleico, ácido succínico, o ácido fumárico. En otro ejemplo, los ésteres de retinilo se pueden formar por reacción de un haluro de acilo con un retinol (véase, *por ejemplo*, Van Hooser et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:8623-28 (2000)). Los haluros de acilo adecuados incluyen, por ejemplo, cloruro de acetilo, o cloruro de palmitoilo.

Los *trans*-retinoides se pueden isomerizar a *cis*-retinoides por medio de exposición a luz UV. Por ejemplo, el todo-*trans*-retinal, el todo-*trans*-retinol, el éster de todo-*trans*-retinilo o el ácido todo-*trans*-retinoico se pueden isomerizar a 9-*cis*-retinal, 9-*cis*-retinol, éster de 9-*cis*-retinilo o ácido 9-*cis*-retinoico, respectivamente. Los *trans*-retinoides se pueden isomerizar a 9-*cis*-retinoides, por ejemplo, mediante exposición a luz UV que tiene una longitud de onda de aproximadamente 365 nm, y sustancialmente libre de longitudes de onda más cortas que causan la degradación de los *cis*-retinoides, como se describe adicionalmente en la presente memoria.

Para una proteína opsina específica, se puede identificar un derivado de retinal sintético adecuado, por ejemplo, por medio de un sistema de expresión que expresa la proteína opsina. Los modelos animales adecuados incluyen, por ejemplo, ratones *RPE65*^{-/-} o *LRAT*^{-/-} (véanse, p. ej., Van Hooser et al., J. Biol. Chem. 277:19173-82 (2002); Baehr et al., Vision Res. 43:2957-58 (2003); Batten et al., J. Biol. Chem. 279:10422-32 (2004); Kuksa et al., Vision Res. 43:2959-81 (2003); Thompson et al., Dev. Ophthalmol. 37:141-54 (2003)). Otros modelos animales no humanos adecuados incluyen además otros sistemas de ratón, rata o primate. Tales modelos animales se pueden preparar, por ejemplo, mediante la promoción de la recombinación homóloga entre un ácido nucleico que codifica una opsina en su cromosoma y un ácido nucleico exógeno que codifica una opsina mutante. En un aspecto, la recombinación homóloga se lleva a cabo mediante la transformación de células pluripotenciales derivadas de embriones (ES) con un vector que contiene un gen de opsina, de tal manera que se produzca la recombinación homóloga, seguido de la inyección de las células ES en un blastocisto, y la implantación del blastocisto en una de madre adoptiva, seguido del nacimiento del animal quimérico (véase, p. ej., Capecchi, Science 244:1288-92 (1989)). El animal quimérico puede ser criado para producir animales más transgénicos.

Los sistemas de expresión adecuados también pueden incluir, por ejemplo, sistemas *in vitro* o *in vivo*. Los sistemas *in vitro* adecuados incluyen, por ejemplo, sistemas de transcripción-traducción acoplados. Los sistemas *in vivo* adecuados incluyen, por ejemplo, células que expresan una proteína opsina. Por ejemplo, las células de un sistema visual de vertebrado pueden ser adaptados para el cultivo *in vitro*, o se pueden utilizar líneas celulares recombinantes que expresan una proteína opsina. Las líneas celulares son típicamente líneas celulares estables que expresan la proteína opsina. Se puede añadir un retinal sintético o un derivado de retinal o sintético al medio de cultivo de las células, y cultivar las células durante un período de tiempo adecuado para permitir la producción de opsina/rodopsina. La opsina y/o la rodopsina se pueden aislar (por ejemplo, por inmunofluorescencia). Las muestras de proteínas aisladas se examinan para determinar la cantidad de pigmento formado y la absorbancia máxima. Los

métodos para introducir ácidos nucleicos en células de vertebrados se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001).

- 5 Se pueden preparar líneas celulares recombinantes que expresan la proteína opsina, por ejemplo, mediante la introducción de un constructo de expresión que codifica una proteína opsina en una línea celular adecuada. El constructo de expresión incluye normalmente un promotor unido operablemente a un ácido nucleico que codifica una proteína opsina, y, opcionalmente, una o varias señales de terminación. Los ácidos nucleicos que codifican la opsina se pueden obtener, por ejemplo, mediante el uso de información de una base de datos (por ejemplo, una genoteca de ADN genómico o ADNc), por reacción en cadena de la polimerasa, o similar. Por ejemplo los ácidos nucleicos que codifican la opsina se pueden obtener por hibridación. (Véase, en general Sambrook *et al.* (más arriba)). Un ácido nucleico que codifica la opsina se puede conseguir por hibridación en condiciones de restricción baja, media o alta.
- 10
- 15 Los ácidos nucleicos que codifican la opsina se pueden obtener en condiciones de hibridación altamente restrictivas. A modo de ejemplo, y no de limitación, los procedimientos que utilizan condiciones altamente restrictivas son los siguientes: La prehibridación de filtros que contienen ADN se lleva a cabo de 8 horas a durante la noche a 65°C en tampón compuesto por 6x SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,02%, y 500 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Los filtros se hibridan durante 48 horas a 65°C en una mezcla de prehibridación que contiene 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y 5-20 x 10⁶ cpm de sonda marcada con P³². El lavado de los filtros se realiza a 65°C durante 1 hora en una solución que contiene 2x SSC, PVP al 0,01%, Ficoll al 0,01%, y BSA al 0,01%. Esto está seguido por un lavado en 0,1 x SSC a 50°C durante 45 minutos antes de la autorradiografía. Se pueden utilizar otras condiciones altamente restrictivas que son bien conocidas en la técnica. (Véase, en general Sambrook *et al.* (más arriba)).
- 20
- 25 El constructo de expresión puede incluir opcionalmente uno o más orígenes de replicación y/o uno o varios marcadores seleccionables (p. ej., un gen de resistencia a antibiótico). Los marcadores seleccionables adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos que confieren resistencia a ampicilina, tetraciclina, neomicina, G418, y similares. Las líneas celulares adecuadas incluyen, por ejemplo, células HEK293, células T-REx™-293, células CHO y otras células o líneas celulares.
- 30
- Los espectros de UV visible de la rodopsina (que comprenden opsina y un retinal sintético) pueden ser controlados para determinar si el retinal sintético ha formado una base de Schiff con la proteína opsina. Por ejemplo, se puede analizar una proteína purificada, desnaturalizada con ácido para determinar si se encuentra presente una absorbancia máxima de aproximadamente 490 nm, proporcionando pruebas de que el derivado de retinal sintético forma una base de Schiff con la proteína opsina. Se puede utilizar el tratamiento con hidroxilamina para confirmar que la base de Schiff es secuestrada del entorno externo.
- 35
- Los derivados de retinal sintéticos adecuados también se pueden seleccionar mediante modelado molecular de la rodopsina. Las coordenadas de la estructura cristalina de la rodopsina están disponibles en el Banco de Datos de Proteínas (1HZX) (Teller et al., *Biochemistry* 40:7761-72 (2001)). Los efectos de las sustituciones de aminoácidos sobre la estructura de la rodopsina, y sobre los contactos entre la opsina y el 11-*cis*-retinal, o un retinal sintético, se pueden determinar mediante el modelado molecular.
- 40
- Las coordenadas de la estructura cristalina de la rodopsina del Banco de Datos de Proteínas (1HZX) (Teller et al., *Biochemistry* 40:7761-72 (2001)) se puede utilizar para generar un modelo de ordenador. La adición de átomos de hidrógeno y la optimización se pueden realizar, por ejemplo, utilizando Insight II (InsightII release 2000, Accelrys, Inc., San Diego, CA). El agua cristalográfica se puede retirar, e introducir las moléculas de agua basándose en el espacio accesible en la región extracelular. Normalmente, no se lleva a cabo la minimización antes de añadir el agua. Se puede utilizar una capa de agua (p. ej., grosor de 5 Å) para recubrir la parte extracelular de la rodopsina, así como los residuos en contacto con las cabezas de los fosfolípidos polares. Se puede permitir que todas las moléculas de agua se muevan libremente, como la mitad extracelular de la rodopsina, con el retinal. Si no se coloca agua corriente en la parte citoplásmica de la rodopsina, esta parte de la molécula se puede congelar para evitar la degradación del modelo.
- 45
- 50 Se puede poner agua corriente sobre la parte extracelular de la rodopsina (junto con la parte enterrada en la membrana en contacto con las cabezas polares de los fosfolípidos). Se puede permitir que el agua y la parte extracelular de la rodopsina se muevan y modelar el movimiento a cualquier frecuencia adecuada. Por ejemplo, el movimiento de la rodopsina modelado se puede modelar a simulaciones de 100 ps.
- 55
- 60 Los retinales sintéticos se pueden poner en contacto con una proteína opsina en condiciones adecuadas y durante un período de tiempo suficiente para la formación de un complejo de proteína opsina/retinal sintético. La estabilidad del complejo de opsina/retinal sintético se puede determinar por medio de métodos descritos en la presente memoria o como es conocido por el experto en la técnica. La opsina del complejo de opsina/retinal sintético se estabiliza cuando éste presenta una mayor estabilidad (p. ej., mayor vida media cuando está unida al retinal sintético en comparación con la opsina libre (es decir, no unida al retinoide), es menos sensible a la hidroxilamina, muestra
- 65

menos acumulación en agrosomas, o similar).

El retinal sintético puede ponerse en contacto con la proteína opsina *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, la proteína opsina se puede sintetizar en un sistema de traducción *in vitro* (p. ej., un sistema de expresión de germen de trigo o de producto lisado de reticulocitos) y añadir el retinal sintético al sistema de expresión. La proteína opsina puede ponerse en contacto con la proteína opsina *ex vivo*, y a continuación se puede administrar el complejo al ojo de un vertebrado.

En otro aspecto, los compuestos de la invención se pueden usar en métodos para restablecer o estabilizar la función de los fotorreceptores, o para mejorar la pérdida de fotorreceptores, en un sistema visual de vertebrado. Se puede administrar un derivado de retinal sintético en uno o ambos ojos de un vertebrado que tiene una deficiencia de retinoide (p. ej., una deficiencia de 11-*cis*-retinal), un exceso de opsina libre, un exceso de productos residuales de retinoides (p. ej., degradación) o productos intermedios en el reciclaje del todo-trans-retinal, o similar. El ojo de los vertebrados comprende normalmente una proteína opsina de tipo salvaje. Los métodos de determinación de los niveles de retinoides endógenos en un ojo de vertebrado, y una deficiencia de tales retinoides, se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Núm. 60/538,051 (presentada el 12 de Feb. de 2004). Otros métodos para determinar los niveles endógenos de retinoides en un ojo de vertebrado, y la deficiencia de tales retinoides, incluyen, por ejemplo, el análisis por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los retinoides en una muestra de un sujeto. Por ejemplo, los niveles de retinoides o la deficiencia de dichos niveles se pueden determinar a partir de una muestra de sangre de un sujeto.

Se puede obtener una muestra de sangre de un sujeto y se pueden separar los tipos y niveles de retinoides en la muestra y analizarlos por medio de cromatografía líquida a alta presión en fase normal (HPLC) (p. ej., con HPLC HP1100 y Beckman, Ultrasphere-Si, columna de 4,6 mm x 250 mm utilizando acetato de etilo al 10%/hexano al 90% a una velocidad de flujo de 1,4 ml/minuto). Los retinoides pueden ser detectados, por ejemplo, mediante detección a 325 nm empleando un detector de matrices de diodos y el programa HP ChemStation A.03.03. Se puede determinar una deficiencia de retinoides, por ejemplo, mediante comparación del perfil de retinoides en la muestra con una muestra de un sujeto de control (p. ej., un sujeto normal).

Según se utiliza en la presente memoria, los niveles de ausencia, deficiencia o agotamiento de retinoide endógeno, tal como 11-*cis*-retinal, hacen referencia a los niveles endógenos de retinoide más bajos que los que se encuentran en un ojo sano de un vertebrado de la misma especie. Un derivado de retinal sintético puede moderar el requerimiento de retinoide endógeno.

Según se utiliza en la presente memoria, "profiláctico" y "profilácticamente" hacen referencia a la administración de un derivado de retinal sintético para evitar el deterioro o un mayor deterioro del sistema visual de un vertebrado, en comparación con un sistema visual de vertebrado comparable que no recibe el derivado de retinal sintético. El término "restaurar" hace referencia a una mejora a largo plazo (p. ej., medida en semanas o meses) en la función de los fotorreceptores en un sistema visual de vertebrado, en comparación con un sistema visual de vertebrado comparable que no recibe el derivado de retinal sintético. El término "estabilizar" se refiere a la minimización de la degradación adicional en un sistema visual de vertebrado, en comparación con un sistema visual de vertebrado comparable que no recibe el derivado de retinal sintético.

En un aspecto, el ojo del vertebrado se caracteriza por tener Amaurosis Congénita de Leber ("ACL"). Esta enfermedad es una afección muy rara en la infancia que afecta a niños desde el nacimiento o poco después del mismo. Afecta tanto a los conos como a los bastones del ojo. Por ejemplo, ciertas mutaciones en los genes que codifican las proteínas RPE65 y LRAT están involucradas en la ACL. Las mutaciones en ambos genes dan lugar a la incapacidad de una persona para que elabore 11-*cis*-retinal en cantidades adecuadas. De este modo, el 11-*cis*-retinal está ausente o presente en cantidades reducidas. En los individuos con deficiencias en RPE65, los ésteres de retinilo se acumulan en el EPR. Los Individuos con deficiencia de LRAT no son capaces de elaborar los ésteres y posteriormente segregan cualquier exceso de retinoides. Para la ACL, se puede utilizar un derivado de retinal sintético para reemplazar el 11-*cis*-retinal ausente o agotado.

En otro aspecto, el ojo del vertebrado se caracteriza por tener Retinitis Punctata Albesciens. Esta enfermedad es una forma de Retinitis Pigmentosa que presenta una escasez de 11-*cis*-retinal en los bastones. Se puede utilizar un derivado de retinal sintético para sustituir el 11-*cis* retinal ausente o mermado.

En otro aspecto, el ojo del vertebrado se caracteriza por tener Ceguera Nocturna Estacionaria Congénita ("CNEC") o Fundus Albipunctatus. Este grupo de enfermedades se manifiesta por la ceguera nocturna, pero no hay una pérdida progresiva de la visión como en la Retinitis Pigmentosa. Algunas formas de CNEC son debidas a un retraso en el reciclaje del 11-*cis*-retinal. Hasta hace poco se pensaba que el Fundus Albipunctatus era un caso especial de CNEC, donde la apariencia de la retina es anormal con cientos de pequeños puntos blancos que aparecen en la retina. Se ha demostrado recientemente que esta es también una enfermedad progresiva, aunque con un progreso mucho más lento que la Retinitis Pigmentosa. Es causada por un defecto génico que conduce a un retraso en el ciclo del 11-*cis*-retinal. Por lo tanto, se pueden administrar uno o varios derivados de retinal sintéticos para restaurar la función de los fotorreceptores por reposición del retinoide.

En otro aspecto más, el ojo del vertebrado se caracteriza por tener degeneración macular asociada con la edad ("DMAE"). La DMAE puede ser seca o húmeda. En la DMAE, se produce una pérdida de la visión cuando las complicaciones tardías de la enfermedad o bien hacen crecer nuevos vasos sanguíneos debajo de la retina o bien atrofian la retina. Sin pretender estar limitados por ninguna teoría en particular, la producción excesiva de productos de desecho de los fotorreceptores puede sobrecargar el EPR. Esto es debido a un déficit de 11-*cis*-retinal disponible para unirse a opsina. La opsina libre no es un compuesto estable y puede causar espontáneamente el inicio de las reacciones bioquímicas de la cascada visual sin la adición de la luz.

La administración de un derivado de retinal sintético en el ojo del vertebrado puede reducir la deficiencia de 11-*cis*-retinal y sofocar el encendido erróneo espontáneo de la opsina. La administración de un derivado de retinal sintético puede disminuir la producción de productos de desecho y/o reducir la formación de drusas, y reducir o ralentizar la pérdida de visión (p. ej., neovascularización coroidea y/o atrofia coriorretiniana).

En otros aspectos más, el derivado de retinal sintético se administra a un sujeto de edad avanzada, tal como un ser humano. Según se utiliza en la presente memoria, un sujeto humano de edad avanzada tiene normalmente al menos 45, o al menos 50, o al menos 60, o al menos 65 años de edad. El sujeto tiene un ojo envejecido, que se caracteriza por tener una disminución de la visión nocturna y/o la sensibilidad al contraste. La opsina no unida en exceso excita al azar el sistema de transducción visual. Esto crea ruido en el sistema y por lo tanto son necesarios más luz y más contraste para ver bien. La extinción de estas moléculas de opsina libres con un retinal sintético reducirá el inicio erróneo espontáneo y aumentará la relación de la señal con respecto al ruido, mejorando de este modo la visión nocturna y la sensibilidad al contraste.

Los derivados de retinal sintéticos pueden ser administrados a seres humanos o a otros vertebrados no humanos. El derivado de retinal sintético puede ser sustancialmente puro, ya que contiene menos de aproximadamente 5% o menos de aproximadamente 1%, o menos de aproximadamente 0,1%, de otros retinoides. Se puede administrar una combinación de derivados sintéticos de retinal.

Los derivados de retinal sintéticos pueden ser liberados en el ojo por medio de cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, la administración oral, intravenosa, intramuscular o local. Los modos de administración local pueden incluir, por ejemplo, gotas oculares, inyección intraocular o inyección periocular. La inyección periocular típicamente implica la inyección del derivado de retinal sintético en la conjuntiva o la cápsula de Tenon (el tejido fibroso que cubre el ojo). La inyección intraocular típicamente implica la inyección del derivado de retinal sintético en el humor vítreo. La administración puede ser no invasiva, por ejemplo por medio de gotas para los ojos o en forma de dosificación oral.

Los derivados de retinal sintéticos se pueden formular, por ejemplo, en forma de composiciones farmacéuticas para la administración local a los ojos y/o para la administración intravenosa, intramuscular u oral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica no es una formulación tópica. En otras realizaciones, la composición farmacéutica no es una formulación cosmética.

Los derivados de retinal sintéticos se pueden formular para su administración utilizando vehículos farmacéuticamente aceptables, así como mecanismos utilizados rutinariamente en la técnica. Se puede seleccionar un vehículo de acuerdo con la solubilidad del derivado de retinal sintético. Las composiciones farmacéuticas adecuadas incluyen aquellas que son administrables localmente en el ojo, por ejemplo por medio de gotas para los ojos, inyección o similares. En el caso de las gotas para los ojos, la formulación también puede incluir opcionalmente, por ejemplo, agentes oftalmológicamente compatibles tales como agentes de isotonicidad como por ejemplo cloruro de sodio, glicerina concentrada, y similares; agentes tamponadores tales como fosfato de sodio, acetato de sodio, y similares; tensioactivos tales como mono-oleato de polioxietilensorbitán (también conocido como polisorbato 80), estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno, y similares; agentes estabilizadores tales como citrato de sodio, edetato de sodio, y similares; conservantes tales como cloruro de benzalconio, parabenos, y similares; y otros ingredientes. Por ejemplo se pueden emplear conservantes, por ejemplo, a un nivel de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0% en peso/volumen. El pH de la formulación está por lo general dentro del intervalo aceptable para las formulaciones oftalmológicas, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente pH 4 a 8.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas también incluyen aquellas formuladas para inyectables. Por ejemplo, el derivado de retinal sintético se puede proporcionar en una solución salina de calidad para inyectable, en forma de una solución inyectable de liposomas, u otros portadores o vehículos. Las inyecciones intraoculares y perioculares son conocidas por los expertos en la técnica y se describen en numerosas publicaciones, incluyendo, por ejemplo, Ophthalmic Surgery: Principles of Practice, Ed, GL Spaeth, W.B. Sanders Co., Philadelphia, Pa., USA, páginas 85-87 (1990).

También se puede administrar un derivado de retinal sintético en una formulación de liberación con el tiempo, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. El derivado de retinal sintético se puede preparar con uno o varios portadores que protegerán el compuesto de la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden utilizar

polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilen-vinilacetato, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, poli(ácido láctico) y copolímeros de ácido poliláctico ácido poliglicólico (PLG). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica.

- 5 Las formas de dosificación orales adecuadas incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, sobres, o cápsulas de gelatina dura o blanda, metilcelulosa o de otro material adecuado que se disuelve fácilmente en el tracto digestivo. Se pueden utilizar portadores sólidos no tóxicos adecuados, que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. (Véase, p. ej., Remington "Pharmaceutical Sciences", 17 ed., Gennaro (ed.), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania (1985)).

15 Las dosis de los derivados de retinal sintéticos se pueden seleccionar adecuadamente dependiendo de la situación clínica, el estado y la edad del sujeto, la forma de dosificación y similares. En el caso de gotas para los ojos, se puede administrar un derivado de retinal sintético, por ejemplo, desde aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,1 mg, o aproximadamente 1 mg, a aproximadamente 25 mg, a aproximadamente 50 mg, o hasta alrededor de 90 mg por dosis individual. Las gotas para los ojos se pueden administrar una o más veces al día, según sea necesario. En el caso de inyecciones, las dosis adecuadas pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 mg, aproximadamente 0,001 mg, aproximadamente 0,01 mg, o aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg, a aproximadamente 25 mg, a aproximadamente 50 mg, o hasta alrededor de 500 mg del derivado de retinal sintético, una a cuatro veces por semana. En otras realizaciones, se pueden administrar de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 300 mg del derivado de retinal sintético de una a tres a cinco veces por semana.

25 Las dosis orales típicamente pueden variar de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1.000 mg, de una a cuatro veces, o más, por día. Un intervalo de dosificación ilustrativo para la administración oral es de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg de una a tres veces por día.

Los siguientes ejemplos se proporcionan meramente como ilustrativos de los diversos aspectos de la invención y no deberán interpretarse como limitantes de la invención en modo alguno.

30 Ejemplos

Ejemplo 1:

35 El éster de 9-*cis*-retinol restaura el pigmento visual en un modelo de ratón de ACL. Se alimentaron por sonda ratones LRAT -/- con palmitato de todo-*trans*-retinilo, acetato de todo-*trans*-retinilo o acetato de 9-*cis*-retinilo como se indica en la leyenda de la Figura 1. Después del tratamiento, los retinoides se extrajeron del ojo y el hígado, y se analizaron por medio de HPLC. Como se muestra en la Figura 1 izquierda, el tratamiento de los ratones sólo con acetato de 9-*cis*-retinilo, pero no con los análogos de todo-*trans*-retinilo restauraron la presencia de oxima de *sin*-9-*cis*-retinal, indicando la formación del cromóforo y la restauración de la visión en estos ratones. No se observó retención significativa de los retinoides en el hígado, donde LRAT es altamente expresado, lo que indica baja o ninguna toxicidad por retinoides en este modelo animal de ACL humana. El éster de 9-*cis*-retinilo restaura el pigmento visual en aproximadamente 5 horas (Figura 2), mientras que el exceso de retinoide se elimina y se metaboliza (como se ilustra para el 9-*cis*-retinol).

45 *Ejemplo 2:*

La vitamina A y sus derivados pueden ser isomerizados tras la exposición a la luz. Por ejemplo, Rao et al. (Tetrahedron Letters 31:3441-44 (1990)) mostraron que la fotoisomerización del acetato de todo-*trans*-retinol (un derivado de la vitamina A) utilizando una luz UV de longitud de onda amplia podía producir una mezcla de isómeros de acetato de retinol *todo-trans*, 13-*cis*, y 9-*cis*. Sin embargo, estos métodos son generalmente ineficaces y producen pequeñas cantidades de semejante retinoide.

Métodos

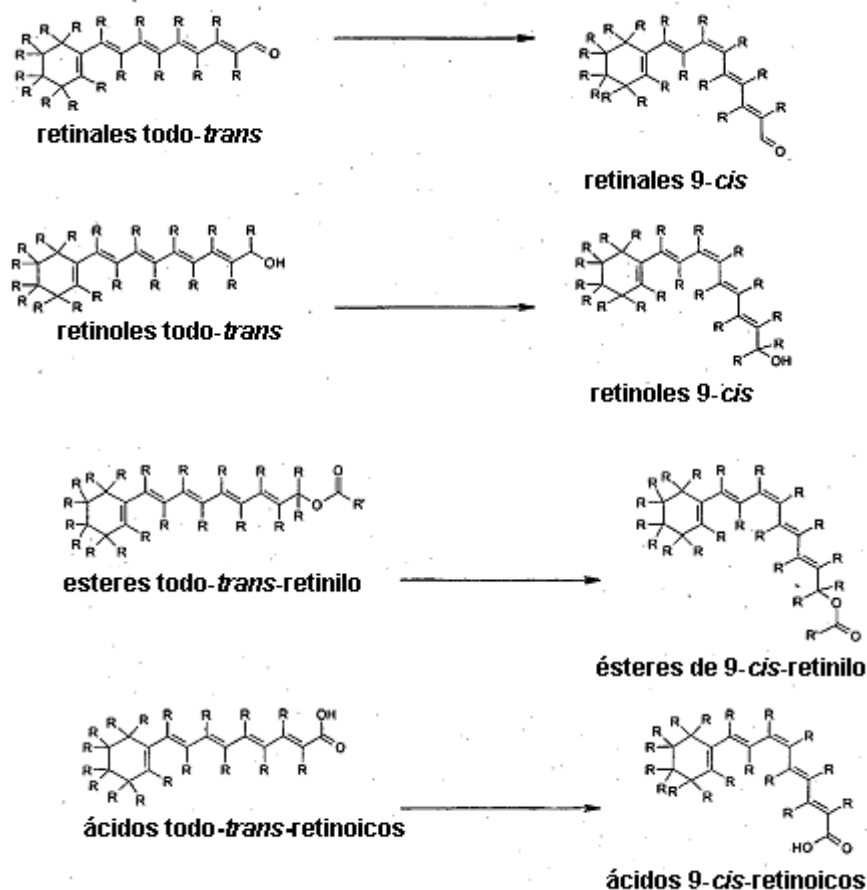
55 Se elaboraron soluciones de retinoides todo-*trans* a concentraciones de 1 mg/ml en metanol. Las soluciones se añaden a una placa de Petri de vidrio y se someten a la luz UV de 365 nm usando un Bio-Rad GS Genelinker con las bombillas comunes sustituidas por bombillas F8T5 de 8 vatios, durante períodos de tiempo variables dependiendo del retinoide diana. Esta longitud de onda es beneficiosa, ya que la luz de longitud de onda más corta destruye rápidamente los retinoides. Después del tratamiento con UV, las soluciones se secan, se disuelven en hexano, y se purifican usando HPLC de fase normal. Los rendimientos de conversión varían para cada derivado todo-*trans*. Los derivados *todo-trans* no isomerizados, o los derivados 13-*cis* y 11-*cis* pueden ser reutilizados en las repeticiones posteriores, aumentando así los rendimientos.

65

Resultados

Producción de acetato de 9-*cis*-retinol a partir de acetato de todo-*trans*-retinilo. Se disolvió acetato de *todo-trans*-retinilo (Sigma Núm. R4632) en metanol a una concentración de 1 mg/ml. La solución se vertió en una placa de Petri de vidrio y se irradió con luz UV de 365 nm, induciendo la isomerización (Figura 3). Dos minutos de irradiación producen una mezcla de isómeros, ~ 25% de acetato de 9-*cis*-retinilo, como se muestra por medio de HPLC (Figura 4).

El siguiente diagrama ilustra algunos otros compuestos que se pueden elaborar con este método.



R es hidrógeno o alquilo inferior que oscilan de C₁ a C₆. R' es R o cualquier alquilo superior, tal como palmitato, oleato, o grupos complejos tales como succinato, fumarato, y otros grupos funcionales.

Ejemplo 3:

Niveles de oximas de 9-*cis*-RAL (medidos en forma de aldehído de *syn*- y 9-*cis*-retinilo) en los ojos de ratones Lrat -/- después de una sola dosis o múltiples dosis de acetato de 9-*cis*-retinilo (9-*cis*-R-Ac). Las dosis de 9-*cis*-R-Ac se administraron a ratones Lrat -/- mediante sonda oral en aceite vegetal (aceite de canola al 100%) en un volumen de 500 µl (2,5 mg/ml). Los ratones pesaban aproximadamente 30-50 g. Después de 3 días, se determinaron los niveles de oximas de 9-*cis*-RAL por medio de HPLC. Brevemente, se llevaron a cabo todos los procedimientos experimentales relacionados con la extracción, la derivatización, y la separación de los retinoides de ojos de ratón disecado como se ha descrito anteriormente. Véanse Van Hooser et al., J. Biol. Chem. 277:19173-182 (2002); Van Hooser et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:8623-28 (2000); Maeda et al., J. Neurochem. 85:944-56 (2003). Todas las reacciones que implicaban retinoides se llevaron a cabo bajo luz roja tenue.

Haciendo referencia a la Figura 5a, se muestra el nivel de 9-*cis*-RAL en ojos de ratón Lrat -/- después de una dosis variable de 9-*cis*-R-Ac. Los picos se identifican por el tiempo de retención y los espectros UV y se comparan con los patrones. El pico de alrededor de 19 minutos fue el resultado de los cambios en la composición del disolvente. El análisis retinoides se realizó en un HP1100 HPLC equipado con un detector de matrices de diodos y el programa HP ChemStation (A.07.01), que permite la identificación de los isómeros de retinoides de acuerdo con su tiempo de retención y sus máximos de absorción específicos. Una columna de fase normal (Beckman Ultrasphere Si 5µ, de 4,6 mm x 250 mm) y un sistema disolvente isocrático de acetato de etilo en hexano al 0,5% (v/v) durante 15 min, seguido de acetato de etilo en hexano al 4% durante 60 min a una velocidad de flujo de 1,4 ml/min (total de 80 min),

con detección a 325 nm permitió la separación parcial de los ésteres de 11-*cis*-retinilo, ésteres de 13-*cis*-retinilo-, y ésteres de todo-*trans*-retinilo a 20°C.

Los niveles de 9-*cis*-RAL por ojo se nivelaron a dosis de aproximadamente 4-6 micromoles. Haciendo referencia a la Figura 5b, se muestra el nivel de 9-*cis*-RAL en ojos de ratón Lrat -/- después de un número y un tamaño variables de dosis de 9-*cis*-R-Ac. Los niveles de 9-*cis*-RAL se acumularon con el tiempo. Los niveles de 9-*cis*-RAL aumentaron de aproximadamente 50 micromoles por ojo a aproximadamente 600 micromoles por ojo. La línea gris representa un nivel máximo de isorrodopsina medido por el nivel de oximas de 9-*cis*-retinal en ojos de ratón Lrat -/- después de 10 alimentaciones por sondas; las líneas discontinuas grises indican la desviación típica. El nivel máximo de isorrodopsina es comparable al nivel de rodopsina en ratones de tipo salvaje (WT).

Ejemplo 4

Los niveles de cromóforo (complejos de opsina/retinal) se midieron en los ojos de los ratones después de la administración de dosis isoformas de retinoides todo-*trans* o succinato de 9-*cis*-retinilo. Se administraron palmitato de todo-*trans*-retinilo, acetato de todo-*trans*-retinilo, todo-*trans*-retinal (aldehído de vitamina A), todo-*trans*-retinol (vitamina A), succinato de todo-*trans*-retinilo y succinato de 9-*cis*-retinilo a ratones Lrat -/- ratones mediante sonda oral. Se administraron cinco miligramos de las isoformas de retinoides o succinato de 9-*cis*-retinilo en aceite de canola al 100% a una concentración de 40 mg/ml. Después de 3 días, los niveles de cromóforos (en forma de oximas de todo-*trans*-retinal u oximas de 9-*cis*-retinal) se determinaron como se ha descrito anteriormente. Véanse Van Hooser et al., J. Biol. Chem. 277:19173-182 (2002); Van Hooser et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:8623-28 (2000); Maeda et al., J. Neurochem. 85:944-56 (2003). Todas las reacciones que implicaban retinoides se llevaron a cabo bajo luz roja tenue.

En referencia a la Figura 6, las isoformas de retinoides todo-*trans* no tuvieron esencialmente ningún efecto sobre la restauración de los niveles de cromóforos. En contraste, la administración de succinato de 9-*cis*-retinol restauró los niveles de cromóforos.

Ejemplo 5

Una comparación de la biodisponibilidad de 9-*cis*-retinaldehído y acetato de 9-*cis*-retinilo liberados oralmente en un modelo LRAT -/-. El 9-*cis*-retinaldehído y el acetato de 9-*cis*-retinilo se administraron a dosis bajas (10 micromoles) y altas (15 micromoles) a ratones LRAT -/-. Se determinaron los niveles de cromóforo (en forma de oximas de 9-*cis*-retinal) como se ha descrito anteriormente. Véanse Van Hooser et al., J. Biol. Chem. 277:19173-182 (2002); Van Hooser et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:8623-28 (2000); Maeda et al., J. Neurochem. 85:944-56 (2003). Todas las reacciones que implicaban retinoides se llevaron a cabo bajo luz roja tenue.

En referencia a la Figura 7, a dosis bajas y altas, la administración de acetato de 9-*cis*-retinilo restaura de manera más eficiente los niveles de cromóforos que el 9-*cis*-retinaldehído. Este efecto es más pronunciado a dosis bajas (10 micromoles). Debido a que la administración de retinoides puede conducir a toxicidad, los pro-fármacos, tales como los ésteres de retinilo (p. ej., acetato de 9-*cis*-retinol) proporcionan una forma biodisponible adecuada para restaurar los niveles de cromóforos al tiempo que reducen los riesgos asociados con la toxicidad de los retinoides.

REIVINDICACIONES

1. Éster de 9-*cis*-retinilo, en el que el sustituyente del éster es un radical carboxilato de un ácido policarboxílico C₃ a C₂₂, con la condición de que el sustituyente del éster no es tartrato.
2. El éster de retinilo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustituyente del éster es un radical carboxilato de un ácido policarboxílico C₃ a C₁₀.
3. El éster de retinilo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el éster de retinilo es un éster de 9-*cis*-retinilo seleccionado entre succinato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, cetoglutarato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo y oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo.
4. El éster de retinilo de la reivindicación 3, que es succinato de 9-*cis*-retinilo.
5. Composición farmacéutica que comprende un derivado de retinal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que la composición se formula para administración local a un ojo de un sujeto humano.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que la composición se formula para administración oral, administración intravenosa, o administración intramuscular, administración de liberación temporal, o administración de liberación controlada o administración profiláctica.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que la composición se formula para inyección.
9. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un trastorno visual que comprende administrar la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8 a un ojo de un mamífero, en la que el derivado sintético de retinal complementa o reemplaza el 11-*cis* retinal endógeno del ojo.
10. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el trastorno visual se selecciona entre Retinitis Pigmentosa (RP), Amaurosis Congénita de Leber (LCA), Retinitis Punctata Albesciens, Ceguera Nocturna Estacionaria Congénita, Fundus Albipunctatus, Degeneración Macular Relacionada con la Edad, pérdida de visión nocturna y sensibilidad de contraste.
11. El éster de retinilo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el éster de 9-*cis*-retinilo se selecciona entre el grupo que consiste en oxalato de 9-*cis*-retinilo, malonato de 9-*cis*-retinilo, succinato de 9-*cis*-retinilo, fumarato de 9-*cis*-retinilo, malato de 9-*cis*-retinilo, glutarato de 9-*cis*-retinilo, adipato de 9-*cis*-retinilo, pimelato de 9-*cis*-retinilo, suberato de 9-*cis*-retinilo, azelato de 9-*cis*-retinilo, sebacato de 9-*cis*-retinilo, citrato de 9-*cis*-retinilo, oxaloacetato de 9-*cis*-retinilo y cetoglutarato de 9-*cis*-retinilo.

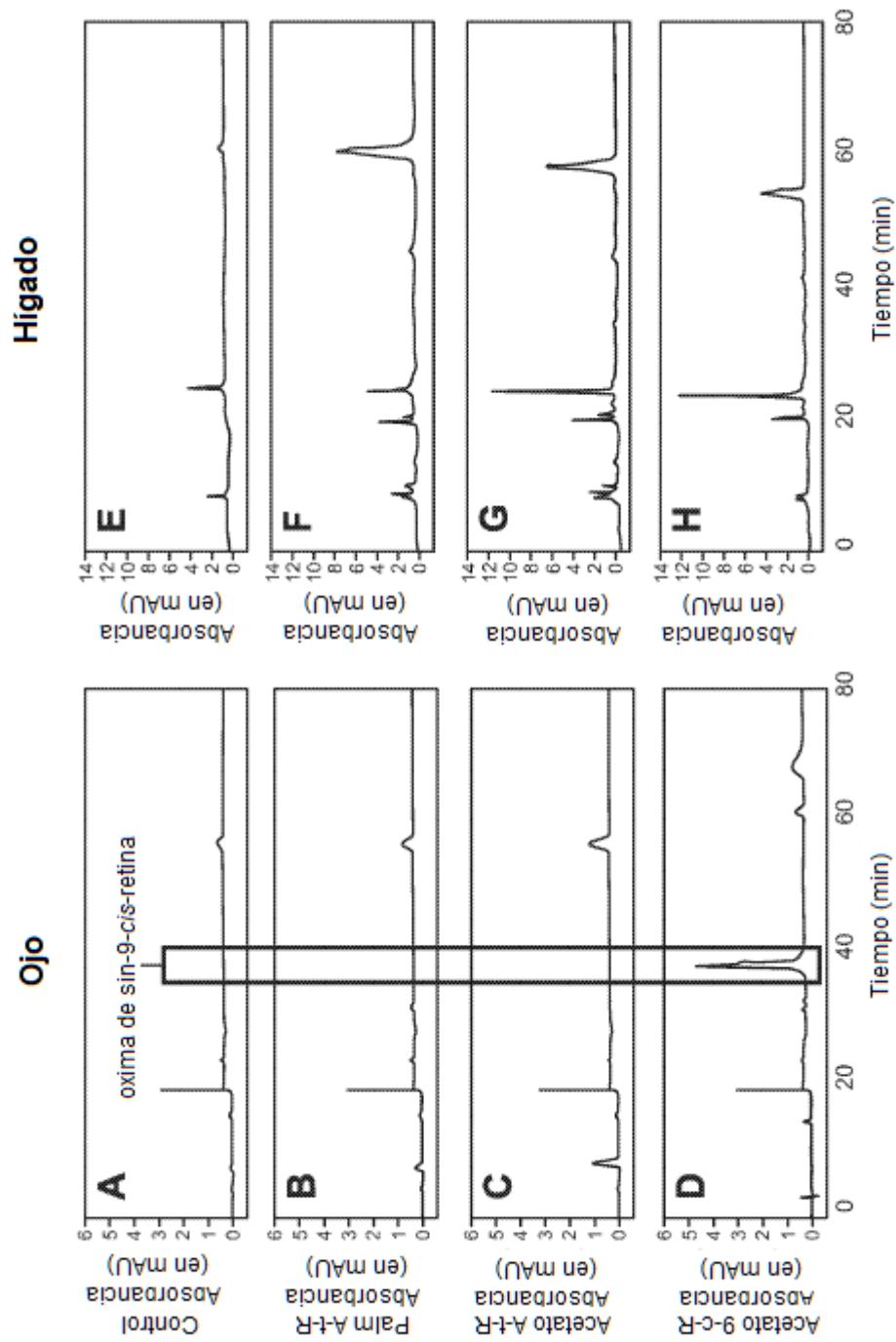


Figura 1

+

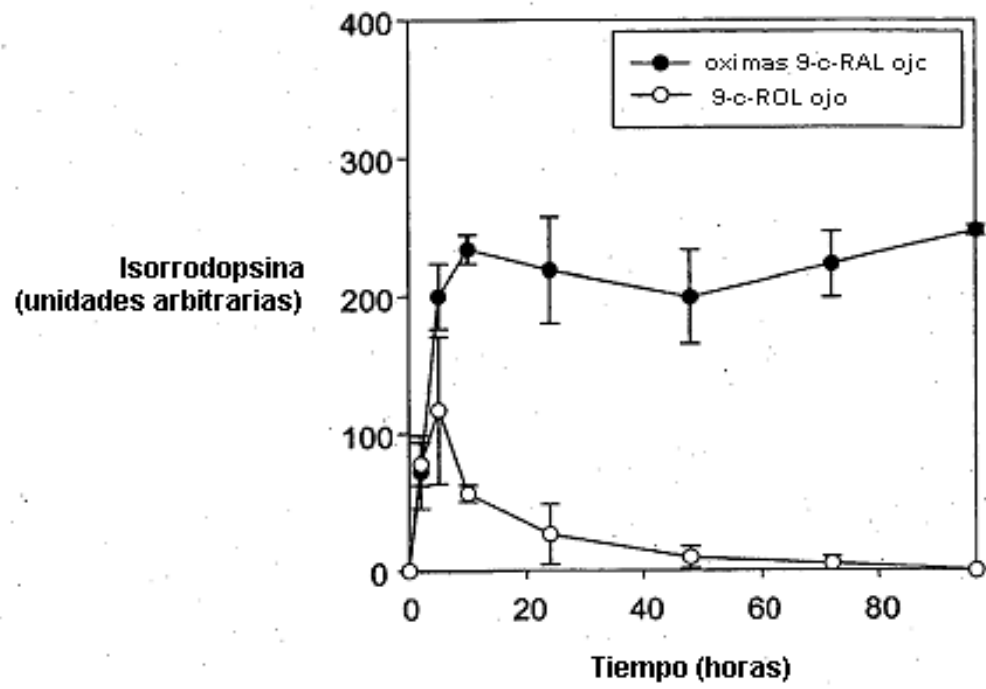


Figura 2

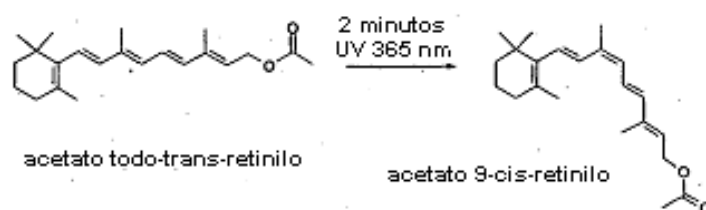


Figura 3

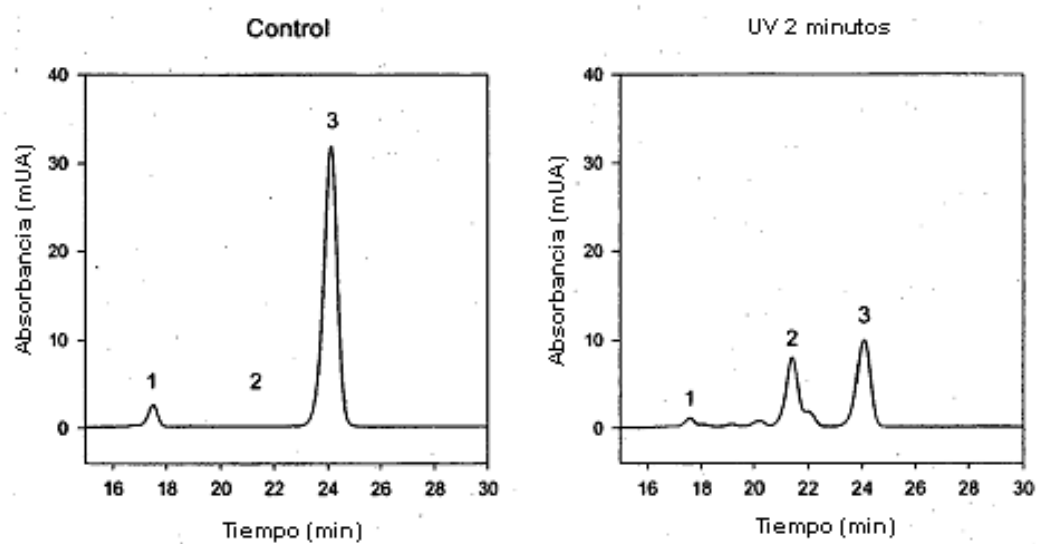


Figura 4

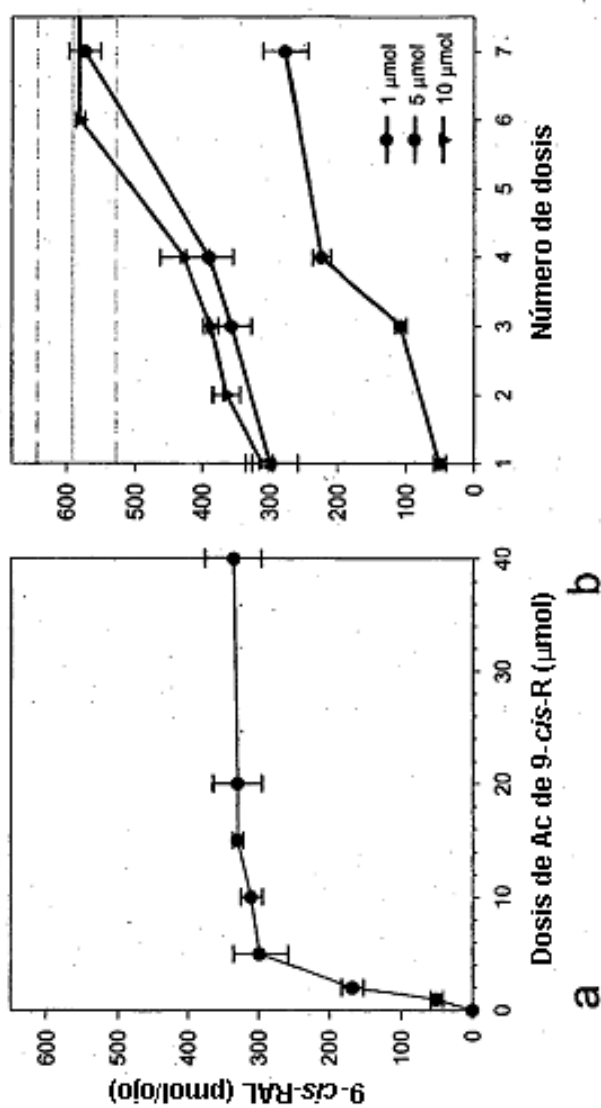
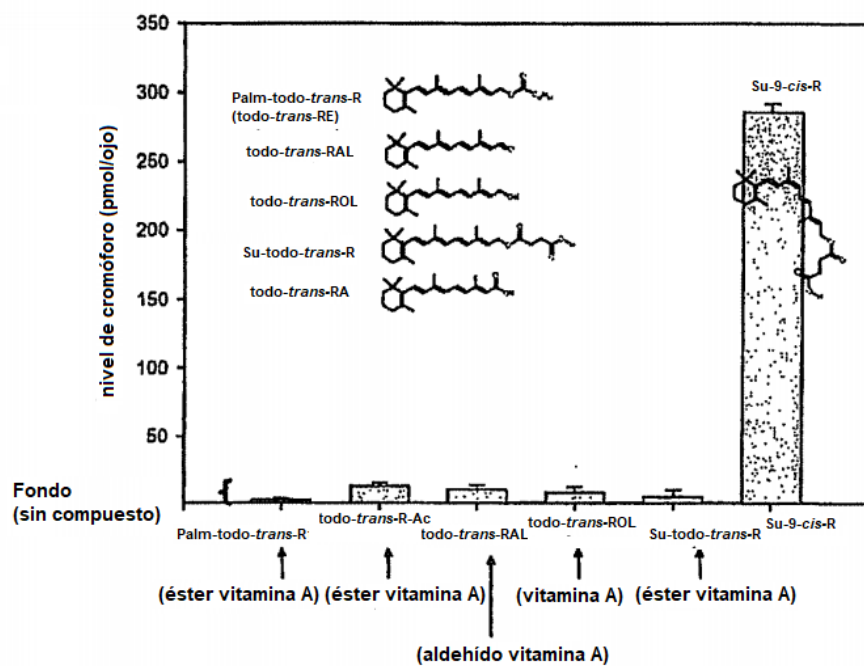


Figura 5

**Figura 6**

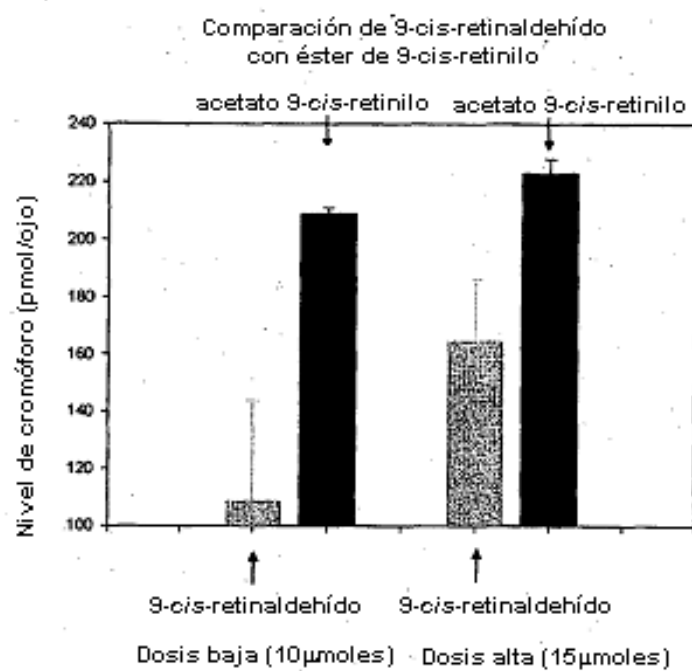


Figura 7