

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 835 274**

51 Int. Cl.:

A61K 31/445 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 27/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2016 PCT/IB2016/054073**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17006272**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2016 E 16736636 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020 EP 3319639**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que contienen un antagonista de la integrina alfa 4 para el tratamiento de afecciones inflamatorias oculares**

30 Prioridad:

08.07.2015 US 201562189813 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2021

73 Titular/es:

**AXEROVISION, INC. (100.0%)
5857 Owens Ave., Suite 300
Carlsbad, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

KRAUSS, ACHIM HANS-PETER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 835 274 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

Composiciones farmacéuticas que contienen un antagonista de la integrina alfa 4 para el tratamiento de afecciones inflamatorias oculares

5

ÁMBITO DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica, tal como una composición oftálmica de aplicación tópica, que contiene un antagonista de la integrina $\alpha 4$ para el tratamiento de afecciones inflamatorias oculares, incluida la enfermedad del ojo seco. La presente revelación también se refiere a un método para tratar afecciones inflamatorias oculares, incluida la enfermedad del ojo seco, en humanos y otros mamíferos mediante la administración de una composición farmacéutica, tal como una composición oftálmica de aplicación tópica, que contiene un antagonista de la integrina $\alpha 4$.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La enfermedad del ojo seco (EOS) es uno de los trastornos oculares más comunes y molestos. Se ha definido como una enfermedad multifactorial de la superficie ocular más prevalente en mujeres y ancianos. La EOS está relacionada con síntomas de incomodidad, alteración visual, inestabilidad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular, que pueden dañar los tejidos de la superficie ocular (Investigación in Dry Eye DEWS Report 2007). El medio proinflamatorio se caracteriza por un aumento de los niveles de citocinas y quimiocinas en la película lagrimal, en la córnea y en la conjuntiva, y por una mayor infiltración de células T autorreactivas en el epitelio conjuntival y, a veces, en la glándula lagrimal (Pflugfelder y otros, 1999; de Paiva y otros, 2009a; Massingale y otros, 2009); según la revisión de Stern y colegas (Stern y otros, 2010; Stern y otros, 2013).

20

La alteración de la composición de la película lagrimal (mucinas, lípidos, proteínas) y la disminución de su volumen producen anomalías en la película lagrimal que contribuyen al ciclo de la enfermedad.

25

La exposición de ratones a un ambiente controlado de estrés desecante (DS) da como resultado una patología de la superficie ocular que recuerda en muchos aspectos a la EOS de pacientes humanos (Dursun y otros, 2002; de Paiva y otros, 2006b; Niederkorn y otros, 2006; de Paiva y otros, 2009a). Hasta la fecha, este es el modelo animal mejor caracterizado para estudiar la EOS.

30

Las integrinas son glucoproteínas heterodiméricas constituidas por una subunidad α y una subunidad β . Expresadas en la superficie celular de los leucocitos, las integrinas juegan un papel en su incorporación a los sitios de inflamación. La asociación de una subunidad α y una subunidad β concretas determina la especificidad de la integrina por el ligando. La subunidad de la integrina $\alpha 4$ (CD49d) es un componente del antígeno muy tardío-4, VLA-4 (integrina $\alpha 4\beta 1$; CD49d/CD29) y $\alpha 4\beta 7$ (CD49d/CD103). En el caso de la integrina $\alpha 4\beta 1$, los ligandos correspondientes son, como molécula de adhesión de la superfamilia de inmunoglobulinas, la molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1) sobre las células endoteliales vasculares y la glucoproteína fibronectina de la matriz extracelular, que son responsables de la orientación, el tráfico, la diferenciación, el cebado, la activación, la proliferación y la supervivencia de las células que expresan la integrina $\alpha 4\beta 1$. La integrina $\alpha 4\beta 1$ se expresa en los linfocitos, monocitos, macrófagos, en las células NK y en los eosinófilos. La integrina $\alpha 4\beta 7$ y su ligando correspondiente, MAdCAM (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1 [molécula de adhesión celular adhesina vascular mucosal 1]), regulan el tráfico de los leucocitos hacia el intestino, pero no se puede descartar su participación en la EOS.

35

40

Se ha demostrado que el natalizumab, un anticuerpo dirigido contra la subunidad integrina $\alpha 4$, inhibe profundamente la inflamación y mejora los resultados clínicos, tanto en la esclerosis múltiple (Cross y Naismith, 2014) como en la enfermedad de Crohn (Cohen y otros, 2014), que también son patologías mediadas por células T. Se ha demostrado que el lifitegrast, un antagonista de molécula pequeña dirigido contra una molécula de adhesión diferente (LFA-1, integrina $\alpha L\beta 2$), reduce la tinción corneal y mejora los síntomas cuando se administra por vía tópica a pacientes de ojo seco (Sheppard y otros, 2014). Asimismo se ha demostrado que un antagonista específico de molécula pequeña de la integrina $\alpha 4\beta 1$, BIO-8809, reduce la tinción corneal con fluoresceína, los infiltrados de células T conjuntivales y la expresión de TNF α en la córnea y en la conjuntiva de un modelo murino de ojo seco (Ecoiffier y otros, 2008). Además Krauss y otros (2015) han referido la efectividad de una dosis de 30 mg/ml de GW559090 administrada por vía tópica a los ojos de un modelo murino de estrés desecante (simulando EOS). Andonian (2015) investigó la farmacocinética ocular y sistémica de dicha dosis en ratones, conejos y perros. Contreras-Ruiz y otros (2015) informaron de su efecto positivo en el ojo seco relacionado con el síndrome de Sjögren en un modelo murino.

45

50

55

RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

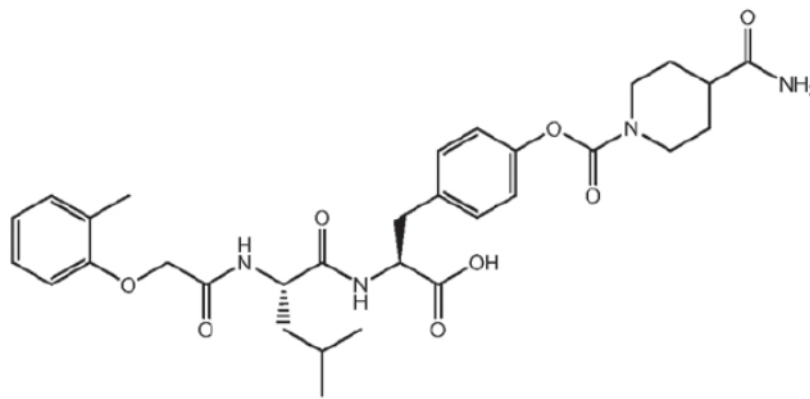
La presente invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier contenido que queda fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona exclusivamente con fines informativos. Todas las indicaciones de la descripción sobre métodos de tratamiento se refieren a los compuestos, a las composiciones farmacéuticas y a los medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal.

60

Según un aspecto, la presente revelación se refiere a un método para tratar una afección inflamatoria ocular en un mamífero que lo necesite, el cual consiste en administrar ocularmente al mamífero una cantidad terapéuticamente

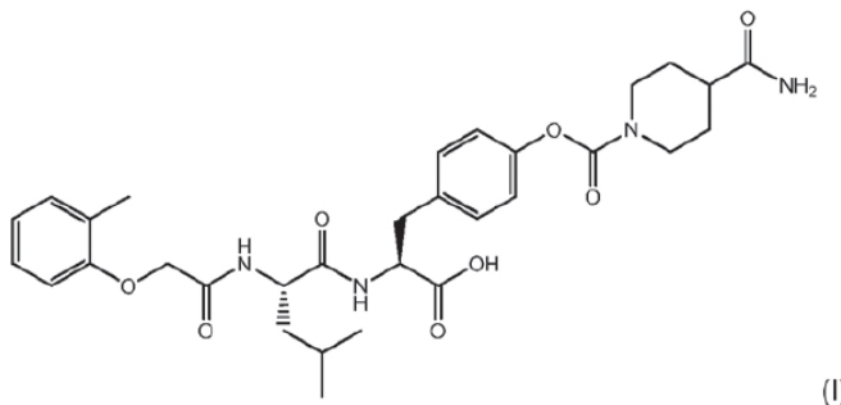
65

efectiva de un compuesto de la fórmula I



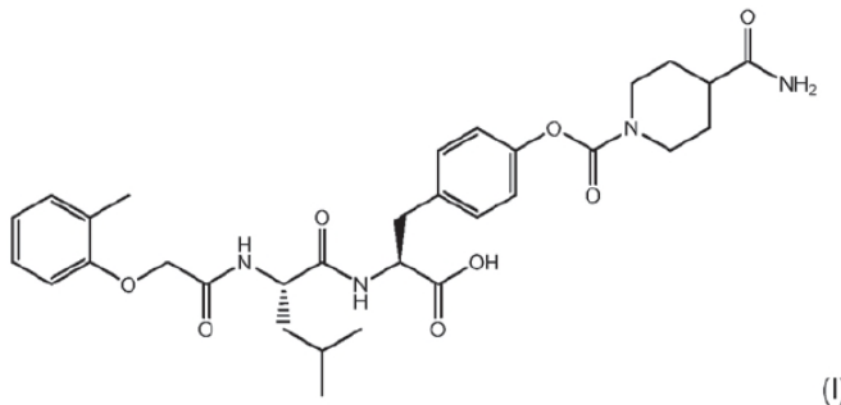
5 o de una sal, éster, anhídrido, hidrato, solvato, polimorfo, isómero óptico, racemato, diastereoisómero o enantiómero del mismo farmacéuticamente aceptables (designados colectivamente como agente terapéutico **A**). En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico **A** se aplica por vía tópica. La administración tópica puede ser a la córnea, al saco conjuntival y/o al párpado. En algunas otras formas de ejecución el agente terapéutico **A** se aplica localmente, p.ej. por vía subconjuntival, intracameral, intravítrea, sub-Tenon, subretinal, subcoroidal o supracoroidal.

10 En otro aspecto, la presente revelación se refiere a un compuesto de la fórmula I



15 o a una sal, éster, anhídrido, hidrato, solvato, polimorfo, isómero óptico, racemato, diastereoisómero o enantiómero del mismo farmacéuticamente aceptables (designados colectivamente como agente terapéutico **A**) para emplear en el tratamiento de una afección inflamatoria ocular. En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico **A** se prepara en un vehículo de tipo oftálmico farmacéuticamente aceptable.

20 La presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que contiene un compuesto de la fórmula I



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para tratar una afección ocular inflamatoria por administración tópica al ojo de un humano, de modo que una dosis individual del compuesto de la fórmula I o de una sal farmacéuticamente

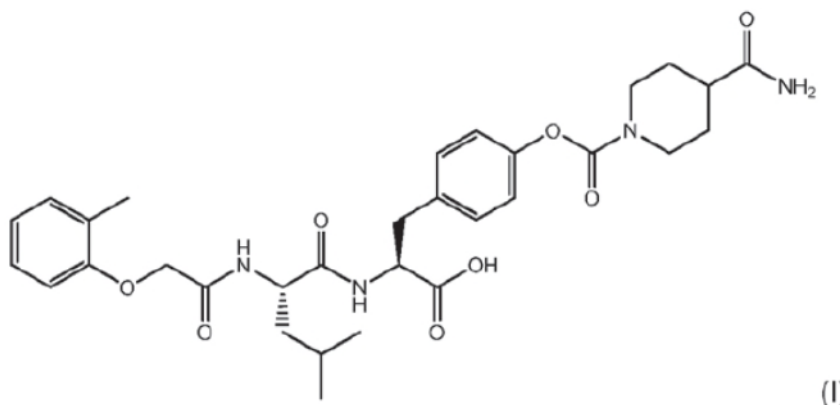
aceptable del mismo está comprendida en el intervalo de 0,01 mg hasta 5 mg para cada ojo afectado. En ciertas formas de ejecución la composición farmacéutica lleva además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En ciertas formas de ejecución la composición farmacéutica se aplica a la superficie del ojo, al saco conjuntival y/o al párpado. En algunas otras formas de ejecución la composición farmacéutica se aplica por vía subconjuntival.

5 En otra forma de ejecución, la composición farmacéutica para usar según la presente invención se formula en forma de gotas, gel, ungüento, spray o nebulizador para los ojos. Según otro aspecto, se formula en forma de una solución oftálmica. Según una forma de ejecución específica, esta solución contiene 30 mg/ml del compuesto de la fórmula I o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En otro aspecto la presente revelación se refiere a una composición farmacéutica que lleva el agente terapéutico **A** y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, de manera que la composición es útil para tratar una afección inflamatoria ocular cuando se aplica en forma de formulación oftálmica tópica.

15 En otro aspecto más, la presente revelación se refiere a un método para tratar una afección inflamatoria ocular en un mamífero (que puede ser un humano) que lo necesite, evitando o disminuyendo la migración de células presentadoras de antígeno a los ganglios linfáticos. Este método consiste en administrar a dicho mamífero (que puede ser un humano) una cantidad terapéuticamente efectiva del agente terapéutico **A**.

20 En otro aspecto, la presente revelación se refiere a una composición farmacéutica que contiene un compuesto de la fórmula I



25 o una sal, éster, anhídrido, hidrato, solvato, polimorfo, isómero óptico, racemato, diastereoisómero o enantiómero del mismo farmacéuticamente aceptables y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

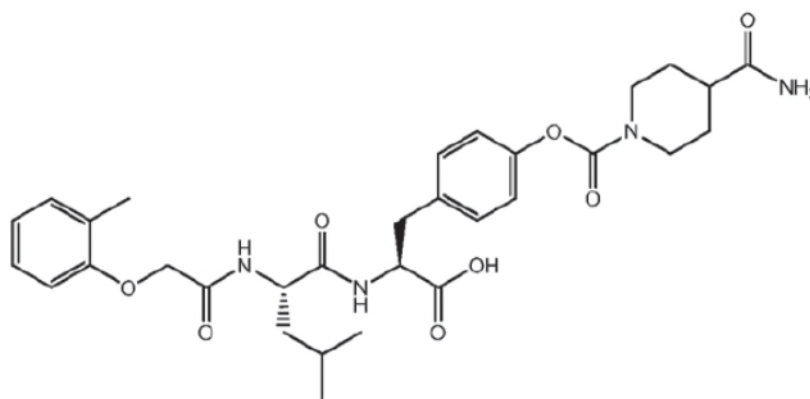
30 En otra forma más de ejecución la composición farmacéutica para usar según la presente invención contiene además ciclosporina A.

35 En otra forma más de ejecución la composición farmacéutica para usar según la presente invención contiene además un esteroide elegido del grupo integrado por dexametasona base y fosfato, difluprednato, flucinolona, fluorometolona base y acetato, loteprednol, prednisolona acetato y fosfato, rimexolona y acetónido de triamcinolona.

40 En otra forma más de ejecución la composición farmacéutica para usar según la presente invención contiene además un fármaco antiinflamatorio no esteroideo seleccionado del grupo integrado por bromfenaco, diclofenaco, flurbiprofeno, ketorolaco y nepafenaco.

45 En otro aspecto más, la presente revelación se refiere a un método para el tratamiento de una afección inflamatoria ocular, tal como la EOS, en un mamífero (que puede ser un humano) que lo necesite, el cual consiste en administrar a dicho mamífero/humano una cantidad terapéuticamente efectiva de: a) una composición farmacéutica que incluya el agente terapéutico **A**; (b) un antagonista de la integrina LFA-1, tal como el lifitegrast; y (c) uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto más, la presente revelación se refiere al uso de un compuesto de la fórmula I



o de una sal, éster, anhídrido, hidrato, solvato, polimorfo, isómero óptico, racemato, diastereoisómero o enantiómero del mismo farmacéuticamente aceptables en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una afección inflamatoria ocular.

En ciertas formas de ejecución de la presente invención la afección inflamatoria ocular es la enfermedad del ojo seco. En otras formas de ejecución de cada uno de los aspectos, la afección inflamatoria ocular es uveítis no infecciosa (anterior, intermedia, posterior, panuveítis), conjuntivitis no infecciosa, iritis o escleritis.

En ciertas formas de ejecución de cualquiera de los aspectos indicados anteriormente, el agente terapéutico **A** es el compuesto (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico **A** es la sal potásica del compuesto (I).

El especialista en la materia comprenderá que cualquiera de los anteriores métodos de tratamiento y/o usos se puede llevar a cabo mediante la administración tópica u otro tipo de administración ocular de una composición farmacéutica que contenga el agente terapéutico **A**. Tal como se usa aquí, la expresión "administración tópica" incluye la aplicación a la superficie del ojo en forma de gotas, spray, nebulizador, gel, crema o pomada para los ojos; la aplicación al saco conjuntival; la aplicación a través de un inserto; la aplicación mediante un dispositivo liberador de fármacos diseñado para administrar medicamentos oftálmicos, y similares. Tal como se usa aquí, la expresión "otro tipo de administración ocular" comprende la aplicación por vía subconjuntival, intracameral, intravítrea, sub-Tenon, subretinal, subcoroidal o supracoroidal de una formulación, un inserto o dispositivo farmacéuticamente aceptables, diseñados para administrar medicamentos oftálmicos, y similares.

Basándose en los datos presentados aquí, es de esperar que el bloqueo de los receptores de la integrina $\alpha 4$ cuide y mejore otras afecciones inflamatorias e inmunológicas oculares en cuya patogénesis están involucrados los leucocitos, como es el caso de todas las formas de uveítis (anterior, intermedia, posterior, panuveítis), conjuntivitis, iritis o escleritis (difusa, nodular, necrotizante), además de la EOS.

El compuesto de la fórmula I, que también se conoce como ácido (S)-3-(4-((4-carbamoylpiperidin-1-carbonil)oxi)fenil)-2-((S)-4-metil-2-(2-(o-toliloxi)acetamido)pentanamido) propanoico; o ácido (2S)-3-[4-((4-(aminocarbonyl)-1-piperidinil)carbonil)oxi)fenil]-2-(((2S)-4-metil-2-[[2-(2-metilfenoxi)acetil]amino]pentanoil)amino) propanoico; o GW559090, es un potente antagonista de la integrina $\alpha 4$ que previamente se había investigado clínicamente en pacientes asmáticos por vía inhalatoria oral (Ravensberg y otros, 2006).

Sin estar vinculado a ninguna teoría mecanicista de acción, el efecto del compuesto de la fórmula I parece ser tanto antiinflamatorio como modificador de la enfermedad. Al administrarlo localmente al ojo, el compuesto de la fórmula I mejoró la función de barrera epitelial de la córnea, disminuyó los marcadores inflamatorios en la córnea y la conjuntiva, redujo la incorporación y la orientación de los linfocitos T hacia la conjuntiva y sorprendentemente bloqueó la migración de células presentadoras de antígeno hacia los ganglios linfáticos drenantes y su activación en ellos, según un modelo murino de EOS. El compuesto de la fórmula I fue ineficaz cuando se administró por vía sistémica, lo cual es inesperado si se tiene en cuenta el papel bien conocido de las integrinas en el tráfico de leucocitos. Si el bloqueo del tráfico de leucocitos era el único o al menos el principal mecanismo de acción de un antagonista de la integrina $\alpha 4$ tal como el compuesto de fórmula I, se podía deducir que la exposición sistémica al fármaco debería ser más importante que la exposición al fármaco en la superficie ocular. El tráfico de leucocitos es inhibido por un antagonista de la integrina $\alpha 4$ unido a los leucocitos circulantes antes de que transmigran por la pared endotelial vascular en los sitios de inflamación, mediante la interacción con las moléculas de adhesión celular VCAM-1 y MAdCAM. El hecho de que la vía tópica de administración del compuesto de la fórmula I, pero no la ruta sistémica, fuera efectiva para tratar los síntomas de EOS en este modelo animal sugiere un efecto más local que sistémico del antagonismo de la integrina $\alpha 4$. Este efecto local parece ser específico del antagonista de la integrina $\alpha 4$, el compuesto de la fórmula I, y diferenciado del tratamiento tópico con esteroides (fosfato de dexametasona), porque el fosfato de dexametasona tópico mejoró la tinción corneal relacionada con la EOS, pero no la migración de células presentadoras de antígeno a los ganglios linfáticos drenantes.

Un especialista en la materia puede apreciar por estas consideraciones que el efecto terapéutico del antagonismo de la integrina $\alpha 4$ se produce por un mecanismo único. Un aspecto importante y modificador de la enfermedad de este mecanismo único es la interrupción del ciclo inmune, presente en la EOS, al nivel de los ganglios linfáticos drenantes, un mecanismo no compartido con otros fármacos, como los esteroides tópicos.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 (estado técnico anterior): demuestra que el tratamiento tópico con el compuesto de la fórmula I evita, en función de la dosis, la alteración de la barrera corneal inducida por DS.

10 Media geométrica e intervalos de confianza del 95% de la valoración de la intensidad de absorción de OGD tras 5 días de estrés desecante (DS). NS = no estresado, sin tratar; DS5 = estrés desecante durante 5 días, sin tratamiento tópico; todos los demás grupos son DS5 con tratamiento tópico; Dex = fosfato de dexametasona al 0,1%; BSS = solución salina equilibrada (Leiter's Pharmacy, San José, CA), vehículo para la dexametasona; V GW = solución salina tamponada con fosfato, pH 7 (vehículo para GW559090); GW_1 mg/ml = GW559090 (1 mg/ml); GW_3 mg/ml = GW559090 (3 mg/ml); GW_10 mg/ml = GW559090 (10 mg/ml); GW_30 mg/ml = GW559090 (30mg/ml). N = 26-30.
15 *p < 0,05; **p < 0,01 en comparación con el control (DS5 vs. NS; Dex vs. vehículo de Dex; GW vs. vehículo de GW; ANOVA de efectos mixtos de los datos de \log_{10} (OGD)).

FIG. 2 (estado técnico anterior): demuestra que el compuesto de la fórmula I actúa principalmente de manera local, no sistémica, mejorando la alteración de la barrera corneal inducida por DS.

20 Media geométrica e intervalos de confianza del 95% de la valoración de la intensidad de absorción de OGD tras 5 días de estrés desecante (DS). NS = no estresado, sin tratar; DS5 = estrés desecante durante 5 días, sin tratamiento; todos los demás grupos son DS5 con tratamiento; Dex = fosfato de dexametasona al 0,1%; V Dex = solución salina equilibrada (Leiter's Pharmacy, San José, CA), vehículo para la dexametasona; GW tópico = GW559090 tópico (30 mg/ml; 60 μ g por ojo); GW = GW SC = GW559090 subcutáneo (30 mg/ml; 120 μ g); V GW = solución salina tamponada con fosfato, pH 7 (vehículo para GW559090). N = 26-30.
25 *p < 0,05; **p < 0,01 en comparación con el control (DS5 vs. NS; GW vs. vehículo de GW; ANOVA de efectos mixtos de los datos de \log_{10} (OGD)).

FIG. 3A y FIG. 3B (estado técnico anterior): demuestran que el tratamiento tópico con el compuesto de la fórmula I disminuye los marcadores inflamatorios.

FIG. 3A. Nivel relativo de expresión \pm DE IL-1 α , MMP-9, CXCL-9, genes TGF- β 1 en la córnea

FIG. 3B. Nivel relativo de expresión \pm DE del gen TGF- β 1 en la conjuntiva

La línea indica el control no estresado, no tratado.

35 V GW = solución salina tamponada con fosfato, pH 7 (vehículo); GW_30 mg/ml = GW559090 (30 mg/ml). N = 7-8.
*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 (prueba T de datos independientes)

FIG. 4 (estado técnico anterior): demuestra que el tratamiento tópico con el compuesto de la fórmula I disminuye las células dendríticas CD11c+ y CD11c+/MHC II+ en los ganglios linfáticos cervicales (GLC) drenantes.

40 El porcentaje de células separadas (FACS), aisladas de los GLC drenantes que se habían recogido de cada ratón, se tiñeron para detectar CD11c, CD11 y MHC II. NS = no estresado, sin tratar; DS1 = estrés desecante durante 1 día sin tratamiento; todos los demás grupos son DS1 con tratamiento; Dex = fosfato de dexametasona al 0,1%; V GW = solución salina tamponada con fosfato, pH 7 (vehículo para dexametasona y GW559090); GW tópico = GW559090 tópico bilateral (30 mg/ml; 60 μ g por ojo); GW SC = GW559090 SC BID (30 mg/ml; 120 μ g). N = 16. *p < 0,05; en
45 comparación con el control (DS1 vs. NS; GW vs. vehículo de GW; ANOVA bidireccional con tratamiento fijo y efectos experimentales aleatorios, seguido por el procedimiento de comparación múltiple de Dunnett).

FIG. 5: demuestra que el tratamiento tópico con el compuesto de la fórmula I disminuye la infiltración de células T conjuntivales.

50 Medias de densidad celular por grupo e intervalos de confianza del 95% después de 5 días de estrés desecante (DS). NS = no estresado, sin tratar; DS5 = estrés desecante durante 5 días sin tratamiento; todos los demás grupos son DS5 con tratamiento; GW tópico = GW559090 tópico (30 mg/ml; 60 μ g por ojo); V GW = solución salina tamponada con fosfato, pH 7 (vehículo para GW559090). N = 5.
*p < 0,05; ***p < 0,001 en comparación con el control DS5 (procedimiento de Kruskal-Wallis, seguido del procedimiento de comparaciones múltiples de Dunn).
55

FIG. 6: muestra las concentraciones de GW559090 en la conjuntiva y el tejido corneal tras la administración de 40 μ l (50 mg/ml) de GW559090A. La línea discontinua a aproximadamente 4000 nM (~2400 ng/ml) indica el nivel tisular aproximado requerido para alcanzar la concentración CI90 de ~80 nM (~48 ng/ml), si la unión a las proteínas es del 98%. El nivel tisular aproximado requerido para alcanzar la concentración CI50 de ~8 nM (~5 ng/ml), si la unión a las proteínas es del 98%, es de 400 nM (~240 ng / ml). Después de la administración de 40 μ l (50 mg/ml) de GW559090A las concentraciones en el tejido conjuntival y corneal fueron superiores a 3000 ng/ml a los 30 minutos y los niveles persistieron por encima de 1000 ng/ml en el tejido corneal a las 3 horas.

65 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

I. Acción local del antagonista de la integrina $\alpha 4$ en el modelo murino de EOS

La EOS es una enfermedad multifactorial de la superficie ocular relacionada con síntomas de malestar, trastornos visuales, inestabilidad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular, que puede dañar los tejidos de la superficie ocular (Investigación in Dry Eye DEWS Report 2007). Abarca un espectro diverso de etiologías, tales como desgaste ambiental inducido por fármacos, lentes de contacto, envejecimiento. La EOS también puede constituir una manifestación ocular secundaria de una afección autoinmune sistémica tal como, sin limitarse a ellas, el síndrome de Sjögren, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la reacción del injerto contra el huésped, el síndrome de Stevens-Johnson, el penfigoide ocular cicatricial, la sarcoidosis (revisado por Stern y otros, 2010; Zoukhri, 2006).

Como enfermedad inflamatoria de la superficie ocular, la EOS está mediada por células T autorreactivas y relacionada con una disfunción de la barrera corneal, aumento de la expresión y los niveles de citocinas y quimiocinas inflamatorias, e inestabilidad y molestias de la película lagrimal. El presente inventor descubrió que, al administrar localmente al ojo un antagonista de la integrina $\alpha 4$, se restablecía la función de barrera epitelial corneal, disminuía la expresión de los marcadores inflamatorios en la córnea y en la conjuntiva, disminuía la infiltración de células T conjuntivales y se inhibía la migración y activación de células presentadoras de antígeno en los ganglios linfáticos drenantes según un modelo murino de EOS.

Los linfocitos T cebados y activados pasan desde el torrente sanguíneo hacia los sitios de inflamación, con la ayuda de receptores de adhesión expresados en su superficie celular que interactúan con las correspondientes moléculas de adhesión en el endotelio vascular. Las integrinas linfocíticas $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), $\alpha 4\beta 7$ y $\alpha L\beta 2$ (LFA-1) se unen a las VCAM-1, MAdCAM e ICAM-1 endoteliales, respectivamente. En los sitios de inflamación, los receptores de integrinas linfocíticas pueden interactuar con ciertos componentes del tejido, la fibronectina en el caso de la $\alpha 4\beta 1$, que además ayudan en la orientación, activación y proliferación de linfocitos (Nojima y otros, 1990; Cox y otros, 2010). El compuesto de la fórmula I tiene gran afinidad por la $\alpha 4\beta 1$ (**tabla 1**). En los ensayos de adhesión celular bloqueó potentemente la adhesión celular de $\alpha 4\beta 1$ a VCAM-1 y a fibronectina (dominio CS-1), así como de $\alpha 4\beta 7$ a MAdCAM (**tabla 1**). La última interacción es relevante en el entorno intestinal, pero no se ha estudiado en el ojo. En pacientes de Sjögren que tienen xerostomía y EOS se ha detectado la integrina $\alpha 4\beta 1$ en infiltrados linfocíticos T del tejido labial y VCAM-1 en células vasculares y dendríticas (Edwards y otros, 1993).

El aumento de la absorción de colorantes fluorescentes por el epitelio corneal es una señal característica de la EOS. Se ha referido anteriormente que la intensidad de la tinción corneal con dextrano verde Oregón (OGD) en ratones se correlaciona positivamente con una reducción de la función de barrera corneal después del SD experimental (de Paiva y otros, 2009a; de Paiva y otros, 2006b). Esto simula lo observado clínicamente en pacientes de ojo seco en quienes ha sido demostrado mediante la tinción de la córnea con fluoresceína. Los valores bajos de tinción son indicativos de exclusión de colorante, es decir, de la integridad de la barrera corneal. En cambio, los valores elevados de tinción reflejan la disfunción de la barrera. Los valores de tinción de la córnea con fluoresceína se han utilizado como criterios de valoración importantes para el diagnóstico de la EOS y como parámetro de eficacia en los ensayos clínicos.

En un entorno controlado de DS (como el descrito a continuación en Materiales y métodos), los ratones desarrollaron durante 5 días una disfunción de la barrera corneal, visible como tinción puntiforme de la córnea con OGD (como la descrita a continuación en Materiales y métodos), del modo anteriormente descrito (de Paiva y otros, 2009a; de Paiva y otros, 2006b). En este modelo murino, la administración tópica del compuesto de la fórmula I disminuyó la tinción de la córnea por OGD en función de la dosis, de forma similar a un corticosteroide tópico, el fosfato de dexametasona (**fig. 1**). Los esteroides tópicos son medicaciones válidas para la EOS cuando los lubricantes y los inmunomoduladores no esteroideos resultan ineficaces, pero normalmente se emplean a corto plazo debido al posible desarrollo de efectos oculares adversos relacionados con los esteroides. Previamente se había referido una mejora similar de la tinción de la córnea en este modelo animal, con un antagonista distinto de la integrina $\alpha 4\beta 1$, BIO-8809, (Ecoiffier y otros, 2008). En relación con el peso corporal, la aplicación tópica de un medicamento al ojo del ratón supera con creces la dosis administrada a un humano en 2-3 órdenes de magnitud. Cabe pensar que el tratamiento tópico en el ratón alcance una exposición sistémica relevante. Como las integrinas juegan un papel en el tráfico de leucocitos, se puede deducir que la exposición sistémica puede ser el requisito previo de un antagonista de integrinas para tratar la enfermedad ocular. Por lo tanto, era importante determinar si el tratamiento sistémico era más efectivo. Curiosamente, al cotejar el tratamiento sistémico con el tópico mediante la misma dosis, el compuesto de la fórmula I mejoró significativamente la tinción de la córnea solo cuando se administró por vía tópica (**fig. 2**). Este sorprendente hallazgo sugiere que existe un componente local de importancia crítica en la terapia de esta enfermedad, que utiliza el compuesto de la fórmula I requerido para el éxito terapéutico.

Se ha sugerido que la EOS es la consecuencia de un ciclo inmune que implica la migración de células dendríticas presentadoras de antígeno (a menudo denominadas APC o DC) desde la superficie ocular hacia los ganglios linfáticos cervicales (GLC) drenantes, donde tiene lugar el cebado de las células T autorreactivas (Pflugfelder y otros, 2008). Estas células T CD4+ autorreactivas vuelven a la superficie ocular y propagan la enfermedad (Coursey y otros, 2013; Niederkorn y otros, 2006; Zhang y otros, 2012). Con los receptores de integrina presentes en las células T CD4+ surgió la pregunta de si el tratamiento con un antagonista de la integrina $\alpha 4$ afectaría a las células T en los ganglios linfáticos drenantes. Ni un día de DS incrementó las células T CD4+ o CD8+ en los ganglios linfáticos drenantes, ni el tratamiento con el compuesto de la fórmula I o con dexametasona disminuyó el número de células T. Como se refirió anteriormente,

1 día de DS aumentó significativamente los monocitos CD11b+ en los ganglios linfáticos drenantes (Schaumburg y otros, 2011; Zhang y otros, 2014). Pero ninguno de los tratamientos farmacológicos fue capaz de reducir la cantidad de monocitos.

5 Se ha demostrado previamente que las células dendríticas (CD) son importantes para la patología mediada por el sistema inmune e inducida por DS, ya que los ratones sin CD no desarrollan la EOS (Schaumburg y otros, 2011). Las CD CD11c+ aparecieron altas en los ganglios linfáticos drenantes, aunque no significativamente, por una DS de corta duración. Al contrario que la dexametasona tópica o el tratamiento sistémico con el compuesto de la fórmula I, que no tuvo un efecto significativo sobre estas células, las células CD11c+ activadas (MHC-II+) y no activadas disminuyeron
10 mediante el tratamiento tópico con el compuesto de la fórmula I (**fig. 4**). Este sorprendente hallazgo sugiere que el compuesto de la fórmula I evita la migración de células presentadoras de antígeno a los ganglios linfáticos drenantes y que este efecto requiere la presencia del fármaco en la superficie ocular. Análogamente, tal como se ha expuesto anteriormente, solo el tratamiento tópico con el compuesto de la fórmula I mejoró la tinción de la córnea. Tomados en conjunto, pero sin estar sujetos a ninguna teoría concreta, estos resultados indican que el compuesto de la fórmula I
15 actúa localmente al nivel de la superficie ocular para tratar la inflamación ocular relacionada con la EOS, evitando la migración de CD presentadoras de antígeno a los GLC drenantes e interrumpiendo así el ciclo inmune.

El medio proinflamatorio de la superficie ocular en la EOS y este modelo murino están bien descritos en la literatura (Corrales y otros, 2006; Coursey y otros, 2014; de Paiva y otros, 2009a; de Paiva y otros, 2006a; de Paiva y otros, 2009b; de Paiva y otros, 2011). La expresión de muchas citocinas y quimiocinas aumenta en la córnea y la conjuntiva, produciendo niveles elevados en la película lagrimal. En los ejemplos presentados aquí, el tratamiento tópico con el compuesto de la fórmula I inhibió la expresión de IL-1 α , MMP-9, CXCL-9 y TGF β 1 en el epitelio corneal, y de TGF β 1 en la conjuntiva (**fig. 3**). La IL-1 α es una citocina proinflamatoria liberada por el epitelio y las células inflamatorias. Su potencial importancia en la enfermedad se destaca mediante el desarrollo clínico de un antagonista del receptor de la IL-1 para la inflamación de la superficie ocular, EBI-005 (Hou y otros, 2013; Goldstein y otros, 2015). La MMP-9 es una proteasa que ha sido implicada en la ruptura de uniones estrechas del epitelio corneal y en la ruptura de la barrera corneal en el SD (de Paiva y otros, 2006b; Luo y otros, 2004; Pflugfelder y otros, 2005). Se ha demostrado que los niveles lagrimales de MMP-9 están correlacionados con la intensidad de la tinción corneal y otros parámetros clínicos en los pacientes de ojo seco (Chotikavanich y otros, 2009). La CXCL9, junto con la CXCL10 y CXCL11, atraen células Th1 productoras de interferón gamma y están aumentadas en la película lagrimal y en la conjuntiva de los pacientes de ojo seco (Yoon y otros, 2010). La TGF- β 1 participa en el cebado de Th-17 junto con la IL-6 y la IL-23 y se encuentra elevada en las lágrimas de los pacientes de ojo seco (Gutcher y otros, 2011; Stockinger y otros, 2007; Zheng y otros, 2010). Por tanto el tratamiento con el compuesto de la fórmula I disminuye en este modelo animal algunos marcadores inflamatorios que están relacionados con la inflamación de la superficie ocular en la EOS.
35

Los ejemplos demuestran una mejoría de los síntomas objetivos del ojo seco al emplear el compuesto de la fórmula I en el modelo de DS murino. El potente antagonista de la integrina α 4 actuó localmente al nivel de la superficie ocular, evitando la migración de células presentadoras de antígeno hacia los ganglios linfáticos drenantes, con la consiguiente interrupción del ciclo inmune del ojo seco. El tratamiento de esta enfermedad mediante el bloqueo de la migración de células presentadoras de antígeno representa un mecanismo de acción novedoso y anteriormente desconocido de los antagonistas de integrinas.
40

II. Métodos de tratamiento

45 El término "tratamiento" o "tratar", respecto al tratamiento de las afecciones inflamatorias oculares, incluida la EOS, se refiere, entre otras cosas, a la prevención del desarrollo de la enfermedad o a la alteración de su curso (por ejemplo, sin limitarse a ello, a la ralentización del progreso de la enfermedad), o a la reversión de un síntoma de la enfermedad o a la reducción de uno o más síntomas y/o uno o más marcadores bioquímicos en un sujeto, evitando que uno o más síntomas empeoren o progresen, fomentando la recuperación o la mejora del pronóstico y/o previniendo la enfermedad en un sujeto libre de ella, así como a la ralentización o la reducción de la progresión de la enfermedad existente. Para un sujeto dado, la mejoría de un síntoma, su empeoramiento, regresión o progresión se puede determinar con una medición objetiva o subjetiva. Los métodos profilácticos (p.ej. prevenir o reducir la incidencia de recaída) también se consideran tratamiento.
50

55 Cualquier sujeto puede ser examinado por si tiene una afección inflamatoria ocular o corre el riesgo de padecerla. Por ejemplo, la tinción de la córnea con fluoresceína se emplea para diagnosticar la enfermedad del ojo seco. La valoración puede determinar el curso de terapia conveniente, ya sea preventiva, de mantenimiento o moduladora.

60 Por consiguiente, en esta revelación se proporciona un método para tratar, prevenir, modular o atenuar una afección inflamatoria ocular, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente terapéutico. El agente terapéutico es un compuesto de la fórmula I o una sal, éster, hidrato, solvato, polimorfo, isómero óptico, racemato, diastereoisómero o enantiómero farmacéuticamente aceptables del mismo. En ciertas formas de ejecución el sujeto es un mamífero, tal como un humano u otro mamífero.

65 En ciertas formas de ejecución la administración es ocular, como la administración tópica u otro tipo de administración ocular (p.ej. una inyección local). En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico se administra en la superficie

- ocular. En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico se administra por vía tópica, p.ej. sobre la córnea, la conjuntiva y/o el párpado. En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico se administra tópicamente sobre la córnea. En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico se aplica al saco conjuntival o al párpado. En ciertas formas de ejecución la administración tópica consiste en la aplicación de gotas oculares, ungüentos o lociones.
- 5 En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico se aplica por vía subconjuntival, intracamerar, intravítrea, sub-Tenon, subretinal, subcoroidal o supracoroidal. En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico se administra mediante una inyección local, por ejemplo periocular, intraocular, subconjuntival, retrobulbar o intracamerar. Aunque no sea la preferida, en ciertas formas de ejecución la administración puede ser sistémica.
- 10 En ciertas formas de ejecución de la presente revelación, la administración se efectúa mediante la inserción de un dispositivo de liberación continua, tal como una mini o microbomba que libera un agente terapéutico. El dispositivo de liberación continua puede ser biodegradable o no biodegradable.
- 15 Un agente terapéutico se puede administrar en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de manera que el agente terapéutico se mantenga en contacto con la superficie ocular durante un período de tiempo suficiente para permitir que el agente terapéutico penetre en la córnea y las regiones internas del ojo. El vehículo oftálmico aceptable farmacéuticamente puede ser, por ejemplo, un ungüento, un aceite vegetal o un material de encapsulación.
- 20 En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico actúa localmente interrumpiendo un ciclo inmune que implica la migración de células presentadoras de antígeno, desde una superficie ocular hacia un ganglio linfático drenante. En ciertas formas de ejecución particulares el agente terapéutico actúa localmente bloqueando la migración de células presentadoras de antígeno a un ganglio linfático drenante. En ciertas formas de ejecución el ganglio linfático drenante es un ganglio linfático cervical.
- 25 En ciertas formas de ejecución de la presente revelación la afección inflamatoria ocular es la enfermedad del ojo seco, uveítis no infecciosa (incluida la uveítis anterior, intermedia, posterior y la panuveítis), conjuntivitis no infecciosa, iritis o escleritis.
- 30 En ciertas formas de ejecución de la presente revelación en que la afección inflamatoria ocular es la enfermedad del ojo seco, ésta afección es provocada por o está relacionada con alergias, diabetes, deficiencia de la glándula lagrimal, lupus eritematoso sistémico, reacción del injerto contra el huésped, enfermedad de Parkinson, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, complicaciones derivadas de la terapia LASIK correctora de la visión, uso de lentes de contacto, exposición a climas áridos, contaminación del aire o humo de cigarrillo, lesión corneal, fibrosis conjuntival, síndrome de Stevens-Johnson, alacrimia congénita, penfigoide ocular cicatricial, sarcoidosis o tratamiento con otros fármacos
- 35 causantes de síntomas de la enfermedad del ojo seco. En ciertas formas de ejecución la afección inflamatoria ocular es la enfermedad del ojo seco asociada al síndrome de Sjögren. Por lo tanto, en una forma de ejecución, los métodos consisten en administrar el agente terapéutico a un ser humano que tenga alergias, diabetes, deficiencia de la glándula lagrimal, lupus eritematoso sistémico, reacción del injerto contra el huésped, enfermedad de Parkinson, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, complicaciones derivadas de la terapia LASIK correctora de la visión, o que use de lentes
- 40 de contacto, que esté expuesto a climas áridos, a aire contaminado o a humo de cigarrillos, que tenga lesión corneal, fibrosis conjuntival, síndrome de Stevens-Johnson, alacrimia congénita, penfigoide ocular cicatricial, sarcoidosis, o que haya sido tratado con otros fármacos causantes de síntomas de la enfermedad del ojo seco.
- 45 En general la dosificación del agente terapéutico variará en función de factores tales como la edad, el peso, la altura, el sexo, el estado médico general y el historial médico previo del sujeto. Normalmente es aconsejable administrar al paciente una dosis individual del agente terapéutico comprendida en un intervalo aproximado de 0,001 mg a 5 mg, más en concreto de 0,1 mg a 5 mg aproximadamente, en cada ojo afectado. En ciertas formas de ejecución una dosis individual del agente terapéutico es aproximadamente de 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,6, 2,8, 3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8 o 4,0 mg en cada ojo afectado. En ciertas formas de ejecución una dosis individual del agente terapéutico
- 50 es de 1,8 mg aproximadamente en cada ojo afectado. En ciertas formas de ejecución una dosis individual del agente terapéutico es de 3,0 mg aproximadamente en cada ojo afectado. Cabe señalar que los valores de dosificación pueden variar según el tipo y la gravedad de la afección que debe aliviarse. Asimismo hay que entender que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deberían ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y según el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las
- 55 composiciones, y que los intervalos de dosificación indicados en este documento son meros ejemplos y no pretenden limitar el ámbito o el uso de la composición reivindicada.
- 60 Con finalidad de tratamiento, incluida la profilaxis, se administra a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del agente terapéutico en un vehículo farmacéuticamente aceptable. "Cantidad terapéuticamente efectiva" es aquella que sea fisiológicamente significativa. El agente terapéutico es fisiológicamente significativo si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un sujeto paciente.
- 65 Según la presente revelación, en ciertas formas de ejecución la composición farmacéutica contiene aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 100 mg/ml del agente terapéutico. En ciertas formas de ejecución la composición farmacéutica contiene aproximadamente 10 mg/ml hasta aproximadamente 100 mg/ml del agente terapéutico. En ciertas formas de ejecución la composición farmacéutica contiene aproximadamente 10 mg/ml hasta aproximadamente

terapéuticamente efectiva administrada por vía ocular no produce ninguna supresión inmune sistémica.

Los agentes terapéuticos y/o las composiciones farmacéuticas reveladas que llevan dichos agentes terapéuticos se pueden administrar durante cualquier período adecuado, tal como al menos aproximadamente 12 semanas, al menos aproximadamente 24 semanas, al menos aproximadamente 36 semanas o al menos aproximadamente 48 semanas. En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico se administra durante al menos 12 semanas consecutivas. En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico se administra durante al menos 24 semanas consecutivas. En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico se administra durante al menos 36 semanas consecutivas. En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico se administra durante al menos 48 semanas consecutivas.

En ciertas formas de ejecución el tratamiento consiste en administrar diariamente el agente terapéutico durante al menos dos semanas consecutivas. En este régimen de tratamiento el agente terapéutico se puede administrar más de una vez al día, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce veces al día. En ciertas formas de ejecución la duración del régimen de tratamiento es superior a dos semanas. En ciertas formas de ejecución la duración del régimen de tratamiento es superior a cuatro semanas. En ciertas formas de ejecución la duración del régimen de tratamiento es superior a cinco semanas. En ciertas formas de ejecución la duración del régimen de tratamiento es superior a seis semanas. En ciertas formas de ejecución la duración del régimen de tratamiento es superior a siete semanas. En ciertas formas de ejecución la duración del régimen de tratamiento es superior a ocho semanas. En ciertas formas de ejecución la duración del régimen de tratamiento es superior a nueve semanas. En ciertas formas de ejecución la duración del régimen de tratamiento es superior a diez semanas. En ciertas formas de ejecución la duración del régimen de tratamiento es superior a once semanas. En ciertas formas de ejecución la duración del régimen de tratamiento es superior a doce semanas.

En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico (p.ej. el agente terapéutico A) se administra conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales en la misma composición farmacéutica o en composiciones separadas. Estos agentes terapéuticos adicionales pueden ser otros agentes terapéuticos empleados para el tratamiento de las afecciones inflamatorias oculares.

En ciertas formas de ejecución el otro agente terapéutico es la ciclosporina A. La ciclosporina A es un péptido cíclico de once aminoácidos sintetizado por el hongo microscópico *Tolypocladium inflatum*. La ciclosporina A tiene la fórmula [R-[[R*,R*-(E)]]-(L-alanil-D-alanil-N-metil-L-leucil-N-metil-L-leucil-N-metil-L-valil-3-hidroxi-N,4-dimetil-L-2-amino-6-octenoil-L-a-amino-butiril-N-metilglicil-N-metil-L-leucil-L-valil-N-metil-L-leucil)cíclico (número CAS 59865-13-3).

En ciertas formas de ejecución el otro agente terapéutico es un esteroide. En algunas de estas formas de ejecución el esteroide es un glucocorticoide. En algunas de estas formas de ejecución de la revelación el esteroide es difluprednato, prednisolona, dexametasona, fluocinolona, fluorometolona, loteprednol, medrisona, rimexolona, triamcinolona, cortisona o hidrocortisona. En ciertas formas de ejecución el esteroide es dexametasona (como dexametasona base o dexametasona fosfato), difluprednato, fluocinolona, fluorometolona (como fluorometolona base o fluorometolona acetato), loteprednol, prednisolona (como acetato o fosfato de prednisolona), rimexolona o triamcinolona (como acetónido de triamcinolona).

En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico adicional es un agente antiinflamatorio no esteroideo. En algunas de estas formas de ejecución el agente antiinflamatorio no esteroideo se elige del grupo integrado por bromfenaco, diclofenaco, flurbiprofeno, ketorolaco y nepafenaco.

En ciertas formas de ejecución el agente terapéutico adicional es un antagonista de la LFA, tal como el lifitegrast. El lifitegrast también se conoce como ácido (2S)-2-[[2-(1-benzofuran-6-carbonil)-5,7-dicloro-3,4-dihidro-1H-isoquinolin-6-carbonil]amino]-3-(3-metilsulfonilfenil)propanoico y está identificado en la patente WO2006/125119.

Según la presente revelación, el agente terapéutico puede usarse en medicina veterinaria, sobre todo en el tratamiento de afecciones inflamatorias oculares tales como, por ejemplo, la queratoconjuntivitis seca en perros, gatos y caballos; la queratitis superficial crónica (QSC) en perros, gatos y caballos; y la infiltración linfoplasmocitaria de la membrana nictitante en perros, gatos y caballos.

III. Compuestos

El compuesto de la fórmula I se puede sintetizar mediante el método de síntesis descrito en el ejemplo 27 de la patente de EUA nº 6,867,192.

Brevemente, en una forma de ejecución se añade clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,4 g) y 1-hidroxibenzotriazol (0,3 g) a una solución de ácido (2-metilfenoxi)acético (0,345 g) en acetonitrilo (50 ml), bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de agitar durante 30 minutos a 20°C, se agrega clorhidrato de 4-[(2S)-2-[(2S)-2-amino-4-metilpentanoil]amino]-3-(terc-butoxi)-3-oxopropil]fenil-4-(aminocarbonil)-1-piperidincarboxilato (1 g), seguido de diisopropiletilamina (0,35 ml) y se continúa agitando durante 18 h. La mezcla se concentra al vacío y el residuo se reparte entre ácido clorhídrico 1 M (100 ml) y acetato de etilo (300 ml). Se separan las capas y la fase orgánica se lava

con ácido clorhídrico 1 M (2 x 100 ml), bicarbonato sódico acuoso saturado (3 x 100 ml) y salmuera (100 ml), se seca sobre sulfato magnésico y se evapora al vacío para dar un sólido blanco. A una solución de este sólido en cloroformo (5 ml) se le agrega ácido trifluoroacético (5 ml) y agua (1 ml). Después de agitar durante 3 horas a 20°C, el disolvente se evapora al vacío y el residuo se somete a destilación azeotrópica con tolueno (2 x 20 ml) y luego se tritura con éter para dar ácido (2S)-3-[4-((4-(aminocarbonil)-1-piperidinil)carbonil)oxi)fenil]-2-(((2S)-4-metil-2-[[2-(2-metilfenoxi)acetil]amino]pentanoil)amino]propanoico.

Como alternativa, en otra forma de ejecución, se añade una solución de ácido (2S)-3-[4-(aliloxi)fenil]-2-[(terc-butoxi-carbonil)amino]propanoico (115,8 g) y 1-hidroxibenzotriazol (48,6 g) en DMF (475 ml) a resina Wang (50 g). Después de 15 minutos se agrega 1,3-diisopropilcarbodiimida (56,5 ml) y la mezcla se agita durante 24 h a 45°C. La resina se filtra y se lava con DMF (3 x 360 ml), metanol (3 x 360 ml) y diclorometano (3 x 700 ml). A una suspensión de la resina en diclorometano (644 ml) se le añade piridina (14,7 ml). Se agrega anhídrido acético (26,9 ml) y la mezcla se agita durante 12 h a 20°C. La resina se filtra y se lava con diclorometano (3 x 550 ml), metanol (3 x 370 ml) y diclorometano (3 x 550 ml).

Una suspensión de 20 g de la resina en diclorometano (100 ml) se enfrió a 2-5°C y se trató con una disolución de fenol (20 g) en diclorometano (80 ml). Se añade clorotrimetilsilano (20 ml) gota a gota y la mezcla se agita 6 h a 2-5°C. La resina se filtra y se lava con diclorometano (3 x 200 ml), metanol (3 x 200 ml), 10% de agua en DMF (2 x 200 ml), diisopropiletilamina al 10% en DMF (3 x 200 ml), DMF (200 ml), metanol (3 x 200 ml) y diclorometano (3 x 200 ml).

Una suspensión de la resina en DMF (55 ml) se trata con una solución de Fmoc-leucina (32,7 g) y 1-hidroxibenzotriazol (12,5 g) en DMF (85 ml). A los 5 minutos se añade 1,3-diisopropilcarbodiimida (19,3 ml) y la mezcla se agita durante 15 h a 20°C. La resina se filtra y se lava con DMF (3 x 150 ml), metanol (3 x 150 ml) y diclorometano (3 x 150 ml).

La resina se trata con piperidina al 20% en DMF (180 ml) y se agita durante 1 hora a 20°C. La resina se filtra y se lava con DMF (3 x 150 ml), diclorometano (3 x 150 ml), DMF (3 x 150 ml) y diclorometano (3 x 150 ml). A una suspensión de esto en DMF (50 ml) se le agrega una disolución de ácido (2-metilfenoxi)acético (17,9 g) y 1-hidroxibenzotriazol (14,6 g) en DMF (100 ml). A los 5 minutos se añade 1,3-diisopropilcarbodiimida (16,9 ml) y la mezcla se agita durante 65 h a 20°C. La resina se filtra y se lava con DMF (2 x 150 ml), metanol (3 x 150 ml) y diclorometano (3 x 150 ml).

Una suspensión de la resina en diclorometano (60 ml) se trata con una solución de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (5,21 g) en diclorometano (140 ml), seguido de morfolina (13 ml). La mezcla se agita durante 2 h a 20°C y después la resina se filtra y se lava con diclorometano (7 x 200 ml).

Una suspensión de la resina en diclorometano (160 ml) se trata con diisopropiletilamina (12,4 ml) y seguidamente con cloroformiato de 4-nitrofenilo (24,8 g) en 3 porciones a intervalos de 5 minutos. La mezcla se agita durante 1 h a 20°C. La resina se filtra y se lava con diclorometano (3 x 200 ml). La resina se trata con una solución de isonipecotamida (15,8 g) en DMF (180 ml) y la mezcla se agita durante 1,5 h a 20°C. La resina se filtra y se lava con DMF (4 x 200 ml) y diclorometano (2 x 200 ml).

La resina se trata con TFA al 50% en diclorometano (200 ml). Después de agitar durante 1 h a 20°C, la resina se filtra y se lava con diclorometano (5 x 200 ml). El filtrado y los lavados combinados se evaporaron al vacío. El residuo se somete a destilación azeotrópica con tolueno (2 x 100 ml), luego se tritura con éter (50 ml) y el sólido blanco resultante se filtra. Se le añade acetonitrilo (150 ml) y la mezcla se calienta a reflujo. La suspensión resultante se deja enfriar a 20°C y se agita durante 18 h. La mezcla se filtra para dar ácido (2S)-3-[4-((4-(aminocarbonil)-1-piperidinil)carbonil)oxo)fenil]-2-(((2S)-4-metil-2-[[2-(2-metilfenoxi)acetil]amino]pentanoil)amino]propanoico.

En ciertas formas de ejecución, el agente terapéutico (p.ej. el agente terapéutico **A**) es una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto (I). El término "farmacéuticamente aceptable" se usa aquí para referirse a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que en el ámbito del buen criterio médico son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, de manera proporcionada a una relación beneficio/riesgo razonable.

En ciertas formas de ejecución, el agente terapéutico (p.ej. el agente terapéutico **A**) es una sal potásica del compuesto (I).

En ciertas formas de ejecución el compuesto de la fórmula (I) se administra como conjugado, complejo o profármaco. En ciertas formas de ejecución el compuesto de la fórmula (I) se administra como profármaco. Este profármaco puede ser metabolizado por el sujeto para proporcionar el compuesto de la fórmula (I).

IV. Composiciones farmacéuticas

Tal como se emplea aquí la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptables, como por ejemplo una carga líquida o sólida, un diluyente, un excipiente, un disolvente o un material de encapsulación, que sirve para soportar los agentes activos o transportarlos desde un órgano o parte del cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser

compatible con los otros ingredientes de la formulación, por ejemplo, el vehículo no disminuye el impacto del agente en el tratamiento. En otras palabras, un vehículo es farmacéuticamente inerte.

La composición se puede formular según los métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mezclando un compuesto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La solución salina tamponada con fosfato y esterilizada es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados son bien conocidos de los especialistas en la materia. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S FARMACEUTICAL SCIENCES, 19ª edición. (1995).

Las composiciones farmacéuticas convenientes para la administración tópica se pueden formular como ungüentos, cremas, emulsiones, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, espumas, nebulizadores, aerosoles o aceites. En ciertas formas de ejecución la composición farmacéutica es una solución, tal como una solución oftálmica. En estas formas de ejecución, la solución oftálmica se administra a humanos o mamíferos no humanos por vía tópica, en forma de una o más gotas al día en cada ojo.

Para los tratamientos oculares, las composiciones pueden aplicarse en forma de ungüento o crema tópica. Cuando se formula en un ungüento, el ingrediente activo puede emplearse con una base parafínica o miscible con agua. Como alternativa, el ingrediente activo puede formularse en una crema con una base de aceite en agua o de agua en aceite.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración ocular tópica incluyen las gotas para los ojos, en las cuales el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, sobre todo en un disolvente acuoso. Las formulaciones de administración ocular deben tener un pH y una osmolalidad compatibles oftálmicamente. En una composición de la presente invención se pueden incluir uno o más agentes reguladores del pH y/o agentes tampón oftálmicamente aceptables, tales como los ácidos acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico y clorhídrico; bases como hidróxido sódico, fosfato sódico, borato sódico, citrato sódico, acetato sódico y lactato sódico; y tampones como citrato/dextrosa, bicarbonato sódico y cloruro amónico. Dichos ácidos, bases y tampones se pueden incluir en una cantidad necesaria para mantener el pH de la composición en un intervalo oftálmicamente aceptable. Se puede incorporar una o más sales oftálmicamente aceptables a la composición, en una proporción suficiente para que la osmolalidad de la composición esté dentro de un intervalo oftálmicamente aceptable. Dichas sales incluyen las que tienen cationes sodio, potasio o amonio y aniones cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato o bisulfito.

Tal como se revela aquí, las composiciones instantáneas pueden aplicarse tópicamente al ojo por vía subconjuntival, intracameraral, intravítrea, sub-Tenon, subretinal, subcoroidal, supracoroidal, en el saco conjuntival o en el párpado, con el empleo de un dispositivo o inserto de administración ocular. Este dispositivo o inserto puede estar diseñado para la liberación controlada de uno o más agentes terapéuticos con varias velocidades de liberación definidas y una cinética de dosificación y permeabilidad continua. La liberación controlada se puede conseguir mediante el diseño de matrices formadas por polímeros biodegradables/bioerosionables de diferentes tipos y características (p.ej. poli(etileno-acetato de vinilo) (EVA), PVA superhidrolizado, hidroxialquilcelulosa (HPC), metilcelulosa (MC), hidroxipropilmetil celulosa (HPMC), policaprolactona, poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), polianhídridos) del peso molecular polimérico, de la cristalinidad polimérica, de las proporciones de copolímero, de las condiciones de proceso, del acabado superficial, de la forma geométrica, y mediante la adición de excipientes y recubrimientos poliméricos que favorezcan la difusión del fármaco, la erosión, la disolución y la ósmosis.

Las formulaciones para la administración de los fármacos mediante dispositivos o insertos oculares pueden combinar uno o más agentes activos y adyuvantes apropiados para la vía de administración indicada. Por ejemplo, los agentes activos pueden mezclarse con cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable, lactosa, sacarosa, almidón en polvo, ésteres celulósicos de ácidos alcanóicos, ácido esteárico, talco, estearato magnésico, óxido magnésico, sales de sodio y calcio de los ácidos fosfórico y sulfúrico, goma acacia, gelatina, alginato sódico, polivinilpirrolidina y/o poli(alcohol vinílico), en tabletas o cápsulas de administración convencional. Alternativamente, los compuestos pueden disolverse en polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, etanol, aceite de maíz, aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma de tragacanto y/o varios tampones. Los compuestos también se pueden mezclar con composiciones de polímeros, tanto biodegradables como no biodegradables, y con un vehículo o diluyente de características retardantes. Como ejemplos representativos de composiciones biodegradables cabe citar: albúmina, gelatina, almidón, celulosa, dextranos, polisacáridos, poli(D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-glicólido), poli(glicólido), poli(hidroxibutirato), poli(alquilcarbonato) y poli(ortoésteres), y mezclas de los mismos. Como ejemplos representativos de polímeros no biodegradables cabe citar los copolímeros de EVA, el caucho de silicona y el poli(metilacrilato), y mezclas de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas de administración ocular también incluyen una composición acuosa gelificable in situ. Dicha composición contiene un agente gelificante en una concentración efectiva para promover la gelificación en contacto con el ojo o con el fluido lagrimal. Como agentes gelificantes adecuados cabe citar, de manera no excluyente, los polímeros termoendurecibles. Tal como se emplea aquí, la expresión "gelificable in situ" no solo incluye líquidos de baja viscosidad que forman geles al entrar en contacto con el ojo o con el fluido lagrimal, sino que también líquidos más viscosos tales como los geles semifluidos y tixotrópicos que muestran un aumento considerable de la viscosidad o de la rigidez del gel tras la administración ocular. Véase, por ejemplo, Ludwig (2005), por sus ejemplos de polímeros utilizables en la administración ocular de fármacos.

V. Kits

5 Aquí también se revelan kits, p.ej. kits para fines terapéuticos. Un kit puede contener uno o más compuestos como los aquí descritos, p.ej. en dosis medidas previamente. Un kit puede contener opcionalmente dispositivos para poner en contacto las células con los compuestos e instrucciones de uso.

10 Los dispositivos incluyen jeringas, bombas implantables, como minibombas y microbombas, y otros dispositivos de uso oftálmico.

15 Aquí también se revelan combinaciones terapéuticas que llevan el agente terapéutico A y otro agente terapéutico (los mismos utilizados en terapias y composiciones combinadas) en formas de dosificación separadas, pero relacionadas entre sí. Tal como se usa aquí, la expresión "relacionadas entre sí" significa que las formas de dosificación separadas se empaquetan juntas o se unen entre sí para poder ver fácilmente que están destinadas a venderse y administrarse como parte del mismo régimen de tratamiento. El compuesto y el otro agente se empaquetan preferiblemente juntos en un blíster u otro envase multicámara, o bien aparte en recipientes sellados y conectados (como bolsas de aluminio o similares) que el usuario puede separar (p.ej. rasgando la línea marcada entre los dos recipientes).

20 En otra forma más de ejecución, la presente revelación proporciona un kit que contiene en recipientes separados a) un compuesto de la presente invención y b) otro agente terapéutico como los descritos en otra parte de la exposición.

EJEMPLOS

Materiales

25 El [3H] GW559090 se sintetizó a medida en Amersham de manera que contuviera cinco átomos de 3H por molécula, proporcionando así una actividad específica de 76 Ci/mmol.

30 Todos los estudios con animales se realizaron utilizando ratones C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad, adquiridos en Jackson Labs (Bar Harbor, ME).

Unión y adhesión celular

35 Se cultivaron células Jurkat J6 (línea celular de linfoblastos humanos) suspendidas en RPMI 1640 suplementado con FCS (10%) y glutamina (2 mM). Se cultivaron células RPMI8866 (línea celular linfóide B humana) suspendidas en RPMI 1640 suplementado con FCS (10%) y glutamina (2 mM). Se cultivaron células RBL-2H3 (línea celular basófila de rata) en medio Eagle modificado con sales de Earle y suplementado con L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, 1 x aminoácidos no esenciales, piruvato de Na 1 mM, suero de ternera fetal inactivado térmicamente al 10%.

40 **Ensayo de saturación de J6 (ensayo de filtración):** se determinó la unión del compuesto de la fórmula I en células J6 humanas que expresan VLA-4. Las células J6 se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 500 g y se resuspendieron en tampón de ensayo (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, glucosa 2 mM, MnCl₂ 1 mM). Cada pocillo contenía 1 x 10⁶ células y 10 µM de GW559090 frío, para definir las UNE (uniones no específica), o tampón. Se añadió [3H] GW559090 (0,02-50 nM) en un volumen final de 500 µl y se incubó durante 2 horas a 37°C. El [3H] GW559090 unido se separó del libre por filtración rápida al vacío a través de unos filtros Whatman GF/B previamente empapados, seguida de tres lavados en tampón enfriado con hielo; a continuación se añadió centelleante a los discos filtrantes y se midieron las desintegraciones por minuto en un contador de centelleo Beckman. La cantidad real de [3H] GW559090 añadida para cada concentración de la curva de saturación se midió contando las desintegraciones de un alícuota de 50 µl del intervalo de dilución marcado.

45 **Ensayo de unión de saturación en células RBL-2H3 (ensayo SPA):** el tampón de ensayo contenía HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, MnCl₂ 1 mM, pH 7,5 (con NaOH). Se usó 1 mg/pocillo de perlas WGA SPA. Las células se recogieron y se resuspendieron en tampón de ensayo y se agregó 1 millón de células por pocillo en una placa de fondo blanco. Se añadió GW559090 frío para dar una concentración de ensayo final de 20 µM (a fin de definir la unión inespecífica) o solo tampón y después se agregó [3H] GW559090 a lo largo de un intervalo de concentración a través de la placa (el intervalo de concentración nominal del [3H] GW559090 fue de 0,01 hasta 200 nM). El volumen final del ensayo fue de 250 µl. La placa se incubó a 37°C durante 2 h. Las desintegraciones se contaron por centelleo (de las perlas WGA SPA) en un lector de placas Wallac Microbeta.

50 La cantidad real de [3H] GW559090 añadido para cada concentración de la curva de saturación se midió contando las desintegraciones por minuto de un alícuota de 50 µl del intervalo de dilución marcado.

55 **Ensayo de adhesión celular a VCAM:** se recubrieron placas de microvaloración de poliestireno de 96 pocillos con IgG a una concentración de 0,05 mg/ml en tampón de bicarbonato durante 2 horas a 37°C. Se aspiró la solución y las placas se lavaron dos veces con PBS. Las placas se incubaron luego por la noche a 4°C con una dilución 1: 4000 de VCAM-1 del 3% de BSA en PBS. Antes de usar la VCAM-1 se aspiró y las placas se lavaron dos veces con PBS.

60 Se marcaron células J6 o RPMI (dependiendo de lo requerido) con el colorante fluorescente BCECF-AM (10 µM y 6 x 10⁶ células/ml) durante 10 minutos a 37°C, antes de eliminar el exceso por centrifugación a 500 g durante 5 minutos, y las células se resuspendieron a una concentración celular de 1,2 x 10⁷ células/ml en HBSS. Se añadieron volúmenes iguales de HBSS que contenía el compuesto de la fórmula I (en un intervalo de concentración de 38,1 pM a 10 µM) y

células a las placas recubiertas con VCAM-1. Tras 30 minutos de incubación a 37°C se eliminaron las células libres o débilmente adheridas invirtiendo la placa y secándola sobre papel absorbente. Después de dos lavados con PBS y el secado se agregó Triton X-100 (2% v/v). Las placas se contaron en un Wallac Viktor. Los compuestos que inhibieron la adhesión dieron como resultado una lectura de fluorescencia más baja.

- 5 **Ensayo de adhesión celular a MAdCAM:** se recubrieron placas de microvaloración de poliestireno de 96 pocillos con IgG a una concentración de 0,05 mg/ml en tampón de bicarbonato durante 2,5 horas a 37°C. Se aspiró la solución y las placas se lavaron dos veces con PBS. Las placas se incubaron luego durante la noche a 4°C con MAdCAM a una concentración de 204,0 ng/ml de BSA al 3% en PBS. Antes de utilizar la MAdCAM se aspiró y las placas se lavaron dos veces con PBS. Se marcaron células J6 o RPMI (según lo requerido) con el colorante fluorescente BCECF-AM (10 µM y 6 x 10⁶ células/ml) durante 10 minutos a 37°C, antes de eliminar el exceso por centrifugación a 500 g durante 5 minutos, y las células se resuspendieron a una concentración celular de 1,2 x 10⁷ células/ml en HBSS. Se agregaron volúmenes iguales de HBSS que contenía el compuesto de la fórmula I (en un intervalo de concentración de 38,1 pM a 10 µM) y células a las placas recubiertas con MAdCAM. La adhesión tuvo lugar durante una incubación de 30 minutos a 37°C. Las células libres o poco adheridas se eliminaron invirtiendo la placa y secándola sobre papel absorbente.
- 10
- 15 Tras dos lavados con PBS y el secado se agregó Triton X-100 (2% v/v). Las placas se contaron en un Wallac Viktor.
- Ensayo de adhesión celular a CS-1:** se recubrieron placas de microvaloración de poliestireno de 96 pocillos con el CS-1 (segmento conector 1, un dominio de unión celular de fibronectina) a una concentración de 0,01 mg/ml en tampón de bicarbonato durante la noche a 4°C. Se aspiró la solución y las placas se lavaron dos veces con PBS. Luego, las placas se incubaron a temperatura ambiente en presencia de BSA al 3% durante 60 minutos, se sacudieron para expulsar la BSA y se lavaron dos veces en tampón de bicarbonato. Se marcaron células J6 o RPMI (según lo requerido) con el colorante fluorescente BCECF-AM (10 µM y 6 x 10⁶ células / ml) durante 10 minutos a 37°C, antes de eliminar el exceso por centrifugación a 500 g durante 5 minutos, y las células se resuspendieron a una concentración celular de 1,2 x 10⁷ células/ml en HBSS. Se añadieron volúmenes iguales de HBSS que llevaba el compuesto de la fórmula I (en un intervalo de concentración de 19,0 pM a 5 µM) y células a las placas recubiertas con CS-1. La adhesión tuvo lugar durante una incubación de 30 minutos a 37°C. Las células libres y débilmente adheridas se eliminaron invirtiendo la placa y secándola sobre papel absorbente. Tras dos lavados con PBS y el secado Triton X-100 (2% v/v). Las placas se contaron en un Wallac Viktor.
- 20
- 25

Inducción del estrés desecante, régimen de tratamiento

- 30 Se sometieron ratones C57BL/6 hembra, de 6 a 8 semanas de edad, a DS durante 5 días (DS5), como se ha descrito previamente (de Paiva y otros, 2006b; Niederkorn y otros, 2006). El tratamiento bilateral tópico con 1 gota ocular por cada ojo (volumen de 2 µl) o una inyección subcutánea (volumen de 4 µl), 2 veces al día, se inició el día 1 coincidiendo con el DS y continuó hasta el día 4. El tratamiento con el compuesto de la fórmula I o con fosfato de dexametasona al 0,1% se comparó con los correspondientes controles tratados con vehículo. Los ratones fueron asignados al azar para recibir uno de los productos de ensayo. Los ratones de control estuvieron en un ambiente no estresado (NS) mantenido a una humedad relativa del 50-75%, sin exposición a la corriente de aire o a la escopolamina, y no se trataron con un producto de ensayo o control. Los efectos del tratamiento se evaluaron mediante la tinción de la córnea con dextrano verde Oregón (OGD), la expresión de marcadores inflamatorios en tejidos de la superficie ocular por PCR en tiempo real, el análisis de la población celular en los ganglios linfáticos cervicales drenantes mediante análisis por FACS, y la infiltración de células T conjuntivales por inmunohistoquímica.
- 35
- 40

Tinción de la córnea con OGD

- 45 La mañana del quinto día los ratones recibieron una dosis s.c. de escopolamina. Dos horas más tarde se evaluó la tinción de la córnea utilizando dextrano verde Oregón (OGD-488), que es un tinte fluorescente conjugado de un tamaño molecular de 70 kDa (sondas moleculares de Invitrogen), como se ha descrito anteriormente (de Paiva y otros, 2006b). El procedimiento consistió en instilar 0,5 µl de OGD en la córnea con una pipeta capilar de vidrio, 1 minuto antes de la eutanasia. Los ratones fueron sacrificados por inhalación de gas isoflurano, seguida de dislocación cervical. Luego se enjuagaron los ojos con 2 ml de BSS. El exceso de líquido se secó cuidadosamente de la superficie ocular con papel de filtro, sin tocar la córnea. Se tomaron imágenes digitales de ambos ojos con un microscopio estereoscópico Nikon SMZ-1500, siendo el tiempo de exposición de 2 segundos y las longitudes de onda de excitación y emisión de 470 nm y 488 nm, respectivamente. Se evaluaron ambos ojos de cada animal; siempre primero el ojo derecho, seguido del ojo izquierdo. La intensidad media en la córnea central se evaluó a partir de las imágenes digitales con el programa NIS Elements (versión 3.0) situando una región fija de interés (un círculo de 2 mm de diámetro) sobre la córnea central. El programa leyó la intensidad media de la fluorescencia y la almacenó en una base de datos (Microsoft Excel). Esta medición de fluorescencia en el anillo central fue realizada independientemente por 2 observadores enmascarados, en cada ojo del ratón. Al terminar el experimento se promediaron los resultados de ambos observadores usando todos los datos recopilados durante todas las semanas de estudio (Microsoft Excel). Los resultados están expresados como media geométrica e intervalo de confianza del 95% de los niveles de gris.
- 50
- 55
- 60

Aislamiento de ARN y transcripción inversa

- 65 Se aisló ARN total de los epitelios corneales y conjuntivales, recogidos y agrupados en cada momento de los 2 ojos (derecho e izquierdo), de ratones de control no tratados, ratones sometidos a DS durante 5 días (DS5), ratones DS5 tratados por vía tópica con el compuesto de la fórmula I (30 mg/ml) y animales tratados con vehículo (n = 7/grupo),

empleando un kit de aislamiento de ARN PicoPure™ (Acturus Bioscience Inc, Mountain View, CA, EUA) siguiendo el protocolo del fabricante. Resumiendo, se rasparon las células epiteliales de la córnea y toda la conjuntiva se cortó y se introdujo en 100 µl de tampón de extracción y se incubó a 42°C durante 30 minutos. El extracto celular, que había sido centrifugado, tratado con DNasa (Qiagen, Valencia, CA, EUA) y lavado dos veces con dos tampones de lavado diferentes, se cargó en una columna purificada preacondicionada. El ARN se eluyó en 12 µl de tampón de baja fuerza iónica. La concentración de ARN se midió por absorción a 260 nm, utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), y las muestras se conservaron a -80°C hasta su uso. La primera cadena de ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total con hexámeros aleatorios, usando la transcriptasa inversa M-MuLV (Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads; Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ) como se describió anteriormente (de Paiva y otros, 2006a).

Reacción en cadena absoluta de la polimerasa en tiempo real

Se usó un alícuota de ADNc (1-4 µl) de las muestras destinadas a la PCR en tiempo real diluido en un volumen total de 10 µl que contenía lo siguiente por reacción: 0,3 µl de las sondas Taqman específicas de genes empleadas y 5 µl de 2X Taqman Fast PCR Master Mix, (Applied Biosystems). La PCR en tiempo real se realizó en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems) y los parámetros consistieron en una desnaturalización previa a 95°C durante 22 segundos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 seg., hibridación y extensión a 60°C durante 20 seg. Las muestras y los patrones se analizaron por duplicado. En todos los ensayos se incluyó un control sin molde y ARN total sin retrotranscripción para evaluar la PCR y la contaminación con ADN de los reactivos utilizados. Se usaron las siguientes sondas Taqman de ratón: IL-1 α (Mm00439620); MMP-9 (Mm00442991); CXCL9 (Mm004434946); TGF- β 1 (Mm00441724) y HPRT-1 (Mm00446968). El gen HPRT-1 se usó como referencia endógena para cada reacción. Los resultados de la PCR cuantitativa se analizaron usando el método comparativo C_T, donde el cambio objetivo = 2- $\Delta\Delta$ C_T. Los resultados se normalizaron respecto al valor C_T de la HPRT-1 del grupo de control no tratado (de Paiva y otros, 2006b).

Diseción de los ganglios linfáticos drenantes

Se extirparon quirúrgicamente los ganglios linfáticos cervicales (GLC) drenantes, se colocaron en una placa de cultivo redonda con ~ 8 ml de medio RPMI completo y se aplastaron entre dos portaobjetos esmerilados.

Citometría de flujo

Se prepararon suspensiones unicelulares de GLC de ratones C57BL/6, tratados en condiciones DS durante 1 día, se centrifugaron y se filtraron secuencialmente del modo previamente descrito (de Paiva y otros, 2009a). Luego se añadió 1,0 ml de solución ACT durante 30 segundos seguido de 2,0 ml de RPMI completo. Las células se centrifugaron una vez más y se aspiró el sobrenadante. Las células se volvieron a suspender en 2,0 ml de RPMI completo y se prepararon para el recuento. Se usaron diez µl de azul de tripano para el recuento y las células se repartieron en tubos a 1×10^6 células/ml. A continuación las células se incubaron sobre hielo en 20 µl de CD16/CD32 anti-ratón no conjugado (BD Pharmingen, San Diego, CA), seguido de 80 µl de anticuerpo primario conjugado directamente o isotipo. Por último las muestras se lavaron con 1 ml de PBS/1% de FBS, se centrifugaron y se resuspendieron en 0,3 ml de PBS/1% de FBS que contenía 1:1000 de PI. Las muestras se conservaron a 4°C hasta la realización del análisis con un citómetro de mesa BD LSR II. Los datos se analizaron con el programa BD Diva (BD Pharmingen) y FlowJo (TreeStar Inc).

Infiltración de células T conjuntivales

Para el análisis inmunohistoquímico se extirparon los ojos y anexos de 5 ratones/grupo (n = 5), se embebieron en el compuesto OCT (VWR, Suwanee, GA) de temperatura óptima de corte y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Se cortaron secciones sagitales de 8 µm con un criostato (HM 500; Micron, Waldorf, Alemania) y se colocaron sobre portaobjetos de vidrio que se conservaron a -80°C. Se realizó un análisis inmunohistoquímico para detectar y contar las células en el epitelio conjuntival y en el estroma teñidos positivamente con CD4 (clon H129.9, 10 µg/ml, BD Bioscience, San Diego, CA). Las criosecciones se tiñeron con el anticuerpo primario mencionado anteriormente y un anticuerpo secundario biotinilado apropiado (BD Pharmingen) y Vectastain Elite ABC, empleando reactivos NovaRed (Vector, Burlingame, CA). El anticuerpo secundario solo y el isotipo anti-ratón apropiado (BD Biosciences) también se usaron como controles. Se examinaron y fotografiaron dos secciones de cada animal con un microscopio provisto de una cámara digital (Eclipse E400 con un DS-FM; Nikon). Las células teñidas positivamente se contaron en el área rica en células caliciformes de la conjuntiva, abarcando una longitud de al menos 500 µm del epitelio, a una distancia de 500 µm, mediante un programa de análisis de imágenes (NIS Elements Software, versión 3.0, BR, Nikon).

Análisis estadístico

Debido a la distribución sesgada de los datos de OGD, el análisis se realizó en la escala log₁₀, a fin de que los datos se distribuyeran más normalmente. Se promediaron los datos de log₁₀OGD de dos observadores y de los ojos izquierdo y derecho. El modelo ANOVA de efectos mixtos incluyó el grupo de tratamiento como un efecto fijo y la semana como un efecto aleatorio. Se crearon intervalos de confianza del 95% y del 99% para la enfermedad (DS de 5 días frente al grupo no tratado mantenido en un vivero separado) y los efectos del tratamiento con el compuesto (tratamiento frente

a vehículo). Como todas estas comparaciones fueron planificadas previamente (comparando cada tratamiento con su grupo de vehículos), no se hizo ningún ajuste para la multiplicidad. Las estimaciones del efecto del tratamiento a escala \log_{10} y los límites de confianza se convirtieron nuevamente a la escala OGD original, representando así la estimación de la relación de las medias geométricas del grupo y sus límites de confianza. Para el análisis de la expresión génica se realizó una prueba T de datos independientes, a fin de comparar el tratamiento con el fármaco y el vehículo. Para el análisis de citometría de flujo se usó un ANOVA bidireccional con tratamiento fijo y efectos experimentales aleatorios a fin de comprobar las diferencias de tratamiento. El análisis fue seguido por una prueba de comparación múltiple de Dunnett para comparar cada uno de los grupos de tratamiento con el grupo del vehículo. La densidad de células T se calculó para cada sección y se promedió entre las secciones de cada animal. Como la distribución de los datos de densidad celular promedio no era normal, se analizó por métodos no paramétricos (procedimiento de Kruskal-Wallis, seguido de la técnica de comparaciones múltiples de Dunn).

Ejemplo 1 (estado técnico anterior). Farmacología del GW559090

La unión de [3H] GW559090 a células J6 humanas fue saturable y se describió en estos ensayos mediante un único sitio de unión, con una Kd media de 0,19 nM (0,08-0,43) (media geométrica y 95% de LC) procedente de 4 ensayos separados. También se comprobó un único sitio de unión de alta afinidad del [3H] GW559090 a células RBL-2H3 de rata que expresan $\alpha 4\beta 1$ de rata; Kd media 1,04 nM (0,58-1,89).

Se determinó la inhibición de la adhesión celular de $\alpha 4\beta 1$ (células Jurkat J6) a VCAM-1 y al segmento CS-1 (dominio de fibronectina), y de $\alpha 4\beta 7$ (células RPMI 8866) a MAdCAM en placas de microvaloración recubiertas. El GW559090 inhibió la adhesión de las células J6 a VCAM-1, de forma monofásica, con una CI50 media de 7,72 nM (2,39 -24,9). El GW559090 también inhibió la adhesión de las células J6 a CS-1, con una CI50 media de 8,04 nM (3,05-21,2), y a MAdCAM, de forma bifásica, lo cual corrobora la presencia de un sitio de alta y baja afinidad para la unión de MAdCAM - GW559090 en las células J6. La unión RPMI 8866 - MAdCAM mide predominantemente la adhesión celular mediada por $\alpha 4\beta 7$. El GW559090 inhibió la adhesión celular de RPMI 8866 a MAdCAM, con una IC50 de 23,0 nM (20,0-26,4). El GW559090 también inhibió la unión de RPMI 8866 a VCAM-1 y CS-1 de forma monofásica simple, con unas CI50 respectivas de 4,81 nM (2,82-8,20) y 24,5 nM (valores duplicados idénticos).

Tabla 1. Unión de [3H] GW559090 a integrinas $\alpha 4$ e inhibición de la adhesión celular

Unión (Kd)	$\alpha 4\beta 1$ humana	0,19 nM
	$\alpha 4\beta 1$ de rata	1,04 nM
Inhibición de la adhesión celular (CI50)	$\alpha 4\beta 1$ - VCAM-1	7,72 nM
	$\alpha 4\beta 1$ - CS-1	8,04 nM
	$\alpha 4\beta 7$ - MAdCAM	23,0 nM

Asimismo se había referido que el compuesto de la fórmula I era muy selectivo frente a integrinas no $\alpha 4$, incluida la LFA-1 (Ravensberg y otros, 2006). En los ensayos de unión a radioligandos con 53 receptores y 4 transportadores no observó ninguna inhibición significativa mediante el compuesto de la fórmula I (a 10 μ M) en un examen MDS Pharma screen.

Ejemplo 2 (estado técnico anterior). El tratamiento tópico con el compuesto de la fórmula I evita la ruptura de la barrera corneal inducida por desecación.

Encontramos un aumento significativo de la permeabilidad de la córnea, medida por tinción con OGD, entre los grupos no estresados (NS), no tratados, y los grupos de control de ojo seco (DS5, **FIG. 1**). Como se ha referido que la terapia con corticosteroides mejora la enfermedad epitelial corneal del ojo seco tanto en humanos como en ratones (de Paiva y otros, 2006a; de Paiva y otros, 2006b; Marsh y Pflugfelder, 1999), utilizamos el tratamiento tópico con Dexametasona (Dex) como control positivo. El tratamiento con 0,1% de Dex mejoró significativamente los valores de intensidad de la tinción con OGD. Se estudió un nivel de dosificación del compuesto de la fórmula I tan bajo como 1 mg/ml y tan alto como 30 mg/ml. Se observó una disminución significativa de los valores de intensidad de la tinción con OGD para concentraciones crecientes del compuesto de la fórmula I respecto a su vehículo. La concentración más eficaz fue de 30 mg/ml (**FIG. 1**), que por lo tanto se usó en los estudios subsiguientes.

Ejemplo 3 (estado técnico anterior). El compuesto de la fórmula I actúa tópicamente sobre la superficie ocular.

Para explorar el efecto de la administración sistémica del compuesto de la fórmula I sobre la tinción de la córnea se compararon dos vías de administración, la tópica con la subcutánea (SC). Se administró una dosis idéntica por vía SC (120 μ g en bolos de 4 μ l) y tópica (60 μ g en gotas de 2 μ l a cada ojo). Los ratones que recibieron el compuesto de la fórmula I por vía sistémica también recibieron gotas del vehículo por vía tópica. Como muestra la **FIG. 2**, y de manera similar la **FIG. 1**, la dexametasona tópica disminuyó la absorción de OGD. El tratamiento tópico con el compuesto de la fórmula I disminuyó de nuevo significativamente la disrupción de la barrera corneal inducida por DS, respecto a su vehículo. Este efecto no se observó al administrar el compuesto de la fórmula I por vía sistémica. Estos resultados indican que el efecto terapéutico local del compuesto de la fórmula I se logra con la administración tópica en forma de

gotas oculares tradicionales, lo cual representa un hallazgo sorprendente, dado el papel conocido de las integrinas en el tráfico de leucocitos desde el torrente sanguíneo, que debería requerir una exposición sistémica al medicamento. Esta acción local del fármaco administrado tópicamente sugiere un nuevo mecanismo de acción para un antagonista de la integrina $\alpha 4$.

5 Ejemplo 4 (estado técnico anterior). El tratamiento tópico con el compuesto de la fórmula I disminuye los marcadores inflamatorios en la superficie ocular.

10 La EOS suele ir acompañada de un aumento de las citocinas relacionadas con las células T, de las metaloproteinasas de la matriz y de las citocinas inflamatorias en la córnea y en la conjuntiva (Coursey y otros, 2014; de Paiva y otros, 2009a; Yoon y otros, 2010). Investigamos la expresión de IL-1 α , TGF- $\beta 1$, MMP-9 y CXCL-9 en la córnea y la conjuntiva utilizando ratones que fueron tratados tópicamente con el compuesto de la fórmula I a 30 mg/ml durante 5 días de DS y se compararon con ratones dosificados con vehículo. Se escogieron estos genes porque son muy inducibles por DS (Coursey y otros, 2014; de Paiva y otros, 2009a; de Paiva y otros, 2006b; de Paiva y otros, 2006a; Yoon y otros, 2007).
15 La expresión del gen de mantenimiento fue semejante, tanto en los grupos experimentales como en los controles no estresados; los grupos experimentales se calibraron respecto al control no estresado. Los resultados se presentan en la **FIG. 3**.

20 Hubo una disminución significativa de los transcritos de IL-1 α , MMP-9, TGF- $\beta 1$ y CXCL9 en las córneas tratadas con GW559090, en comparación con el control de vehículo (**FIG. 3A**). En la conjuntiva hubo una reducción significativa de la expresión de TGF- $\beta 1$, pero no hubo ningún cambio respecto a IL-1 α , MMP-9 y CXCL-9 (**FIG. 3B**). Estos resultados indican que el compuesto de la fórmula I puede disminuir los marcadores de inflamación en la superficie ocular.

25 Ejemplo 5 (estado técnico anterior). El tratamiento tópico con el compuesto de la fórmula I disminuye la activación de las células dendríticas.

Los GLC drenantes son una parte integral del ciclo inmune en la EOS (Pflugfelder y otros, 2008; Schaumburg y otros, 2011). Para determinar el impacto del compuesto de la fórmula I, dado el caso, en los GLC, los ratones se sometieron a DS durante 1 día y se trataron por vía tópica o sistémica (subcutánea; la misma dosis de 120 μ g que por vía tópica) dos veces al día con el compuesto de la fórmula I. Los ratones a los que se administró el fármaco por vía subcutánea recibieron simultáneamente vehículo por vía tópica en ambos ojos para simular la humectación de la superficie ocular producida por una gota ocular tópica. Los GLC drenantes se extirparon y se prepararon para el análisis por citometría de flujo de las células T (CD4, CD8), monocitos (CD11b), células dendríticas (CD11c) y MHC II.

35 Un día de DS produjo un incremento significativo de monocitos CD11b⁺ en los GLC respecto a los ratones normales. Ninguna de las demás poblaciones celulares estudiadas resultaron significativamente alteradas por DS en los GLC drenantes. Ninguno de los tratamientos tuvo impacto en las poblaciones de células T o de monocitos CD11b⁺. Mientras que las células CD11c⁺ y CD11c⁺/MHC II⁺ tendieron a aumentar por DS, aunque no significativamente, el tratamiento tópico con el compuesto de la fórmula I redujo tanto las formas activadas como no activadas de CD, en comparación con el grupo de control de vehículo. Ni el tratamiento sistémico con el compuesto de la fórmula I ni el tratamiento tópico con fosfato de dexametasona produjeron el mismo efecto. Los resultados se presentan en la **FIG. 4**.

45 El hecho de que el compuesto de la fórmula I inhibiera la migración de células presentadoras de antígeno a los GLC y mejorara la tinción de la córnea en este modelo murino de ojo seco, solo al administrarlo por vía tópica, pero no por vía sistémica, es un hallazgo interesante. Sugiere un efecto local más que sistémico del antagonista de la integrina $\alpha 4$ en el tratamiento de la EOS. Este efecto local parece ser específico del antagonista de la integrina $\alpha 4$, GW559090, y diferenciado del tratamiento con los esteroides tópicos (fosfato de dexametasona), ya que el fosfato de dexametasona tópico mejoró esta tinción corneal relativa a la EOS, pero no la migración de células presentadoras de antígeno a los ganglios linfáticos drenantes. Cualquier experto en la materia puede apreciar por estas consideraciones que el efecto terapéutico del antagonismo de integrina $\alpha 4$ utiliza un mecanismo único y novedoso.

50 Ejemplo 6. Estudio FC en conejos

La sal potásica del GW559090, designada aquí como GW559090A, se administró a conejos blancos machos de Nueva Zelanda por vía ocular tópica con una sola gota bilateral (estudio #1: n = 2 conejos/4 ojos cada vez; estudio #2: n = 3 conejos/6 ojos cada vez). En los momentos indicados (0,5, 1, 3, 6 horas después de la administración) se recogieron tejidos oculares y se procesaron para su análisis. Se midieron las concentraciones de GW559090 en la córnea y en la conjuntiva bulbar por cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

60 Tras una administración tópica única de 40 μ l (50 mg/ml) se observaron valores C_{máx} en la conjuntiva bulbar 1 hora después de la dosis (T_{máx}) en ambos estudios. Las concentraciones medias en la conjuntiva disminuyeron de manera general con el tiempo y fueron cuantificables hasta 6 horas después de la dosis. Tras una administración tópica única de 40 μ l (50 mg/ml) se observaron valores medios de C_{máx} en la córnea a las 0,5 horas después de la dosis (T_{máx}) en ambos estudios. Las concentraciones medias de la córnea generalmente disminuyeron con el tiempo y fueron cuantificables hasta 6 horas después de la dosis. Las concentraciones medias en la córnea fueron más altas que las concentraciones medias en la conjuntiva a los 3 y 6 horas después de la dosis. En los tejidos de la conjuntiva y de la

córnea las concentraciones de aproximadamente 358 ng/ml persistieron hasta 6 horas (**FIG. 6**). Las concentraciones en el tejido de la conjuntiva y de la córnea fueron superiores a 3000 ng/ml a los 30 minutos y los niveles persistieron por encima de 1000 ng/ml en el tejido de la córnea a las 3 horas (**FIG. 6**).

5 Ejemplo 7. En este estudio se administró GW559090A por vía tópica ocular a conejos blancos de Nueva Zelanda durante 13 semanas. En este ejemplo las dosis y concentraciones están expresadas respecto al compuesto original, GW559090.

10 Se administró GW559090A a conejos blancos de Nueva Zelanda por vía tópica ocular durante 13 semanas. Los animales fueron dosificados seis o doce veces al día, con una hora entre cada dosis. Los grupos de tratamiento fueron: (1) vehículo (12 veces al día); (2) 30 mg/ml/cada vez, administrados seis veces al día; (3) 50 mg/ml/cada vez, administrados seis veces al día, y (4) 50 mg/ml/cada vez, administrados 12 veces al día.

15 El GW559090A se formuló como una solución madre en tampón de fosfato 25 mM con 0,5% de cloruro sódico para disponer de una solución estándar de 50 mg/ml, que se utilizó para la administración a los grupos 3 o 4, o se diluyó adicionalmente con tampón de fosfato 25 mM con 0,75% de cloruro sódico para obtener una solución de 30 mg/ml destinada a la administración del grupo 2. Los animales de control fueron tratados con el vehículo de la disolución de 50 mg/ml (tampón de fosfato 25 mM con 0,5% de cloruro sódico).

20 En el período de tratamiento de 13 semanas los conejos recibieron dosis oculares tópicas diarias de GW559090A o de vehículo a un volumen de dosificación constante de 0,06 ml (administrado 6 o 12 veces al día, con una hora entre dosis). La formulación de producto de ensayo o vehículo se dejó caer cuidadosamente en el párpado inferior del ojo derecho parcialmente evertido, desde una distancia adecuada, para evitar el contacto de la pipeta de desplazamiento positivo con el ojo. Los párpados inferior y superior se juntaron suavemente durante aproximadamente cinco segundos para evitar la pérdida de dosis y ayudar a su distribución uniforme por la superficie ocular externa. El ojo no dosificado no se manipuló en ningún momento y sirvió como sitio de control del animal no tratado.

30 La instilación de GW559090A durante 13 semanas por administración ocular tópica de 30 o 50 mg/ml/cada vez, seis veces al día, o de 50 mg/ml/cada vez, 12 veces al día, con una hora entre dosis, fue bien tolerada y no causó ninguna alteración ocular ni toxicidad sistémica. El nivel de efecto adverso no observado (NEANO) fue de 50 mg/ml/cada vez, 12 veces al día, con una hora entre dosis. A esta dosis basada en los valores de la semana 13, la exposición AUC₀₋₁ (0-24) fue de 19,6 (235) ng·h/ml para los machos y 35,5 (426) ng·h/ml para las hembras; la C_{máx} fue de 38,1 ng/ml para los machos y 68,0 ng/ml para las hembras.

35 Los parámetros toxicocinéticos medios compuestos del GW559090, resultantes de los conejos macho y hembra tras la administración ocular de GW559090A, se muestran respectivamente en la **tabla 2** y en la **tabla 3**.

Tabla 2 Parámetros toxicocinéticos medios compuestos del GW559090 resultantes de los conejos macho tras la administración ocular de GW559090A

40

Parámetro	Periodo	Machos		
		Dosis de GW559090 (mg/ml)		
		30 ^a	50 ^a	50 ^b
AUC ₀₋₁ (AUC ₀₋₂₄) (ng·h/ml)	Día 1	7,86 (47,2)	14,4 (86,4)	12,1 (145)
	Semana 4	9,23 (55,4)	17,9 (107)	11,6 (139)
	Semana 13	9,10 (54,6)	17,6 (106)	NA
	Semana 14	NA	NA	19,6 (235)
C _{máx} ^c (ng/ml)	Día 1	30,8	105	66,3
	Semana 4	51,4	80,4	41,4
	Semana 13	11,8	32,2	NA
	Semana 14	NA	NA	38,1
T _{máx} ^c (h)	Día 1	0,083	0,083	0,083
	Semana 4	0,083	0,083	0,083
	Semana 13	0,083	0,083	NA
	Semana 14	NA	NA	0,5

- a. 6 dosis diarias
- b. 12 dosis diarias
- c. Después de la primera dosis diaria
- NA: No aplicable

Tabla 3 Parámetros toxicocinéticos medios compuestos del GW559090 resultantes de los conejos hembra tras la administración ocular de GW559090A

Parámetro	Periodo	Hembras		
		Dosis de GW559090 (mg/ml)		
		30 ^a	50 ^a	50 ^b
AUC ₀₋₁ (AUC ₀₋₂₄) (ng·h/ml)	Día 1	4,19 (25,1)	11,0 (66,0)	7,30 (87,6)
	Semana 4	10,6 (63,6)	12,6 (75,6)	13,1 (157)
	Semana 13	9,83 (59,0)	15,7 (94,2)	NA
	Semana 14	NA	NA	35,5 (426)
C _{máx} ^c (ng/ml)	Día 1	16,0	67,8	30,6
	Semana 4	32,4	44,4	56,6
	Semana 13	23,5	49,7	NA
	Semana 14	NA	NA	68,0
T _{máx} ^c (h)	Día 1	0,083	0,083	0,083
	Semana 4	0,083	0,083	0,083
	Semana 13	0,25	0,083	NA
	Semana 14	NA	NA	0,083

- a. 6 dosis diarias
b. 12 dosis diarias
c. Después de la primera dosis diaria
NA: No aplicable

5

10 “AUC₀₋₂₄” se refiere a AUC₀₋₁ multiplicado por el número total de dosis diarias, para representar la AUC total estimado diariamente.

Ejemplo 8. Administración ocular tópica a perros Beagle durante 13 semanas. En este estudio se usó GW559090A. En este ejemplo las dosis y las concentraciones están expresadas respecto al compuesto original, GW559090.

15 Se administró GW559090A a perros Beagle por administración ocular tópica durante 13 semanas. Los animales se dosificaron seis o doce veces al día, con una hora entre dosis. Los grupos de tratamiento fueron: (1) vehículo (12 veces al día); (2) 30 mg/ml/cada vez, administrados seis veces al día; (3) 50 mg/ml/cada vez, administrados seis veces al día, y (4) 50 mg/ml/cada vez, administrados 12 veces al día.

20 El GW559090A se formuló como una solución madre en tampón de fosfato 25 mM con 0,5% de cloruro sódico para disponer de una solución estándar de 50 mg/ml, que se utilizó para la administración a los grupos 3 o 4, o se diluyó adicionalmente con tampón de fosfato 25 mM con 0,75% de cloruro sódico para obtener una solución de 30 mg/ml destinada a la administración del grupo 2.

25 En el período de tratamiento de 13 semanas los perros recibieron dosis oculares tópicas diarias de GW559090A o de vehículo (12 veces al día) a un volumen de dosificación constante de 0,06 ml (administrado 6 o 12 veces al día, con una hora entre dosis). La formulación de producto de ensayo o vehículo se dejó caer cuidadosamente en el párpado inferior evertido del ojo izquierdo, desde una distancia adecuada, para evitar el contacto de la pipeta de desplazamiento positivo con el ojo. Los párpados inferior y superior se juntaron suavemente durante aproximadamente cinco segundos para evitar la pérdida de dosis y ayudar a su distribución uniforme por la superficie ocular externa. El ojo no dosificado no se manipuló en ningún momento y sirvió como sitio de control del animal no tratado.

30

35 La instilación del producto de ensayo en el párpado inferior del ojo izquierdo hasta 12 veces al día, a concentraciones de hasta 50 mg/ml fue bien tolerada. No hubo hallazgos atribuibles a los efectos locales o sistémicos del producto de ensayo.

35

40 En conclusión, la administración ocular tópica de GW559090 durante 13 semanas a perros Beagle de 30 o 50 mg/ml/cada vez, seis veces al día, o de 50 mg/ml/cada vez, 12 veces al día, con una hora entre dosis, fue bien tolerada y no causó ninguna alteración ocular ni toxicidad sistémica. Así, el nivel de efecto adverso no observado (NEANO) fue de 50 mg/ml/cada vez, 12 veces al día. A esta dosis, basada en los valores de la semana 13, los valores combinados de la exposición AUC₀₋₁ de machos y hembras fueron de 11,2 ng·h/ml (la AUC₀₋₂₄ estimada fue de 134 ng·h/ml); la C_{máx} fue de 28,7 ng/ml.

40

45 En la **tabla 4** y en la **tabla 5** se muestra respectivamente un resumen de los valores toxicocinéticos del GW559090 en los perros macho y hembra después de la administración ocular de GW559090A.

45

Tabla 4 Parámetros toxicocinéticos del GW559090 resultantes de los perros macho tras la administración ocular de GW559090A

Parámetro	Periodo	Dosis de GW559090 (mg/ml)		
		30 ^b	50 ^b	50 ^b
Machos				
AUC ₀₋₁ (AUC ₀₋₂₄) (ng·h/ml)	Día 1	3,82 (22,9)	18,4 (110)	36,6 (439)
	Semana 4	2,27 (13,6)	8,74 (52,4)	11,8 (142)
	Semana 13	3,81 (22,9)	6,36 (38,2)	10,2 (122)
C _{máx} ^a (ng/ml)	Día 1	7,41	52,8	69,7
	Semana 4	5,30	24,2	23,8
	Semana 13	7,03	13,2	26,8
T _{máx} ^a (h)	Día 1	0,5	0,083	0,375
	Semana 4	0,25	0,167	0,25
	Semana 13	0,5	0,25	0,25

- a. Después de la primera dosis diaria
 b. 6 dosis diarias
 c. 12 dosis diarias
 NA: No aplicable

Tabla 5 Parámetros toxicocinéticos del GW559090 resultantes de los perros hembra tras la administración ocular de GW559090A

Parámetro	Periodo	Dosis de GW559090 (mg/ml)		
		30 ^b	50 ^b	50 ^b
Hembras				
AUC ₀₋₁ (AUC ₀₋₂₄) (ng·h/ml)	Día 1	5,27 (31,6)	8,79 (52,7)	12,8 (153)
	Semana 4	4,28 (25,7)	5,26 (31,6)	6,77 (81,2)
	Semana 13	6,05 (36,3)	6,64 (39,8)	12,1 (146)
C _{máx} ^a (ng/ml)	Día 1	12,2	17,0	21,8
	Semana 4	9,34	11,4	14,5
	Semana 13	17,5	17,9	30,5
T _{máx} ^a (h)	Día 1	0,5	0,25	0,5
	Semana 4	0,375	0,25	0,167
	Semana 13	0,25	0,167	0,25

- a. Después de la primera dosis diaria
 b. 6 dosis diarias
 c. 12 dosis diarias
 NA: No aplicable

Ejemplo 9. Diseño de grupos paralelos aleatorizados, doblemente enmascarado, controlado con placebo, para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la eficacia del GW559090 en pacientes de ojo seco.

Este es un estudio de dos partes. La parte 1 se realizará en uno o más centros y es un ensayo abierto de tolerabilidad del GW559090 con reducción de dosis en voluntarios sanos. Tras la identificación de una dosis tolerable el estudio pasará a la parte 2. La parte 2 es un estudio prospectivo multicéntrico de grupos paralelos, aleatorizado, controlado con placebo, doblemente enmascarado, que evalúa la seguridad y la eficacia del GW559090 para el tratamiento de la enfermedad del ojo seco (EOS). La parte 1 tendrá como máximo dos grupos de tratamiento. Hasta 10 voluntarios sanos recibirán durante un período de 7 días 50 mg/ml de GW559090 en un ojo tres veces al día. Si 10 pacientes toleran esta dosis, el estudio pasará a la parte 2 y no se tanteará una dosis más baja. Si los 50 mg/ml se toleran mal, un segundo grupo de 10 voluntarios sanos recibirá 30 mg/ml de GW559090 tres veces al día en un ojo, durante un período de 7 días. Si esta dosis se tolera, el estudio pasará a la parte 2. La evaluación de la tolerabilidad se basará en el análisis de los hallazgos físicos y las respuestas al cuestionario de tolerabilidad. El estudio finalizará si no se tolera ninguna de las dosis. La duración máxima de la participación de cada paciente en esta fase del protocolo será de 22 días (14 días de pruebas, 7 días de GW559090, 1 día de seguimiento).

En la parte 2, aproximadamente 90 pacientes con EOS moderada hasta grave entrarán en un período de preinclusión, durante el cual recibirán tres veces al día una gota de placebo durante 14 días. Tras este período de preinclusión con placebo, los primeros 76 pacientes, aproximadamente, que aún satisfagan los criterios de inclusión y hayan tolerado la dosificación durante el período de preinclusión serán asignados al azar a uno de los dos grupos, en una proporción 2:1 (GW559090: placebo). Los pacientes serán asignados aleatoriamente a la dosis más alta tolerada de GW559090 (de la parte 1), administrada tres veces al día, o a una dosis de placebo (vehículo) tres veces al día. Los pacientes continuarán con su medicamento asignado hasta 12 semanas. La duración máxima de la participación de los pacientes en esta fase del protocolo será de 115 días (14 días de pruebas, 14 días de placebo, 84 días de tratamiento y 3 días de seguimiento).

La parte 2 del protocolo pretende establecer una prueba de concepto en una población de ojo seco. Como la eficacia observada en los modelos preclínicos no fue inferior a la de la dexametasona, es lógico esperar que se vean efectos significativos en un biomarcador fisiológico objetivo (tinción de la córnea) que refleje directamente la integridad epitelial del ojo. Un método aleatorio doble ciego es apropiado, porque hay múltiples criterios de valoración sujetos a informes sesgados, ya sea del investigador o del paciente. Se incluye un grupo de placebo (vehículo) porque en estudios previos se han visto efectos placebo pronunciados, debidos en parte al efecto lubricante de las gotas oculares de vehículo. Por lo tanto no se puede evaluar un resultado clínico sin tener en cuenta este efecto.

Ejemplo 10. Estudio para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la eficacia del GW559090 en pacientes con ojo seco.

En este estudio se examinarán inicialmente unos 200 pacientes con EOS moderada hasta grave. Se asignarán al azar aproximadamente 120 pacientes a uno de los dos grupos en una proporción 1:1 (GW559090: placebo). Los pacientes serán asignados al azar a la dosis más alta tolerada de GW559090 (p.ej. 50 mg/ml), administrada tres veces al día, o a una dosis de placebo (vehículo) tres veces al día. La duración de esta fase del estudio será de 98-101 días (14 días de preinclusión con placebo, 84 días de tratamiento y, opcionalmente, 3 días de seguimiento).

Al finalizar un análisis intermedio, otros pacientes serán aleatorizados en un estudio de intervalo de dosis con grupos paralelos. Si el análisis intermedio revela una fuerte respuesta a la dosis más alta tolerada, administrada tres veces al día, se asignarán al azar aproximadamente 200 pacientes a uno de los cinco grupos siguientes: placebo tres veces al día; 3 mg/ml tres veces al día, 30 mg/ml tres veces al día, 50 mg/ml tres veces al día o 50 mg/ml dos veces al día. Si el análisis intermedio pone de manifiesto una respuesta moderada a la dosis más alta tolerada, administrada tres veces al día, se asignarán al azar aproximadamente 140 pacientes a uno de los cuatro grupos siguientes: placebo tres veces al día, 3 mg/ml tres veces al día, 30 mg/ml de tres veces al día o 50 mg/ml de tres veces al día.

Referencias

Andonian C. Farmacocinética ocular y sistémica del GW559090, un antagonista de la integrina alfa-4, en ratones, conejos y perros tras la administración tópica. *IOVS*. 2015; 1-2

Chotikavanich S, de Paiva CS, Li DQ, Chen JJ, Bian F, Farley WJ, Pflugfelder SC. Aumento de la producción y actividad de la metaloproteínasa-9 de la matriz en la superficie ocular, en el síndrome de disfunción lagrimal. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50:3203-3209.

Cohen L.B., Nanau R.M., Delzor F., Neuman M.G. Terapias biológicas en la enfermedad inflamatoria del intestino. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*. 2014; 163:533-556.

Contreras-Ruiz L, Mir F, Turpie B, Krauss A. El Síndrome de Sjögren relacionado con el ojo seco mejora en un modelo murino mediante la aplicación tópica del antagonista de la integrina $\alpha 4$ GW559090. *Experimental Eye Research*. 2015; 143: 1-8.

Corrales R.M., Stern M.E., de Paiva C.S., Welch J., Li D.Q., Pflugfelder S.C. El estrés desecante estimula la expresión de metaloproteinasas de la matriz por el epitelio de la córnea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47:3293-3302.

Coursey T.G., Bohat R., Barbosa F.L., Pflugfelder S.C, de Paiva C.S. La expresión de quimiocinas inducida por estrés desecante en el epitelio depende de la regulación positiva del NKG2D/RAE-1 y de la liberación del IFN-gamma en el ojo seco experimental. *J Immunol*. 2014; 193:5264-5272.

Coursey T.G., Gandhi N.B., Volpe E.A., Pflugfelder S.C, de Paiva C.S. Los receptores de quimiocinas CCR6 y CXCR3 son necesarios en la enfermedad de la superficie ocular mediada por células T CD4(+), en la enfermedad experimental del ojo seco. *PLoS One*. 2013; 8:e78508.

Cross A. H., Naismith R.T. Tratamientos establecidos para la esclerosis múltiple y nuevos tratamientos modificadores de la enfermedad. *J Intern Med*. 2014; 275:350-363.

Cox D., Brennan M., Moran N. Integrinas como dianas terapéuticas: lecciones y oportunidades. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9:804-20.

de Paiva C.S., Chotikavanich S., Pangelinan S.B., Pitcher J.D., III, Fang B., Zheng X., Ma P., Farley W.J. , Siemasko K.S., Niederkorn J.Y., Stern M.E., Li D.Q., Pflugfelder S.C. La IL-17 altera la barrera de la córnea como consecuencia del estrés desecante. *Mucosal Immunol*. 2009a; 2(3):243-253.

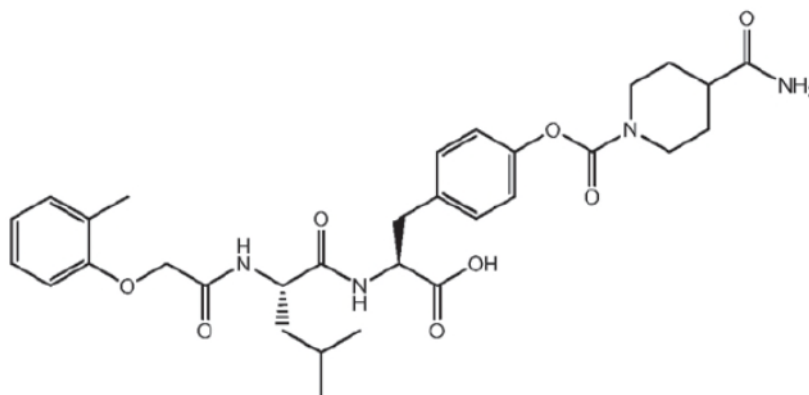
de Paiva C.S., Corrales R.M., Villarreal A.L., Farley W., Li D.Q., Stern M.E., Pflugfelder S.C. Los corticosteroides y la doxiciclina suprimen la expresión de MMP-9 y citocinas inflamatorias, y la activación de MAPK en el epitelio de la córnea del ojo seco experimental. *Exp Eye Res*. 2006a; 83:526-535.

- de Paiva C.S., Corrales R.M., Villarreal A.L., Farley W., Li D.Q., Stern M.E., Pflugfelder S.C. La alteración de la barrera apical de la córnea en el ojo seco murino experimental se anula con metilprednisolona y doxiciclina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006b; 47:2847-2856.
- 5 de Paiva C.S., Pangelinan S.B., Chang E., Yoon K.C., Farley W.J., Li D.Q., Pflugfelder S.C. Papel fundamental de la c-Jun N-terminal cinasa 2 en la respuesta epitelial de la córnea al estrés desecante. *Arch Ophthalmol.* 2009b; 127: 1625-1631.
- 10 de Paiva C.S., Volpe E.A., Gandhi N.B., Zhang X., Zheng X., Pitcher J.D., III, Farley W.J., Stern M.E., Niederkorn J.Y., Li D.Q., Flavell R.A., Pflugfelder S.C. La interrupción de la señalización de TGF-beta mejora la enfermedad epitelial de la superficie ocular en la queratoconjuntivitis seca autoinmune experimental. *PLoS One.* 2011; 6:e29017. Epub 2011 Dec 14.
- 15 Dursun D., Wang M., Monroy D., Li D.Q., Lokeshwar B.L., Stern M.E., Pflugfelder S.C. Un modelo murino de queratoconjuntivitis seca. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:632-638.
- Ecoiffier T., El Annan J., Rashid S., Schaumberg D., Dana R. Modulación de la integrina alfa4beta1 (VLA-4) en la enfermedad del ojo seco. *Arch Ophthalmol.* 2008; 126: 1695-1699.
- 20 Edwards J.C., Wilkinon L.S., Speight P., Isenberg D.A. Molécula de adhesión celular vascular-1 e integrinas alfa 4 y beta 1 de los agregados linfocitarios en el síndrome de Sjögren y en la artritis reumatoide. *Ann Rheum Dis.* 1993; 52:806-811.
- 25 Goldstein MH, Tubridy KL, Agahigian J, Furfine E, Magill M, Kovalchin J, Golden K, Zarbis- Papastoitisis G, Soong F, Salapatek AM, Sternberg G, Celniker A. Un estudio exploratorio de fase 2 de un nuevo inhibidor del receptor de la interleucina-1 (EBI-005) en el tratamiento de la conjuntivitis alérgica de moderada a grave. *Eye Contact Lens.* 2015; 41:145-55
- 30 Gutcher I., Donkor M.K., Ma Q., Rudensky A.Y., Flavell R.A., Li M.O. El factor de crecimiento transformante autocrino-beta 1 promueve la diferenciación de las células Th17 in vivo. *Immunity.* 2011; 34:396-408.
- Hou J, Townson SA, Kovalchin JT, Masci A, Kiner O, Shu Y, King BM, Schirmer E, Golden K, Thomas C, Garcia KC, Zarbis-Papastoitisis G, Furfine ES, Barnes TM. Diseño de un mejor antagonista de citocinas para uso oftálmico tópico. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110:3913-8.
- 35 Krauss A, Corrales R, Pelegrino F, Tukler-Henriksson J, Kurah E, Pflugfelder S, de Paiva C. Efectos de un nuevo antagonista de integrinas, GW559090, en un modelo experimental de ojo seco (número de programa 2472). *IOVS.* 2015; 56(7).
- 40 Krauss A, Corrales R, Pelegrino F, Tukler-Henriksson J, Kurah E, Pflugfelder S, de Paiva C. Mejora de los resultados medidos en el ojo seco con el uso de un nuevo antagonista de integrinas en el modelo murino de estrés desecante. *IOVS.* 2015; 56(10):5888-5895.
- 45 Ludwig A. Uso de polímeros mucoadhesivos en la administración ocular de fármacos. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 1595-639.
- Luo L, Li D.Q., Doshi A., Farley W., Corrales R.M., Pflugfelder S.C. El ojo seco experimental estimula la producción de citocinas inflamatorias y de MMP-9 y activa las vías de señalización de MAPK en la superficie ocular. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45:4293-4301.
- 50 Marsh P., Pflugfelder S.C. Tratamiento tópico con metilprednisolona sin conservantes para la queratoconjuntivitis seca en el síndrome de Sjögren. *Ophthalmology.* 1999; 106:81 1-816.
- 55 Massingale M.L., Li X., Vallabhajosyula M., Chen D., Wei Y., Asbell P.A. Análisis de citocinas inflamatorias en las lágrimas de pacientes de ojo seco. *Cornea.* 2009; 28: 1023-1027.
- Niederkorn J.Y., Stern M.E., Pflugfelder S.C, de Paiva C.S., Corrales R.M., Gao J., Siemasko K. El estrés desecante induce la queratoconjuntivitis lagrimal mediada por células T, similar al síndrome de Sjögren. *J Immunol.* 2006; 176: 3950-3957.
- 60 Nojima Y., Humphries M.J., Mould A. P., Komoriya A., Yamada K.M., Schlossman S.F., Morimoto C. La VLA-4 media la activación de las células T CD4+ dependiente de CD3 mediante el dominio CS1 de fibronectina alternativamente cortado. *J Exp Med* 1990; 172: 1185-92.
- 65 Pflugfelder S.C, de Paiva C.S., Li D.Q., Stern M.E. Interacción de las células inmunitarias con el epitelio del ojo seco. *Cornea.* 2008; 27 Suppl 1:S9-11.

- Pflugfelder S.C., Farley W., Luo L, Chen L.Z., de Paiva C.S., Olmos L.C., Li D.Q., Fini M.E. La inactivación knockout de la metaloproteínasa-9 de la matriz confiere resistencia a la ruptura de la barrera epitelial de la córnea en el ojo seco experimental. *Am J Pathol.* 2005; 166:61-71.
- 5 Pflugfelder S.C., Jones D., Ji Z., Afonso A., Monroy D. Alteración del equilibrio de citocinas en el líquido lagrimal y en la conjuntiva de pacientes con queratoconjuntivitis seca del síndrome de Sjögren. *Curr Eye Res.* 1999; 19:201-21 1.
- 10 Ravensberg A.J., Luijk B., Westers P., Hiemstra P.S., Sterk P.J., Lammers J.W., Rabe K.F. Efecto de una dosis única inhalada de un antagonista de la VLA-4 en las reacciones y en la inflamación de las vías respiratorias inducidas por alérgenos en pacientes con asma. *Allergy.* 2006; 61: 1097-1 103.
- 15 Investigación en ojo seco: informe del subcomité de investigación del seminario internacional de ojo seco. *Ocul Surf* 2007; 5: 179-193.
- Schaumburg C.S., Siemasko K.F., de Paiva C.S., Pflugfelder SC, Stern M.E. Las células presentadoras de antígeno en la superficie ocular son necesarias para la activación de las células T autorreactivas y para el desarrollo de la queratoconjuntivitis lagrimal autoinmune. *J Immunol.* 2011; 187:3653-3662.
- 20 Sheppard J.D., Torkildsen G.L, Lonsdale J.D., D'Ambrosio F.A., Jr., McLaurin E.B., Eiferman R.A., Kennedy K.S., Semba CP. Solución oftálmica de lifitegrast al 5,0% para el tratamiento de la enfermedad del ojo seco: resultados del estudio OPUS-1 fase 3. *Ophthalmology.* 2014; 121:475- 483.
- 25 Stern M.E., Schaumburg C.S., Dana R., Calonge M., Niederkorn J.Y., Pflugfelder S.C., Autoinmunidad en la superficie ocular: patogénesis y regulación. *Mucosal Immunol.* 2010; 3:425-442.
- Stern M.E., Schaumburg C.S., Pflugfelder S.C. El ojo seco como una enfermedad autoinmune de la mucosa. *Int Rev Immunol.* 2013; 32: 19-41.
- 30 Stockinger, B., Veldhoen M., Martin B. Células T Th17: reúnen inmunidad innata y adaptativa. *Semin Immunol.* 2007; 19:353-361.
- 35 Yoon K.C., de Paiva C.S., Qi H., Chen Z., Farley W.J., Li D.Q., Pflugfelder S.C. Expresión de quimiocinas th-1 y de receptores de quimiocinas en la superficie ocular de ratones C57BL/6: efectos del estrés desecante. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48:2561-2569.
- 40 Yoon K.C., Park C.S., You I.C., Choi H.J., Lee K.H., Im S.K., Park H.Y., Pflugfelder S.C. Expresión de CXCL9, -10, -11 y CXCR3 en la película lagrimal y en la superficie ocular de pacientes con síndrome de ojo seco. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51:643-650.
- Zhang X., Schaumburg C.S., Coursey T.G., Siemasko K.F., Volpe E.A., Gandhi N.B., Li D.Q., Niederkorn J.Y., Stern M.E., Pflugfelder S.C, de Paiva C.S. Las células CD8(+) regulan la respuesta de los linfocitos T colaboradores-17 en un modelo experimental murino del síndrome de Sjögren. *Mucosal Immunol.* 2014; 7:417-427.
- 45 Zhang X., Volpe E.A., Gandhi N.B., Schaumburg C.S., Siemasko K.F., Pangelinan S.B., Kelly S.D., Hayday A.C., Li D.Q., Stern M.E., Niederkorn J.Y., Pflugfelder S.C, de Paiva C.S. Las células NK promueven la alteración de la barrera de la córnea mediada por Th-17 en el ojo seco. *PLoS One.* 2012; 7:e36822.
- 50 Zheng X., de Paiva C.S., Rao K., Li D.Q., Farley W.J., Stern M., Pflugfelder S.C. Evaluación de la actividad del factor de crecimiento transformante beta en las lágrimas humanas del ojo normal y seco mediante un bioensayo con células CCL-185. *Cornea* 2010; 29: 1048-1054.
- Zoukhri D. Efecto de la inflamación en la función de la glándula lagrimal. *Exp Eye Res* 2006; 82:885-98.
- 55

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que contiene un compuesto de la fórmula I



- 5
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el tratamiento de una afección inflamatoria ocular mediante su administración tópica al ojo de un humano, de manera que una dosis individual del compuesto de la fórmula I o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo está comprendida en el intervalo de 0,01 mg hasta 5 mg en cada ojo afectado.
- 10
2. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, de manera que la dosis individual está comprendida en el intervalo de 0,1 mg hasta 5 mg.
- 15
3. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual se aplica a la superficie ocular, al saco conjuntival y/o al párpado.
- 20
4. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual se aplica por vía subconjuntival.
- 25
5. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de manera que la afección inflamatoria ocular es la enfermedad del ojo seco.
6. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además contiene uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 30
7. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual se formula en forma de gotas oculares, gel, ungüento, espray o nebulizador.
- 35
8. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual se formula en forma de una solución oftálmica.
9. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, de forma que la solución oftálmica contiene 30 mg/ml del compuesto de la fórmula I o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 40
10. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además contiene uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo integrado por (a) ciclosporina A; (b) un esteroide escogido del grupo integrado por dexametasona base, fosfato de dexametasona, difluprednato, fluocinolona, fluorometolona base, acetato de fluorometolona, loteprednol, acetato de prednisolona, fosfato de prednisolona, rimexolona y acetónido de triamcinolona; y (c) un agente antiinflamatorio no esteroideo escogido del grupo integrado por bromfenaco, diclofenaco, flurbiprofeno, ketorolaco y nepafenaco.

FIG. 1

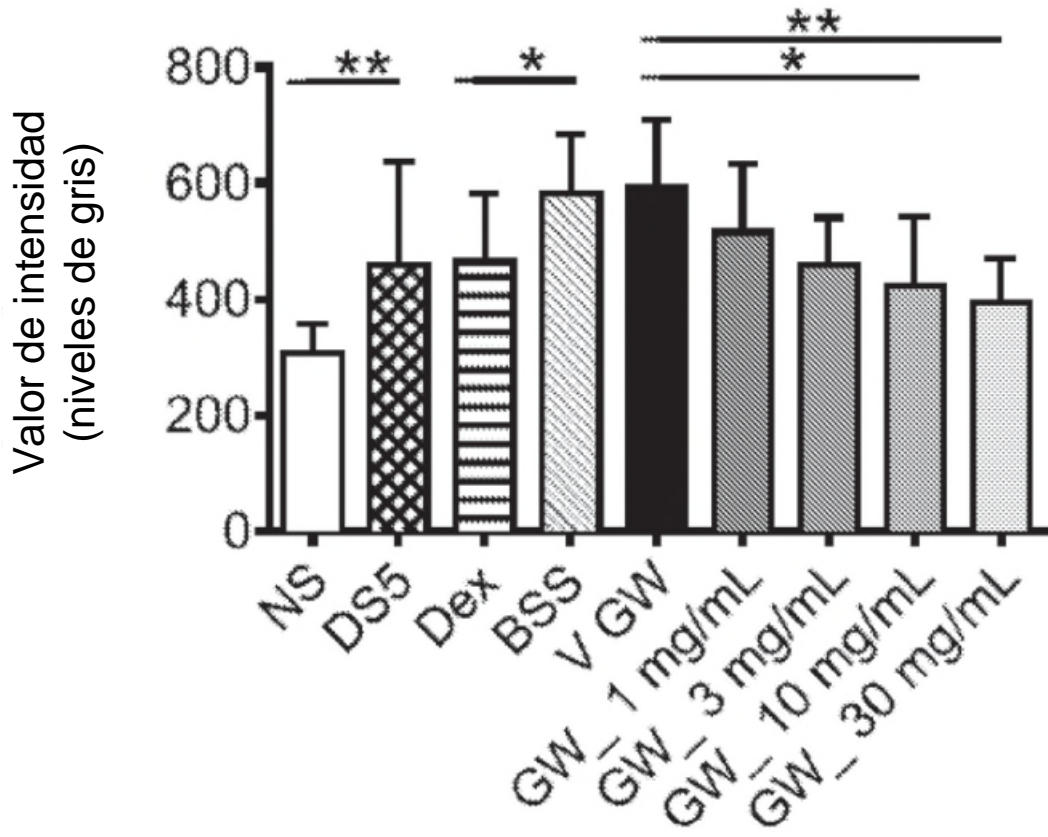


FIG. 2

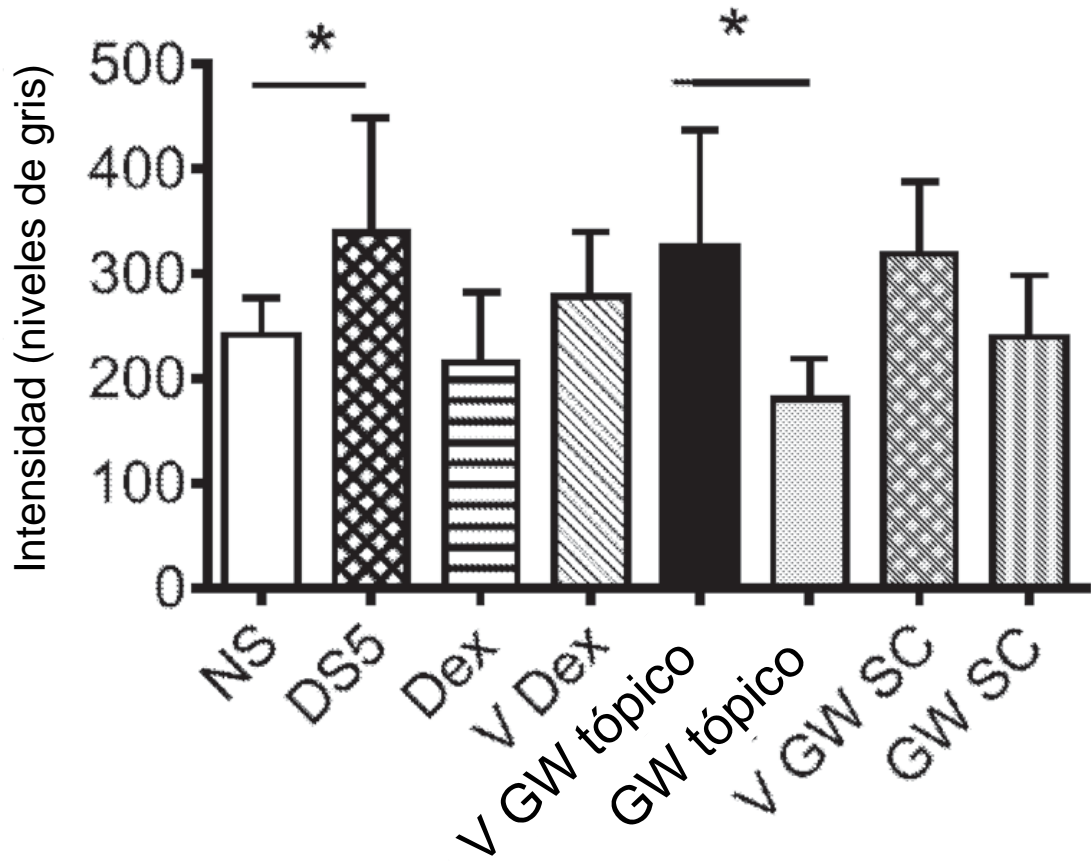


FIG. 3A

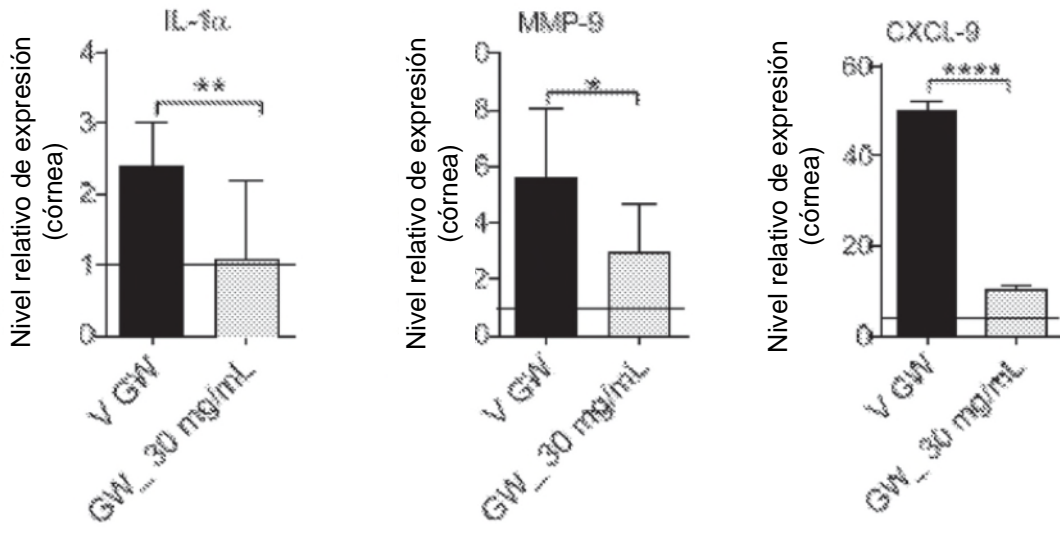


FIG. 3B

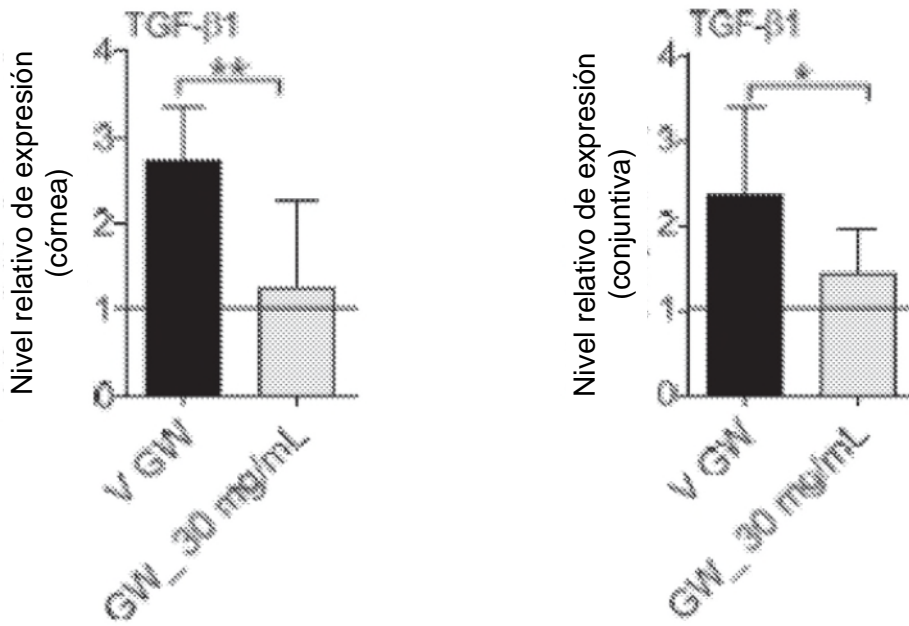


FIG. 4

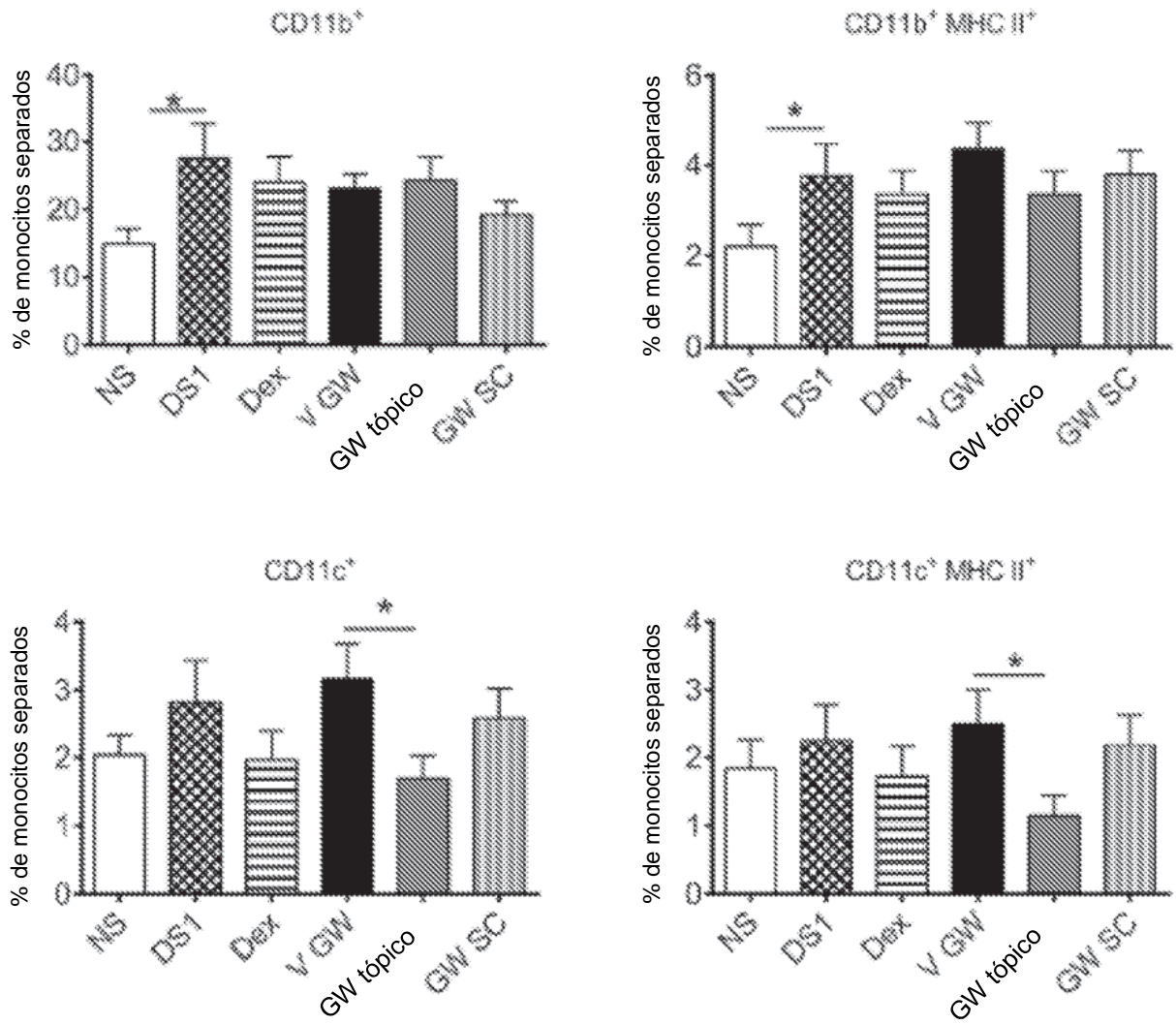


FIG. 5

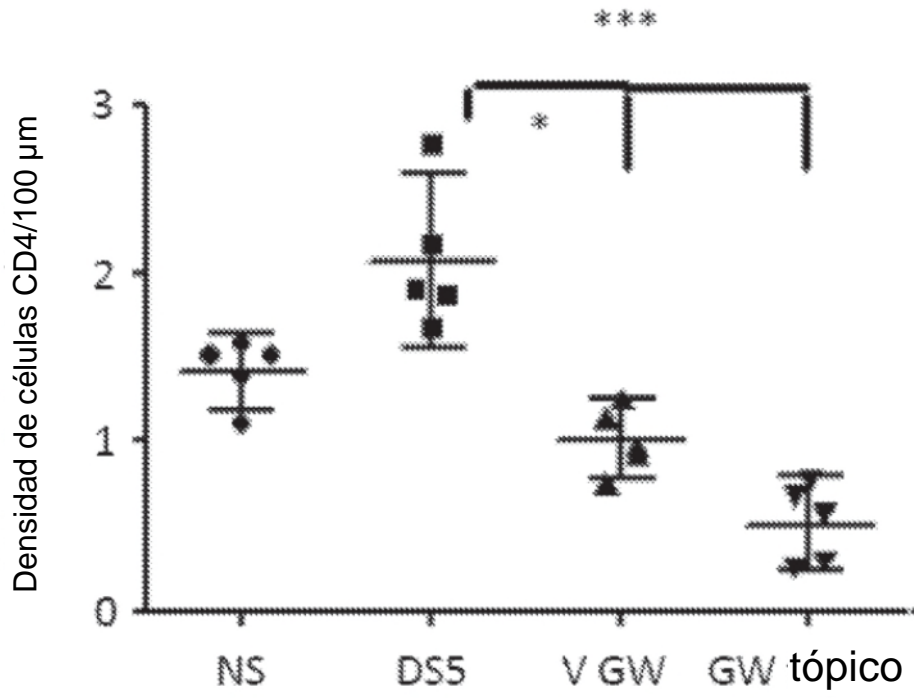


FIG. 6

