

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 729**

51 Int. Cl.:

A61K 31/14 (2006.01)

A61K 31/46 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2015 PCT/US2015/063084**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16089807**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2015 E 15816590 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3226853**

54 Título: **Modelo animal para ojo seco y métodos de uso de dichos animales**

30 Prioridad:

02.12.2014 US 201462086263 P

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

12.05.2020

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6707, US**

72 Inventor/es:

**YUAN, MING;
HU, YING;
CAO, JINGTAI y
ROMANO, CARMELO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 759 729 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

Modelo animal para ojo seco y métodos de uso de dichos animales

Antecedentes de la divulgación

- 5 La enfermedad del ojo seco (DED), o queratoconjuntivitis sicca (KCS), se describe en el informe de 2007 del Dry Eye Workshop (DEWS) como una "enfermedad multifactorial de las lágrimas y la superficie ocular que produce síntomas de incomodidad, e inestabilidad de la película lagrimal con daño potencial a la superficie ocular que se acompaña de una mayor osmolaridad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular". (Ocular Surf 5(2): 75-92, 2007). Se estima que alrededor de 3.23 millones de mujeres y 1.68 millones de hombres, para un total de
- 10 4.91 millones de estadounidenses, de 50 años o más, tienen ojo seco. Decenas de millones más tienen síntomas menos severos y probablemente una manifestación más episódica de la enfermedad (*Id.*).
- Hay dos subgrupos generalmente reconocidos de ojo seco, a saber, el ojo seco asociado con la deficiencia acuosa/producción reducida de lágrimas, y el ojo seco asociado con el aumento de la evaporación de la película lagrimal ("ojo seco evaporativo").
- 15 Entre el grupo con deficiencia acuosa, hay dos subclases principales: ojo seco con síndrome de Sjögren (SS) y ojo seco sin SS. En el síndrome de Sjögren, las glándulas lagrimales son blanco de un proceso autoinmune sistémico. Las glándulas lagrimales están infiltradas por células T activadas, que causan la muerte de las células acinares y ductulares y la hiposecreción de las lágrimas. Varias enfermedades autoinmunes están asociadas con el síndrome del ojo seco SS, como la artritis reumatoide, la esclerodermia, la polimiositis, el linfoma, la amiloidosis, la hemocromatosis, la sarcoidosis y el lupus eritematoso sistémico (Djalilian AR, et al. Dry eye. En: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. Cornea. 2da ed. Philadelphia. Elsevier Mosby; 2005). El síndrome de ojo no seco de
- 20 Sjögren es una forma de deficiencia acuosa que resulta de la disfunción lagrimal, donde se han excluido las características sistémicas autoinmunes del ojo seco SS. La forma más común de ojo seco no SS es el ojo seco relacionado con la edad (Ocular Surf 5(2): 75-92, 2007).
- El ojo seco evaporativo resulta del aumento de la pérdida de agua de la superficie ocular a pesar de la función secretora lagrimal normal. Sus causas se han categorizado como intrínsecas, como resultado de enfermedades que afectan las estructuras o dinámicas del párpado, o extrínsecas, donde la enfermedad de la superficie ocular ocurre debido a alguna exposición extrínseca, como condiciones ambientales adversas.
- 25 Un estado hormonal alterado (por ejemplo, después de la menopausia) puede conducir al desarrollo o exacerbación del ojo seco. También se sabe que varios otros factores externos causan o contribuyen al ojo seco, como el uso de lentes de contacto, la cirugía láser refractiva, el tabaquismo y las tareas visuales prolongadas, como el uso de la computadora, mirar televisión y la lectura prolongada. El empeoramiento del ojo seco también se asocia con condiciones de baja humedad en entornos de oficina, automóviles con aire acondicionado y clima extremadamente cálido o frío. El ojo seco también puede ser causado por medicamentos como antihistamínicos, antidepresivos, antipsicóticos y diuréticos, que disminuyen la producción de lágrimas (Ocular Surf 5(2): 75-92, 2007).
- 30 Los pacientes con ojo seco presentan inflamación conjuntival manifestada por infiltrados de células T y regulación positiva de CD3, CD4 y CD8, así como los marcadores de activación de linfocitos CD11a y HLA-DR (Stern ME, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 43: 2609-2614 (2002)). Por lo tanto, la patogénesis del ojo seco puede depender de la activación de las células T y la inflamación autoinmune. Las citocinas proinflamatorias, como la interleucina (IL)-1 y las metaloproteinasas de matriz (MMP), también se han implicado en la patogénesis del ojo seco. Se ha encontrado un aumento en las formas proinflamatorias de IL-1 (IL-1 α e IL-1 β maduro) y una disminución del precursor biológicamente inactivo IL-1 β en la película lagrimal de pacientes con ojo seco (Solomon A, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 42: 2283-2292 (2001)).
- 35 Pooja et al. ("An NGF mimetic, MIM-D3, stimulates conjunctival cell glycoconjugate secretion and demonstrates therapeutic efficacy in a rat model of dry eye", Experimental Eye Research, col. 93, no. 4, pages 503-512) evalúa la eficacia de MIM-D3, un peptidomimético de factor de crecimiento nervioso (NGF) de molécula pequeña, como agente terapéutico en ratas con ojo seco inducido por escopolamina.
- 40 Viau et al. ("No consequences of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency on the severity of scopolamine-induced dry eye", Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology, vol. 294, no. 4, pages 547-557) evalúa si una deficiencia dietética en ácidos grasos poliinsaturados n-3 (AGPI) aumenta la gravedad de la patología en un modelo de ojo seco inducido por escopolamina en la rata.
- 45 Beyazyildiz et al. ("Efficacy of Topical Mesenchymal Stem Cell Therapy in the Treatment of Experimental Dry Eye Syndrome Model", Stem Cells International, vol. 2014, Article ID 250230) consideró la eficacia de las células madre mesenquimales (MSC) aplicadas tópicamente en el síndrome del ojo seco (DES) inducido por cloruro de benzalconio (BAC) en ratas.
- 50 Zhang et al. ("Therapeutic effects of topical doxycycline in a benzalkonium chloride-induced mouse dry eye model", Investigative Ophthalmology & Visual Science, vol. 55, no. 5, pages 2963-2974) investigó los efectos terapéuticos y

los mecanismos subyacentes de la doxiciclina tópica en un modelo de ojo seco de ratón inducido por cloruro de benzalconio (BAC).

5 Lin et al. ("Serine protease inhibitor A3K suppressed the formation of ocular surface squamous metaplasia in a mouse model of experimental dry eye", Investigative Ophthalmology & Visual Science, vol. 55, no. 9, pages 5813-5820) investigó los efectos y posibles mecanismos del inhibidor de la serina proteasa A3K (SERPINA3K) sobre la formación de metaplasia escamosa de la superficie ocular en un modelo de ojo seco de ratón inducido por cloruro de benzalconio tópico (BAC).

Breve resumen de la divulgación

10 Esta descripción se refiere a un modelo animal de enfermedad del ojo seco. Aquí se describen métodos para inducir la enfermedad del ojo seco en un animal roedor que refleja la fisiopatología de la enfermedad del ojo seco (DED) en humanos. El animal roedor puede ser un ratón o una rata. Además, se describen métodos de uso de animales roedores con enfermedad ocular seca inducida, por ejemplo, en la prueba de agentes candidatos para el tratamiento de DED.

15 Los métodos descritos aquí inducen DED mediante la administración de escopolamina y cloruro de benzalconio (BAC) a un animal roedor.

20 La escopolamina puede administrarse por diversos medios, incluida la administración sistémica, como inyección, parche transdérmico e implantación de una bomba en el roedor. Por ejemplo, la escopolamina se puede administrar mediante la implantación de una bomba para proporcionar una infusión a una concentración de 0.4-4.0 mg por 20 g de peso corporal por día. El cloruro de benzalconio se puede administrar tópicamente a la superficie ocular del roedor. Por ejemplo, BAC se puede administrar a una concentración de 0.05-0.4%, una a cuatro veces por día.

25 La condición del ojo seco se caracteriza en animales roedores tratados con escopolamina y BAC por la producción reducida de lágrimas y el aumento de la irritación ocular, en relación con los niveles de control (por ejemplo, un ojo en roedores no tratados). En un ejemplo, la producción de lágrimas reducida se mide detectando una reducción en la producción de lágrimas en relación con los niveles de control. En otro ejemplo, el aumento de la irritación ocular se mide detectando, dentro del ojo, uno o más de: un aumento en las células inflamatorias, un aumento en las citocinas inflamatorias en el ojo, o un aumento en la tinción de fluoresceína, en relación con los niveles de control. Por "reducción" y "aumento", se entiende una diferencia de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100% o más, en relación con los niveles de control.

30 Tras la administración de escopolamina y BAC a un animal roedor, la condición de ojo seco es evidente dentro de los días de la administración, por ejemplo, dentro de los 5, 7, 10, 14, 21 o 28 días de la administración. De acuerdo con los métodos descritos en este documento, la administración de escopolamina y BAC puede continuar durante una o más semanas, como dos, tres o cuatro semanas, y hasta dos meses o más si se desea.

35 Además, se describen en el presente documento métodos para probar la eficacia de un agente candidato para el tratamiento del ojo seco. Los métodos implican proporcionar un animal roedor, administrar escopolamina y cloruro de benzalconio al animal roedor para inducir el ojo seco en el animal roedor, administrar un agente candidato al animal roedor con ojo seco, y determinar si el agente candidato es eficaz en el tratamiento del ojo seco en el animal roedor.

40 En algunas realizaciones, el agente candidato se administra en un punto temporal después del inicio de la administración de escopolamina y cloruro de benzalconio, de modo que se pueda evaluar la eficacia del agente candidato para mejorar los síntomas o afecciones de DED. Por ejemplo, el agente candidato puede administrarse 3, 4, 5, 6, 7, 14 o 28 días después del comienzo de la administración de escopolamina y cloruro de benzalconio. La eficacia del agente candidato se puede determinar midiendo un aumento en la producción de lágrimas y/o una disminución en la irritación ocular, en relación con los niveles de control (por ejemplo, ojos en animales que reciben escopolamina y cloruro de benzalconio, pero no reciben el agente candidato).

45 En algunas realizaciones, el agente candidato se administra simultáneamente con el inicio de la administración de escopolamina y cloruro de benzalconio. En estas realizaciones, se puede evaluar la capacidad de un agente candidato para prevenir la DED, por ejemplo, para prevenir o retrasar la aparición, o limitar el desarrollo del ojo seco. La eficacia del agente candidato puede determinarse midiendo la capacidad del agente candidato para limitar o eliminar la reducción en la producción de lágrimas, y/o limitar o eliminar el aumento de la irritación ocular, en relación con los niveles de control (por ejemplo, ojos en animales que reciben escopolamina y cloruro de benzalconio pero que no reciben el agente candidato).

50 El agente candidato puede administrarse por vía tópica o sistémica, lo que puede depender de la naturaleza del agente candidato. Los ejemplos de administración tópica incluyen la administración del agente candidato en forma de gota, aerosol o gel en el ojo o la nariz del animal roedor. Los ejemplos de administración sistémica incluyen administración oral, inyección o infusión.

55 Breve descripción de las figuras

Figuras 1A-1B. (A), representa la medición de la producción de lágrimas antes del inicio del tratamiento (día -3, línea de base) o en los días 7, 14, 21 y 28 después del inicio del tratamiento; cada día, las cinco barras representan medidas de izquierda a derecha para: tratamientos naive, simulado, BAC, Scop. y BAC+Scop. La producción de lágrimas disminuye significativamente durante cuatro semanas de administración de escopolamina (Scop) y la administración de cloruro de benzalconio más escopolamina (BAC+Scop), en relación con los controles o el tratamiento con BAC solo. *** = $p < 0.001$. (B), representa la medición de la puntuación de la mancha de fluoresceína corneal antes del inicio del tratamiento (día -3, línea de base) o en los días 7, 14, 21 y 28 después del inicio del tratamiento; una cada día, las cinco barras representan medidas de izquierda a derecha para: tratamientos naive, simulado, BAC, Scop. y BAC+Scop. La tinción de fluoresceína corneal aumenta significativamente durante cuatro semanas de administración de BAC+Scop, en relación con los controles y con respecto al tratamiento con BAC o Scop solo. **** = $p < 0.0001$.

Figuras 2A-2D. (A), la angiogénesis corneal, medida por el aumento de la tinción de células CD31+, aumenta en los ojos tratados con BAC+Scop, en relación con los controles y con respecto al tratamiento con BAC o Scop solo. (B), la longitud de la esquelización de los vasos sanguíneos corneales (vasos sanguíneos nuevos) aumenta dramáticamente en cuatro semanas de tratamiento en los ojos tratados con BAC+Scop, en relación con los controles y en relación con el tratamiento con BAC o Scop solo. (C), la linfangiogénesis, medida por el aumento de la tinción de células LYVE1, aumenta en los ojos tratados con BAC+Scop, en relación con los controles y con respecto al tratamiento con BAC o Scop solo. (D), la longitud de la esquelización de los vasos linfáticos corneales aumenta drásticamente en cuatro semanas de tratamiento en los ojos tratados con BAC+Scop, en relación con los controles y con respecto al tratamiento con BAC o Scop solo.

Figura 3 Citometría de flujo de glándulas lagrimales extraorbitales. El porcentaje de células CD45+ aumenta en las células tratadas con Scop, BAC y Scop+BAC, en relación con los controles.

Descripción detallada de la divulgación

Aquí se describen métodos para inducir la enfermedad del ojo seco en un animal que refleja la fisiopatología de la enfermedad del ojo seco (DED) en humanos. Además, se describen métodos de uso de los animales roedores con enfermedad ocular seca inducida en la prueba de agentes candidatos para el tratamiento de la DED.

La enfermedad del ojo seco (DED), también conocida como síndrome del ojo seco (DES) o queratoconjuntivitis seca (KCS), es una afección caracterizada fisiológicamente por uno o más, dos o más, tres o más, o todos: reducción de la producción de lágrimas, aumento de la evaporación de la película lagrimal, inflamación ocular, aumento de la osmolaridad (contenido de sal) de las lágrimas y daño a la superficie ocular. Los síntomas de DED incluyen molestias oculares, trastornos visuales e inestabilidad de la película lagrimal.

Aquí se describen métodos para inducir la enfermedad del ojo seco en un animal roedor. Los métodos implican la administración de escopolamina, un agente anticolinérgico y cloruro de benzalconio (BAC), un irritante ocular, a un animal roedor, en una cantidad y por un tiempo suficiente para inducir la enfermedad del ojo seco en el animal. El trastorno ocular resultante muestra múltiples características de la DED humana.

Al desarrollar el enfoque descrito aquí, los inventores pudieron inducir la enfermedad del ojo seco en animales roedores que se parece mucho a la enfermedad clínica humana. Por ejemplo, las condiciones de ojo seco inducidas con los métodos descritos son más fáciles de realizar y pueden durar semanas. Además, los modelos animales producidos por los métodos descritos muestran tanto la inflamación ocular como la deficiencia de lágrimas que se encuentran comúnmente en la enfermedad del ojo seco humano. Por lo tanto, este modelo permite el estudio de los cambios fisiopatológicos en el ojo seco y las pruebas de candidatos a fármacos terapéuticos para el tratamiento de la DED.

Crear enfermedad del ojo seco en un animal

En un primer paso del proceso, la escopolamina se administra como un agente anticolinérgico, y el cloruro de benzalconio (BAC) se administra como un irritante ocular, a un animal roedor, como un ratón o una rata.

Un agente anticolinérgico es una sustancia que bloquea el neurotransmisor acetilcolina en el sistema nervioso central y/o periférico. Los ejemplos de agentes anticolinérgicos incluyen, por ejemplo, escopolamina, clorhidrato de escopolamina, metobromuro de escopolamina, atropina, nitrato de metilo de atropina y sulfato de atropina. En los métodos descritos aquí, el agente anticolinérgico es escopolamina o clorhidrato de escopolamina.

En los métodos divulgados, la escopolamina se administra sistémicamente. Los métodos para la administración sistémica incluyen inyección, parche transdérmico e implantación de una bomba, como una bomba osmótica que permite la dosificación continua de animales de laboratorio. Tales métodos para la administración sistémica en modelos animales son conocidos en la técnica. En realizaciones específicas, la escopolamina se administra mediante minibomba osmótica. Las minibombas osmóticas adecuadas incluyen, por ejemplo, las bombas osmóticas ALZET (Durect Corporation, Cupertino, California).

- 5 Para implantar la bomba, el roedor es anestesiado y equipado con la bomba por vía subcutánea. La bomba proporciona una cantidad controlada de escopolamina. Las concentraciones ejemplares de escopolamina incluyen 0.1-4.0 mg por 20 g de peso corporal por día, 0.5-3.5 mg por 20 g de peso corporal por día, 1.0-3.0 mg por 20 g de peso corporal por día, o aproximadamente 2.0 mg por 20 g de peso corporal por día. La escopolamina se administra durante varios días o varias semanas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 semanas o más.
- Un irritante ocular es una sustancia que produce irritación en el ojo. Los ejemplos de irritantes oculares incluyen tensoactivos, conservantes, alérgenos, partículas finas y agentes desecantes o condiciones ambientales. En los métodos descritos aquí, el irritante ocular es el cloruro de benzalconio (BAC).
- 10 En los métodos descritos, BAC se administra tópicamente a la superficie ocular. BAC puede administrarse a una concentración de 0.05-1.0%, y en realizaciones específicas, 0.1-0.2%, en una dosis de 0.5-2.0 µl por dosis, por ejemplo 1 µl por dosis. La administración puede ser de una a cuatro veces por día, por ejemplo, dos veces al día, de uno a tres días por semana. En algunas realizaciones, la administración se realiza dos veces al día durante dos días por semana. La administración de BAC se puede realizar durante una o más semanas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 semanas o más.
- 15 Evaluación de condiciones de ojo seco en animales modelo
- La enfermedad del ojo seco se confirma en el animal modelo al detectar una reducción en la producción de lágrimas y un aumento en la irritación ocular, en relación con los niveles de control. El ojo seco puede confirmarse adicionalmente detectando un aumento en la angiogénesis y/o linfangiogénesis, en relación con los niveles de control.
- 20 A lo largo de esta descripción, los niveles de control representan los niveles en un ojo de animal roedor no tratado. Cuando una evaluación se dirige a la eficacia de un agente que se aplica sistémicamente, un ojo no tratado es un ojo en un animal roedor no tratado. Un animal no tratado puede ser naïve (no recibe esencialmente ningún tratamiento) o un animal operado simulado (que recibe una bomba implantada que no administra un agente, o que administra un placebo, como solución salina, al animal o recibe una cirugía sin la implantación real de una bomba).
- 25 Cuando un agente se aplica tópicamente al ojo y no sistémicamente, un control también puede ser el ojo no tratado en un animal con un ojo tratado. En el contexto de evaluar la inducción de condiciones de ojo seco mediante la administración de escopolamina y BAC, los niveles de control son niveles en ojos de animales no tratados.
- La producción de lágrimas reducida se identifica como una reducción en la producción de lágrimas de al menos 10%, 20%, 30%, 40% o 50% en relación con los niveles de control. Los métodos para medir la producción de 30 lágrimas incluyen la prueba del hilo rojo de fenol (PRT) y la prueba de Schirmer. En la prueba PRT, los animales se sujetan sin anestesia y se coloca un hilo cargado de rojo fenol (como ZONE-QUICK, FCI Ophthalmics, Pembroke, MA) se coloca en el canto medial o lateral (esquina interna o externa del ojo), o en contacto con el saco conjuntival o lagrimal, durante 20 segundos para medir la producción de lágrimas. La cantidad de hilo que se vuelve rojo (como resultado del cambio en el pH de la humectación por desgarros alcalinos) se mide en milímetros. El procedimiento se puede repetir en el otro ojo para obtener 2 medidas para cada ratón. La prueba de Schirmer utiliza tiras de papel 35 para medir la producción de lágrimas. La prueba consiste en colocar una pequeña tira de papel de filtro dentro del párpado inferior (saco conjuntival). La tira se mantiene en su lugar durante varios minutos. Luego se retira el papel y se mide la cantidad de humedad en mm.
- 40 El aumento de la irritación ocular se identifica mediante la detección, dentro del ojo, de uno o más de: un aumento en las células inflamatorias, un aumento en las citocinas inflamatorias en el ojo, o un aumento en la tinción de fluoresceína, en relación con los niveles de control.
- Un aumento en las células inflamatorias es un aumento de al menos 10%, 20%, 30%, 40% o 50% de uno o más tipos de células inflamatorias/inmunes, en relación con los niveles de control. Los tipos de células inflamatorias/inmunes incluyen células mieloides (incluidos neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos) y linfocitos 45 (incluidas las células T y las células B). Las células inflamatorias pueden detectarse y medirse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Con mayor frecuencia, las células inflamatorias se miden determinando la presencia/abundancia de células con marcadores de identificación de la superficie celular. Por ejemplo, tanto las células mieloides como los linfocitos son CD45+ y, por lo tanto, este marcador puede usarse para identificar la presencia de células inflamatorias en relación con las células no inflamatorias. Los marcadores específicos de linfocitos incluyen CD3 (identificación de células T), CD4 (identificación de células T auxiliares), CD8 (identificación 50 de células T citotóxicas) y B220 o CD19 (identificación de células B). En la técnica se conocen marcadores adicionales de la superficie celular, al igual que los anticuerpos y otros agentes que detectan estos marcadores. Los anticuerpos que detectan estos marcadores pueden usarse para identificar células inflamatorias, por ejemplo, mediante examen histológico del tejido corneal y tinción de anticuerpos de secciones de tejido. Los anticuerpos que detectan estos marcadores también se pueden usar aplicando los anticuerpos a una población de células para teñir la expresión de marcadores específicos y procesando las células mediante citometría de flujo para cuantificar las células que expresan los marcadores.
- 55

- 5 Un aumento en las citocinas inflamatorias es un aumento de al menos 10%, 20%, 30%, 40% o 50% de uno o más tipos de citocinas inflamatorias, en relación con los niveles de control. Las citocinas inflamatorias incluyen interleucinas (IL) como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, factores de necrosis tumoral (TNF) como TNF- α , TNF- β , TGF- β (factor de crecimiento transformante- β), CXCL9 e interferones (IFN) como IFN- γ . Los métodos para medir las citocinas inflamatorias incluyen inmunoensayos, como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), que utiliza anticuerpos u otros agentes que detectan citocinas para identificar y cuantificar las citocinas en una muestra.
- 10 Un aumento en la tinción con fluoresceína es un puntaje mayor de 5, 8, 10 o 12, usando la puntuación del Instituto Nacional del Ojo (NEI). Para la tinción con fluoresceína, la fluoresceína de sodio se aplica a la superficie ocular de un animal, típicamente sin sedación. Varios minutos después de la aplicación, la tinción de fluoresceína corneal se puntúa bajo un microscopio usando una luz azul. Las irregularidades en el ojo, como las abrasiones y la inflamación, se hace fluorescente con mayor intensidad en relación con el tejido corneal sano. La fluorescencia se califica utilizando los estándares de puntuación del Instituto Nacional del Ojo (NEI). En la puntuación NEI, los cinco sectores de la córnea (central, superior, inferior, nasal y temporal) se puntúan individualmente en una escala de 0-3 para fluorescencia, con 0 que indica que no hay tinción y 3 que indica una tinción extensa, con una puntuación máxima de 15 por ojo. Si se utiliza un estándar de puntuación diferente o una técnica de fluorescencia, el aumento en la tinción de fluoresceína se identificaría como un aumento de al menos 10%, 20%, 30%, 40% o 50% en fluorescencia, en relación con los niveles de control.
- 15 Las medidas de angiogénesis corneal y/o linfangiogénesis pueden confirmar aún más el ojo seco. Para estudiar la angiogénesis y la linfangiogénesis, el animal se sacrifica y la córnea se disecciona e incuba con agentes que identifican la formación de nuevos vasos linfáticos, como los anticuerpos contra el receptor de hialuronano endotelial del vaso linfático 1 (LYVE1), o agentes que identifican la formación de nuevos vasos sanguíneos, como los anticuerpos contra CD31, un marcador de células precursoras endoteliales. La identificación de regiones de crecimiento de vasos sanguíneos o linfáticos nuevos se puede usar como un indicador adicional del deterioro de las condiciones oculares y el desarrollo del ojo seco.
- 20 Prueba de agentes candidatos para la enfermedad del ojo seco
- 25 Los roedores descritos (ratas y ratones) son útiles para el estudio de DED y las pruebas de agentes candidatos para el tratamiento del ojo seco.
- 30 Por consiguiente, en el presente documento se describen métodos para probar la eficacia de un agente candidato para el tratamiento del ojo seco, que implica administrar un agente candidato a un animal con DED inducida por los métodos descritos, y probar la capacidad del candidato para tratar la DED.
- Por "tratamiento" se entiende mejorar los síntomas o afecciones de la DED, o prevenir la DED (por ejemplo, prevenir o retrasar la aparición o limitar el desarrollo de la DED).
- 35 Los términos "agente de prueba" y "agente candidato" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier agente contemplado para el tratamiento del ojo seco. El agente puede ser una molécula de ácido nucleico recombinante, modificada o natural; un péptido sintético, modificado o natural; un polipéptido sintético, modificado o natural, que incluye anticuerpos; o un compuesto orgánico o inorgánico, que incluye moléculas pequeñas. El término "molécula pequeña" se refiere a compuestos que tienen una masa molecular de menos de 3000 Daltons, preferiblemente menos de 2000 o 1500, más preferiblemente menos de 1000 u 800 Daltons.
- 40 El agente de prueba a evaluar puede administrarse al animal por vía tópica o sistémica. Por ejemplo, el agente puede administrarse en forma de una gota para los ojos o un aerosol intranasal. Alternativamente, el agente puede administrarse por vía oral o parenteral y, si se administra por vía parenteral, puede estar en forma de solución, suspensión, pomada, inyección, supositorio y similares. La dosis adecuada del agente candidato se puede decidir en función del peso corporal del animal y la vía de administración. Las condiciones para la administración, como el momento y el número de veces de esta, también se deciden dependiendo del agente a utilizar.
- 45 Administración de un agente candidato al inicio de la inducción de DED
- En una realización, el agente candidato se administra coincidente con el inicio de la inducción de DED. En algunas realizaciones, los conjuntos de animales de roedores a analizar se asignan al azar a los siguientes grupos: naive (no tratado), simulado (administración sistémica de solución salina, implantación de la bomba sin la implantación real de una bomba), cloruro de benzalconio más escopolamina (BAC más Scop), agente de prueba solo o agente de prueba más BAC más Scop. Los animales en los grupos de agentes de prueba reciben el agente candidato coincidente con el inicio de la inducción del ojo seco, es decir, comenzando el mismo día o durante la misma semana en que comienza la inducción de DED. Todos los tratamientos se realizan durante al menos una, dos, tres o cuatro semanas. La producción de lágrimas y la tinción de fluoresceína corneal se miden en los días 7, 14, 21 y 28. En el día 28, los animales se sacrifican y la glándula lagrimal y la córnea extraorbitales se pueden cosechar para su posterior estudio.
- 55

5 La capacidad del agente candidato para prevenir, retrasar la aparición o limitar el desarrollo de DED se determina detectando la capacidad del agente candidato para mantener la producción de lágrimas y/o prevenir o limitar la irritación ocular, a niveles similares a los niveles de control. En este contexto, los niveles de control son niveles de un ojo no tratado (es decir, ojo sin el tratamiento del agente candidato), que puede incluir un ojo en animales que reciben escopolamina y cloruro de benzalconio pero que no reciben el agente candidato, o uno de los ojos en un animal que recibe escopolamina y cloruro de benzalconio, así como el agente candidato en el que el agente candidato se aplica tópicamente al otro ojo del mismo animal.

10 En una realización, los animales que reciben el agente de prueba más BAC más Scop no desarrollan DED, es decir, la producción de lágrimas se mantiene en o dentro del 5%, 10% o 15% de los niveles de control durante todo el estudio, y/o niveles de inflamación ocular, medidos por los niveles de células inflamatorias, Los niveles de citocinas inflamatorias en el ojo y/o la puntuación de tinción de fluoresceína se mantienen en o dentro del 5%, 10% o 15% de los niveles de control, a lo largo del estudio.

15 En otra realización, los animales que reciben el agente de prueba más BAC más Scop muestran un retraso en el inicio de los síntomas de DED, es decir, hay un retraso en el desarrollo de una producción reducida de lágrimas y/o irritación ocular en una, dos o tres semanas, en relación con los animales que reciben BAC más Scop, pero no reciben el agente candidato.

20 En otra realización, los animales que reciben el agente de prueba más BAC más Scop desarrollan síntomas de DED más leves, es decir, se produce una producción reducida de lágrimas y/o irritación ocular en estos animales, pero la producción reducida de lágrimas y/o irritación ocular ocurre a niveles intermedios entre niveles en animales sin recibir tratamiento inductor de DED (por ejemplo, animales naive) y niveles observados en animales que reciben BAC más Scop pero que no reciben el agente de prueba.

Administración de un agente candidato posterior a la inducción de DED

25 En otra realización, el agente candidato se administra después del comienzo de la inducción de DED. En algunas realizaciones, a los animales en los grupos de agentes de prueba se les administra el agente candidato comenzando una o dos semanas después de que comience la inducción del ojo seco, es decir, entre los días 7-14 después del comienzo de la inducción del ojo seco. El agente de prueba se administra durante una a tres semanas. La producción de lágrimas y la tinción de fluoresceína corneal se miden los días 7, 14, 21 y 28 desde el inicio de la inducción del ojo seco. El día 28, los animales son sacrificados y la glándula lagrimal extraorbitaria y la córnea pueden ser cosechadas para su posterior estudio.

30 La capacidad del agente candidato para tratar la DED se determina detectando un aumento en la producción de lágrimas y/o una disminución de la irritación ocular en animales que reciben el agente candidato y BAC más Scop, en relación con los niveles de control que, en este contexto, pueden ser niveles en ojos de animales que reciben BAC más Scop pero que no reciben el agente candidato.

Ejemplos

35 Ejemplo 1. Crear condiciones de ojo seco en un animal.

Animales. Todos los procedimientos relacionados con los animales fueron revisados y aprobados por el Regeneron IACUC, y se llevaron a cabo de conformidad con la Declaración de ARVO para el uso de animales en la investigación oftálmica y de la visión. Se adquirieron ratones adultos C57BL/6 (8-10 semanas de edad) de Taconic Biosciences (Germantown, NY).

40 Inducción del modelo de ojo seco: 27 ratones adultos C57BL/6 machos fueron asignados al azar a naive (no tratado), simulado (que recibieron una cirugía equivalente a la cirugía para la implantación de la bomba, pero sin implantación real de la bomba y sin tratamiento con escopolamina o BAC), grupos de cloruro de benzalconio (BAC), escopolamina (Scop) o BAC más Scop.

45 Implantación de la bomba de escopolamina. Para el grupo Scop, a los ratones se les implantó por vía subcutánea una bomba osmótica llena de Scop (2 mg/20 g de peso corporal/día) que duró 4 semanas. Los ratones fueron anestesiados con ketamina (120 mg/kg, IP) y xilazina (5 mg/kg, IP). Utilizando una técnica microquirúrgica aséptica y un microscopio quirúrgico, se colocó una mini bomba osmótica debajo de la piel de la espalda, luego se suturó la piel y se aplicó ungüento oftálmico de eritromicina a la herida para prevenir la infección.

50 Tratamiento con cloruro de benzalconio. Para el tratamiento con BAC, se administró 1 µl de 0.1-0.2% de BAC por vía tópica en la superficie ocular del ojo derecho, dos veces al día, 2 días por semana, durante cuatro semanas.

55 Medición de la producción de lágrimas y puntuación de tinción de fluoresceína corneal. La producción de lágrimas y la tinción con fluoresceína corneal se realizaron una vez por semana, los días 7, 14, 21 y 28. Para la medición de la producción de lágrimas, con el animal sujeto, se colocó un hilo rojo de fenol en el saco temporal del ojo (sin tocar la córnea) y se mantuvo en su lugar durante 1 minuto. La porción húmeda del hilo se escaló por mm como producción de lágrimas. Para la tinción con fluoresceína, se pusieron 0,5 µl de fluoresceína sódica al 2% sobre la superficie

- ocular. Cinco minutos después de la aplicación, la tinción de fluoresceína corneal se calificó bajo un microscopio utilizando los estándares de puntuación del Instituto Nacional del Ojo (NEI). Para la puntuación, la córnea se divide en cinco sectores (central, superior, inferior, nasal y temporal), cada uno de los cuales se puntúa en una escala de 0-3 para fluorescencia, con 0 que indica que no hay tinción y 3 que indica una tinción extensa, con una puntuación máxima de 15 por ojo.
- 5
- Cuantificación de angiogénesis corneal, linfangiogénesis e infiltración de glándulas lagrimales. El día 28 después de la inducción del ojo seco, bajo anestesia con ketamina profunda (120 mg/kg, IP) y xilazina (5 mg/kg, IP), se recolectaron globos oculares en paraformaldehído (PFA) al 4% para estudios de angiogénesis corneal y linfangiogénesis. Las glándulas lagrimales extraorbitales se cosecharon para citometría de flujo, para verificar la infiltración de células inmunes.
- 10
- Análisis histológico La córnea se diseccionó de los globos oculares, se lavó en PBS, se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente, con 10% de suero de burro normal y 1% de Triton X-100 en PBS para bloquear sitios no específicos de anticuerpos. Luego, las muestras se lavaron en PBS, se incubaron con un cóctel de anticuerpos contra el receptor de hialuronano endotelial del vaso linfático 1 (LYVE1) (Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY) a 1:1000, y anticuerpos contra CD31 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a 1:100 a 4°C durante la noche. Luego, las muestras se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron con colorante conjugado con anticuerpos secundarios, AlexaFluor 488 burro anti rata IgG (H+L) 1:100 (Life Technologies, A21208, Graceland, NY) y AlexaFluor 594 burro anti rata IgG (H+L) 1:400 (Life Technologies, A21207) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, las muestras se lavaron en PBS y se montaron sobre portaobjetos de vidrio. Las imágenes de sangre teñida y vasos linfáticos se capturaron usando una cámara digital RT SE Spot conectada a un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i). Se utilizó software de imagen para el análisis de imágenes.
- 15
- 20
- Citometría de flujo. Las glándulas lagrimales extraorbitales se colocaron en PBS (Life Technologies) con solución de suero bovino fetal al 3% (FBS) (Life Technologies) después de la disección. Las glándulas se disociaron con el programa disociador suave MACS (Miltenyi Biotech, San Diego, CA), spleen-04. La suspensión celular se filtró a través de un filtro de 70 μ m (Miltenyi Biotech, San Diego, CA) para eliminar los restos de tejido. Las células se lavaron una vez con tampón FACS (PBS con FBS al 3% y EDTA 2 mM) (Life Technologies). Las células lavadas se resuspendieron en tampón FACS con FcR bloqueando Ab (dilución 1:50) (Biolegend, San Diego, CA) y se incubaron durante 15 minutos a 4°C. Las células se centrifugaron para eliminar el bloqueo de FcR Ab y se tiñeron más con el kit de tinción de células muertas azul reparable LIVE/DEAD (dilución 1:500) (Life Technologies) junto con CD45 PerCPCy5.5, Clone 30-F11, Rat IgG2b (dilución 1:100) (BD Bioscience). Las células se tiñeron durante 25 minutos a 4°C seguido de dos lavados con tampón FACS. Las células se resuspendieron en fijador estabilizador (BD) y se adquirieron en LSR II (BD Bioscience) siguiendo el protocolo estándar proporcionado por la compañía. Los datos fueron analizados por FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).
- 25
- 30
- 35
- Análisis estadístico. Los análisis estadísticos de los datos paramétricos se realizaron mediante ANOVA bidireccional y la prueba de comparación múltiple de Tukey (realizada para la longitud del vaso corneal, solo estudios de la longitud del vaso linfático) con GraphPad Prism (versión 6.0a, GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Los datos se muestran como medias \pm error estándar de la media (SEM). Un valor p de menos de 0.05 se consideró estadísticamente significativo. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$.
- 40
- Resultados Como se muestra en la figura 1A, el suministro post-sistémico de Scop. Además de la administración tópica de BAC, la producción de lágrimas disminuyó significativamente. Además, la puntuación de la mancha corneal aumentó notablemente (figura 1B). El cambio fue evidente después de una semana de administración de Scop+Bac.
- 45
- Además, como se representa en las figuras 2A y 2B, la longitud de la esqueletización de los vasos sanguíneos corneales aumentó significativamente después de 4 semanas de tratamiento con BAC+Scop. De manera similar, como se demostró en las figuras 2C y 2D, la longitud de la esqueletización de los vasos linfáticos corneales aumentó después de 4 semanas de tratamiento con BAC+Scop.
- Además, las glándulas lagrimales extraorbitales contenían infiltrado de células inmunes después de 4 semanas de tratamiento, como se indica en la figura 3.
- Ejemplo 2. Capacidad de prueba del agente candidato para prevenir o inhibir la aparición del ojo seco
- 50
- Para los estudios de la eficacia de los agentes candidatos para prevenir o inhibir el desarrollo del ojo seco, los grupos de ratones se asignan al azar a los siguientes grupos: naive (no tratado), simulado (recibir cirugía equivalente a la implantación de la bomba, pero sin implantación real de la bomba y sin tratamiento con escopolamina o BAC), cloruro de benzalconio más escopolamina (BAC más Scop), agente de prueba solo o agente de prueba más BAC más Scop.
- 55
- El ojo seco se induce como se describe anteriormente. Para el tratamiento con BAC más Scop, los ratones se implantan por vía subcutánea con una bomba osmótica que administra escopolamina (2 mg/20 g de peso

corporal/día), y 1 µl de 0.1-0.2% de BAC se administra tópicamente en la superficie ocular del ojo derecho, dos veces al día, 2 días por semana.

5 Los animales en los grupos de agentes de prueba reciben el agente candidato a partir del mismo día en que comienza la inducción del ojo seco. El agente candidato se administra al animal en forma de una gota para los ojos, un aerosol intranasal o parenteralmente en forma de una solución inyectable. La dosis adecuada del agente candidato y la frecuencia de administración se decide en función del peso corporal del animal y la vía de administración. El tiempo y la frecuencia de administración dependen del agente que se utilizará. Todos los tratamientos se realizan durante al menos una, dos, tres o cuatro semanas. La producción de lágrimas y la tinción de fluoresceína corneal se miden los días 7, 14, 21 y 28. El día 28, los animales se sacrifican y se extraen la glándula lagrimal y la córnea extraorbitales para citometría de flujo e histología. La angiogénesis corneal y la linfangiogénesis también se cuantifican.

10 La eficacia del agente candidato se determina detectando la capacidad del agente candidato para mantener la producción de lágrimas y/o prevenir o limitar la irritación ocular, en relación con los niveles de control, por ejemplo, niveles en un ojo de animales que reciben escopolamina y cloruro de benzalconio pero que no reciben el agente candidato.

15 Ejemplo 3. Capacidad de prueba del agente candidato para tratar la condición del ojo seco

Para los estudios de eficacia de los agentes candidatos para tratar el ojo seco, los grupos de ratones se asignan al azar a los siguientes grupos: naive (no tratado), simulado (recibir cirugía equivalente a la implantación de la bomba, pero sin implantación real de la bomba y sin tratamiento con escopolamina o BAC), cloruro de benzalconio más escopolamina (BAC más Scop), agente de prueba solo o agente de prueba más BAC más Scop.

20 El ojo seco se induce como se describe anteriormente. Para el tratamiento con BAC más Scop, los ratones se implantan por vía subcutánea con una bomba osmótica que administra escopolamina (2 mg/20 g de peso corporal/día), y 1 µl de 0.1-0.2% de BAC se administra tópicamente en la superficie ocular del ojo derecho, dos veces al día, 2 días por semana. Los métodos de inducción de ojo seco continúan durante al menos una, dos, tres o cuatro semanas.

25 Los animales en los grupos de agentes de prueba reciben el agente candidato comenzando una o dos semanas después de que comienza la inducción del ojo seco, por ejemplo, entre los días 7 y 14 después del inicio de la inducción del ojo seco. El agente candidato se administra al animal en forma de una gota para los ojos, un aerosol intranasal o parenteralmente en forma de una solución inyectable. La dosis adecuada del agente candidato y la frecuencia de administración se decide en función del peso corporal del animal y la vía de administración. El tiempo y la frecuencia de administración dependen del agente que se utilizará. El agente de prueba se administra durante una a tres semanas. La producción de lágrimas y la tinción de fluoresceína corneal se miden los días 7, 14, 21 y 28 desde el inicio de la inducción del ojo seco. El día 28, los animales se sacrifican y se extraen la glándula lagrimal extraorbitaria y la córnea para citometría de flujo e histología. La angiogénesis corneal y la linfangiogénesis también se cuantifican.

30 La eficacia se determina detectando un aumento en la producción de lágrimas y/o una disminución en la irritación ocular en animales que reciben el agente candidato y BAC más Scop, en relación con los niveles de control (por ejemplo, niveles en un ojo de animales que reciben BAC más Scop pero que no reciben el agente candidato).

REIVINDICACIONES

1. Un método para inducir la enfermedad del ojo seco en un animal roedor, que comprende la administración de escopolamina y cloruro de benzalconio a dicho animal roedor.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el animal roedor es un ratón o una rata.
- 5 3. El método de la reivindicación 1, en el que la escopolamina se administra por implantación de una bomba de infusión.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la escopolamina se administra a una concentración de 0.4-4.0 mg por 20 g peso corporal por día.
- 10 5. El método de la reivindicación 1, en el que el cloruro de benzalconio se administra tópicamente a la superficie ocular de dicho animal roedor.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el cloruro de benzalconio se administra a una concentración de 0.05-0.4%, una a cuatro veces por día.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la escopolamina y el cloruro de benzalconio se administran a dicho animal roedor durante un período de hasta dos meses.
- 15 8. El método de la reivindicación 6, en el que la escopolamina y el cloruro de benzalconio se administran a dicho animal roedor durante dos a cuatro semanas.
9. El método de la reivindicación 8, en el que el roedor es un ratón macho C57BL/6 de 8-10 semanas de edad, a escopolamina se administra mediante una bomba osmótica implantada por vía subcutánea a una concentración de 2 mg por 20 g de peso corporal por día durante cuatro semanas, y el cloruro de benzalconio se administra por vía tópica en una superficie ocular a una concentración del 0.2%, dos veces al día, dos días por semana durante cuatro semanas.
- 20 10. El método de la reivindicación 1, en el que dicha afección del ojo seco se caracteriza por una producción de lágrimas reducida y una irritación ocular aumentada, y opcionalmente se caracteriza además por una mayor angiogénesis y/o linfangiogénesis aumentada en un ojo tratado, en relación con los niveles de control, opcionalmente en el que se detecta una producción de lágrimas reducida detectando una reducción en la producción de lágrimas de al menos 10% en relación con los niveles de control.
- 25 11. El método de la reivindicación 10, en el que el aumento de la irritación ocular se mide detectando, dentro del ojo, uno o más de: un aumento en las células inflamatorias, un aumento en las citocinas inflamatorias en el ojo, o un aumento en la tinción de fluoresceína, en relación con los niveles de control.
- 30 12. Escopolamina y cloruro de benzalconio para usar en un método de prueba de la eficacia de un agente candidato para el tratamiento del ojo seco, en el que la escopolamina y el cloruro de benzalconio se administran a un animal roedor para inducir ojo seco en dicho animal roedor, y dicho agente candidato se administra posteriormente a dicho animal roedor, y dicho agente candidato se administra posteriormente a dicho animal roedor, en el que la eficacia de dicho agente candidato se determina detectando un aumento en la producción de lágrimas de al menos 10% y/o una disminución en la irritación ocular de al menos 10%, en relación con los animales que reciben escopolamina y cloruro de benzalconio pero que no reciben el agente candidato.
- 35 13. La escopolamina y el cloruro de benzalconio para uso de la reivindicación 12, en el que:
 - (i) dicho agente candidato se administra al menos 7 días después del comienzo de la administración de escopolamina y cloruro de benzalconio;
 - 40 (ii) dicho agente candidato se administra al menos 14 días después del comienzo de la administración de escopolamina y cloruro de benzalconio;
 - (iii) dicho agente candidato se administra al menos 28 días después del comienzo de la administración de escopolamina y cloruro de benzalconio; o
 - 45 (iv) dicho agente candidato se administra por vía tópica o sistémica, opcionalmente en el que dicha administración tópica es la administración del agente candidato en forma de gota, aerosol o gel al ojo o nariz de dicho animal roedor, u opcionalmente en el que dicha administración sistémica se selecciona de administración oral, inyección o infusión.
- 50 14. La escopolamina y el cloruro de benzalconio para uso de la reivindicación 12, en el que dicho agente candidato se administra concurrentemente con el inicio de la administración de escopolamina y cloruro de benzalconio, opcionalmente en el que la eficacia de dicho agente candidato se determina en función de la capacidad del agente candidato para limitar o eliminar la reducción en la producción de lágrimas, y/o limitan o eliminan el aumento de la

irritación ocular, en relación con los animales que reciben escopolamina y cloruro de benzalconio pero que no reciben el agente candidato.

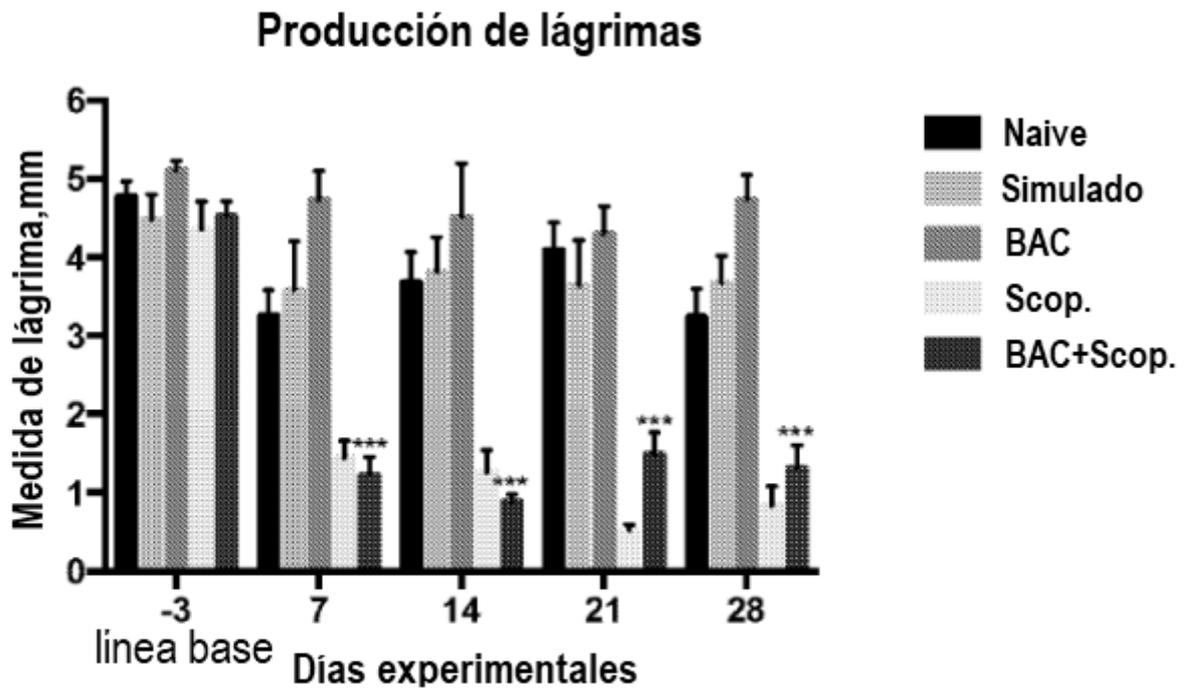


FIG. 1A

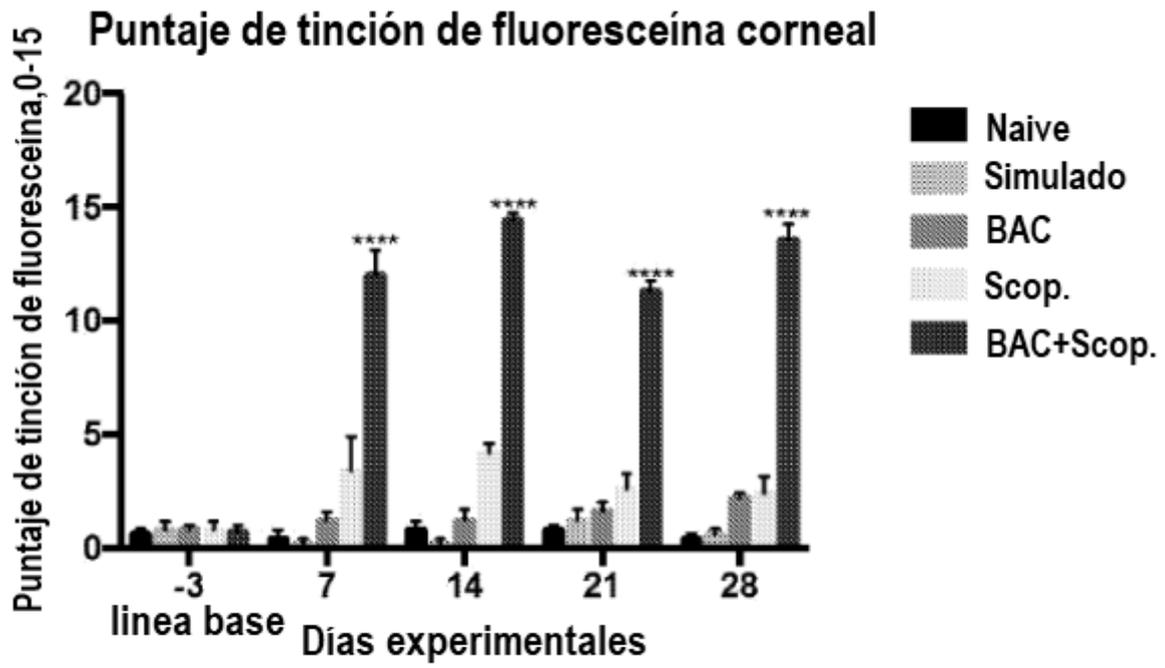


FIG. 1B

Angiogénesis corneal, 'teñida' con 'CD31,2x'

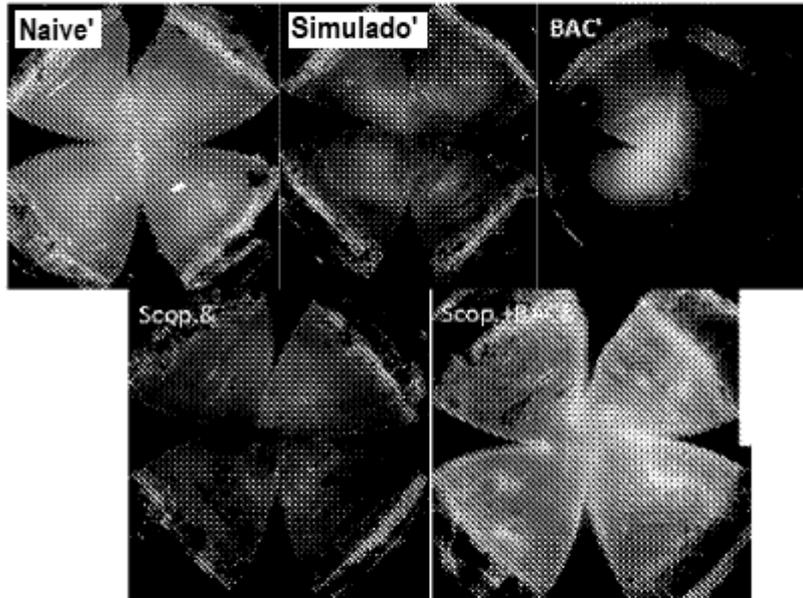


FIG. 2A

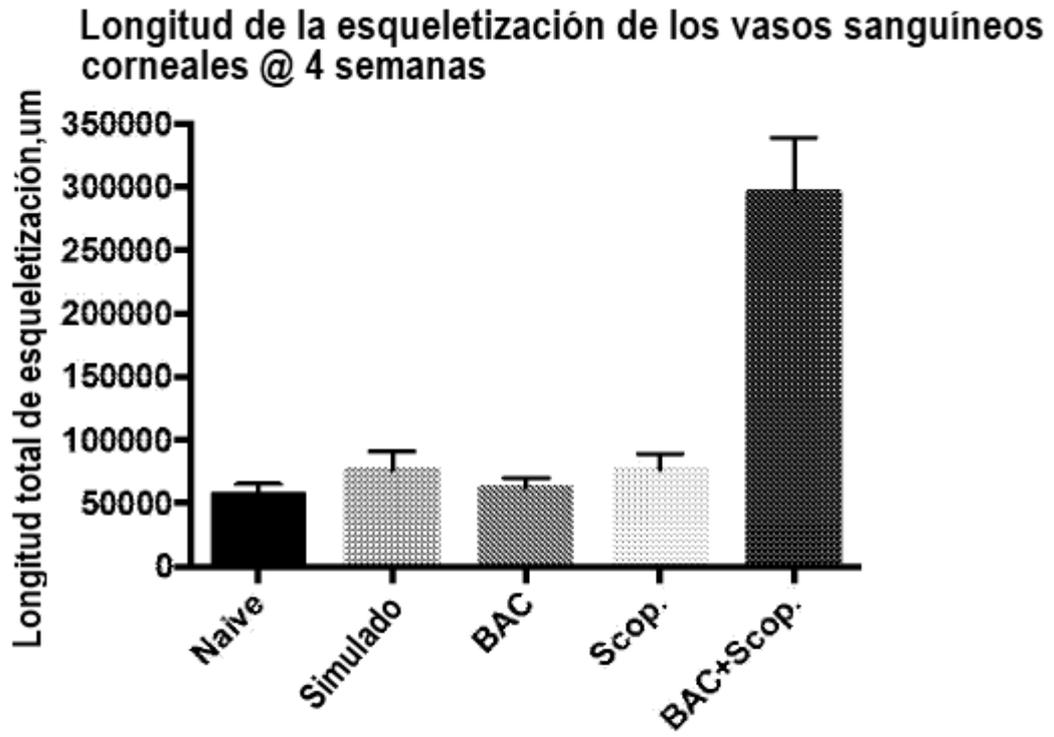


FIG. 2B

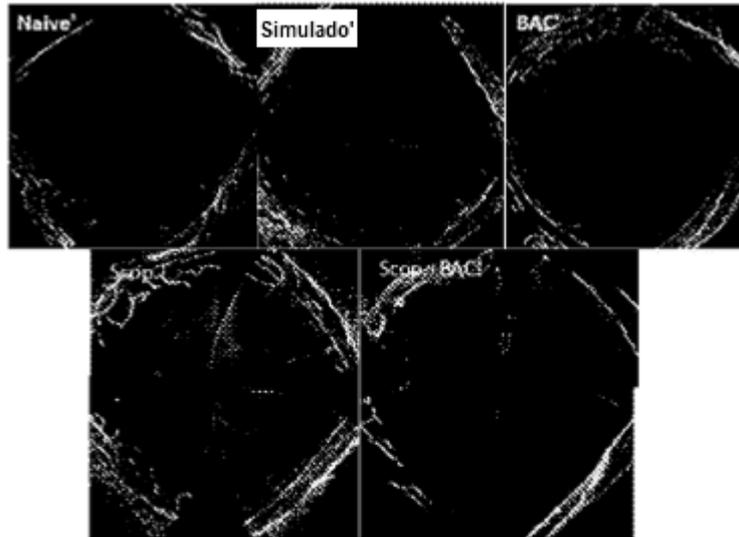


FIG. 2C

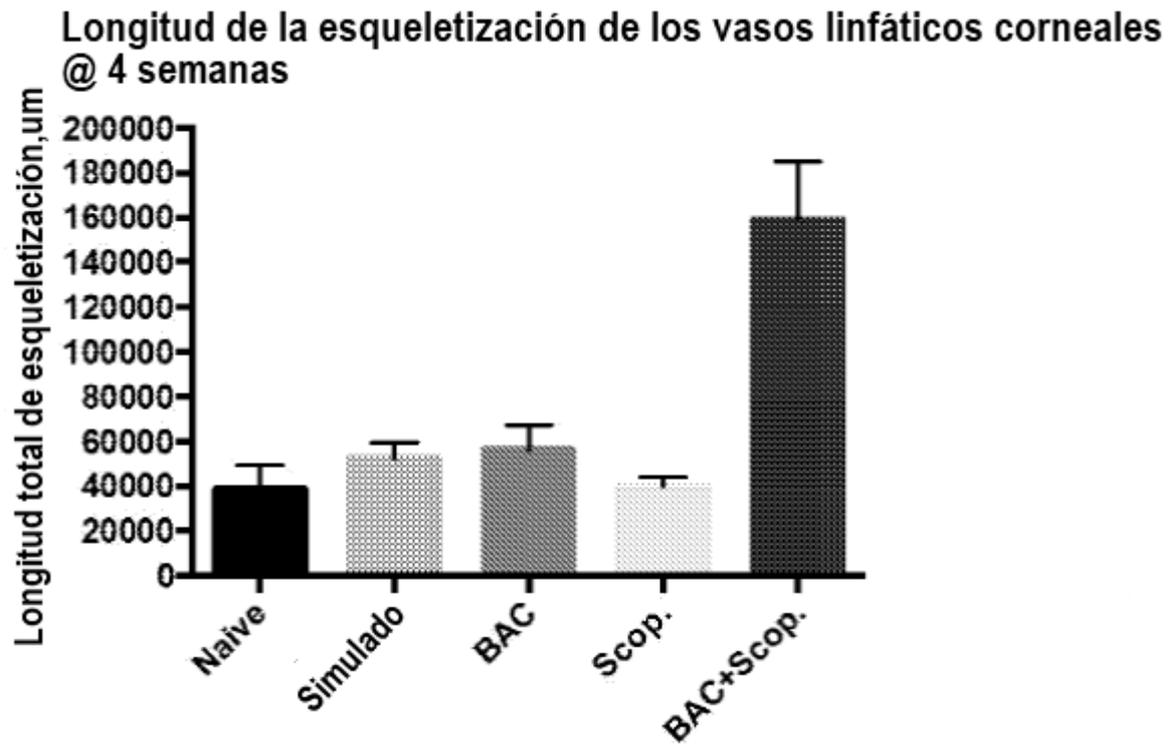


FIG. 2D

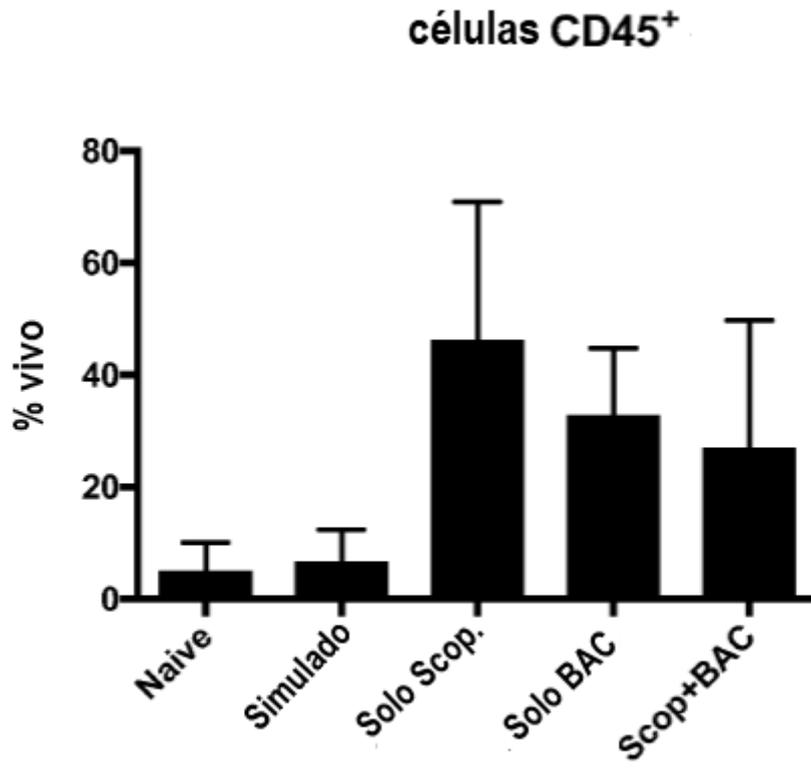


FIG. 3