



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 311 507**

51 Int. Cl.:  
**A61K 41/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01907170 .3**

96 Fecha de presentación : **09.02.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1253943**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.11.2002**

54 Título: **Terapia fotodinámica para tratamiento de afecciones oftálmicas.**

30 Prioridad: **10.02.2000 US 181641 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.02.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2009**

73 Titular/es:  
**MASSACHUSETTS EYE & EAR INFIRMARY**  
**243 Charles Street**  
**Boston, Massachusetts 02114, US**

72 Inventor/es: **Miller, Joan W.;**  
**Gragoudas, Evangelos S. y**  
**Renno, Reem Z.**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 311 507 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

Terapia fotodinámica para tratamiento de afecciones oftálmicas.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere generalmente a usos médicos basados en terapia fotodinámica, combinaciones y composiciones para el tratamiento de afecciones oftálmicas y, más específicamente, la invención se refiere a usos médicos basados en terapia fotodinámica, combinaciones y composiciones para el tratamiento de afecciones oftálmicas caracterizadas por neovascularización coroidea indeseable.

**Antecedentes**

La neovascularización coroidea puede conducir a hemorragia y fibrosis, con pérdida visual resultante en cierto número de afecciones del ojo, que incluyen, por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad, síndrome de histoplasmosis ocular, miopía patológica, estrías angioideas, trastornos idiopáticos, coroiditis, ruptura coroidea, nevos coroideos suprayacentes, y ciertas enfermedades inflamatorias. Uno de los trastornos, a saber, la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), es la causa principal de una pérdida de visión severa en las personas de 65 años de edad y edades superiores (Bressler *et al.* (1988) *Surv. OPHTHALMOL.* 32, 375-413, Guyer *et al.* (1986) *ARCH. OPHTHALMOL.* 104, 702-705, Hyman *et al.* (1983) *AM. J. EPIDEMIOL.* 188, 816-824, Klein & Klein (1982) *ARCH. OPHTHALMOL.* 100, 571-573, Leibowitz *et al.* (1980) *SURV. OPHTHALMOL.* 24, 335-610). Aunque se han hecho descripciones clinicopatológicas, se sabe poco acerca de la etiología y patogénesis de la enfermedad.

La AMD seca es la forma más común de la enfermedad, caracterizada por “drusas”, cambios pigmentarios y atróficos en la mácula, con pérdida lentamente progresiva de la visión central. La AMD húmeda o neovascular se caracteriza por hemorragia subretinal, fibrosis y fluido secundario a la formación de neovascularización coroidea (CNV), y pérdida más rápida y pronunciada de visión. Si bien es menos común que la AMD seca, la AMD neovascular da cuenta del 80% de la pérdida de visión severa debida a la AMD. Aproximadamente 200.000 casos de AMD neovascular se diagnostican cada año en los Estados Unidos solamente.

En la actualidad no existe tratamiento alguno para la AMD seca. Hasta fecha reciente, la fotocoagulación por láser ha sido la única terapia disponible para casos seleccionados de AMD neovascular. Lamentablemente, la mayoría de los pacientes con AMD neovascular no cumplen los criterios para la terapia de fotocoagulación por láser. Aproximadamente el 85% de los pacientes con AMD neovascular dan una neovascularización coroidea subfoveal mal definida, oculta, o relativamente extensa, ninguna de las cuales es susceptible de la terapia por láser. Adicionalmente, la fotocoagulación por láser está basada en el deterioro térmico del tejido CNV, lo que daña la retina neurosensorial suprayacente con la pérdida consiguiente de la función visual. La fotocoagulación con láser está plagada también de quejas que ocurren aproximadamente en el 50% de los casos.

La terapia fotodinámica (PDT) ha mostrado resultados prometedores como nuevo tratamiento para eliminar la CNV indeseable y para tratamiento de la AMD neovascular (Miller *et al.* (1999) *ARCHIVES OF OPHTHALMOLOGY* 117: 1161-1173, Schmidt-Erfurth *et al.* (1999) *ARCHIVES OF OPHTHALMOLOGY* 117: 1177-1187, TAP study Group (1999) *ARCHIVES OF OPHTHALMOLOGY* 117: 1329-45, Husain *et al.* (1999) *PHILADELPHIA: MOSBY*; 297-307). La PDT implica la administración sistémica de un fotosensibilizador o colorante PDT (fotosensibilizador) que se acumula en los tejidos proliferantes tales como tumores y vasos sanguíneos de formación reciente; seguida por irradiación de tejido diana con luz no térmica de baja intensidad a una longitud de onda correspondiente al pico de adsorción del ojo (Oleinick *et al.* (1998) *Radiation Research*: 150: p146-p156). La excitación del colorante conduce a la formación de oxígeno singulete y radicales libres, mejor conocidos como especies de oxígeno reactivas que causan deterioro fotoquímico al tejido diana (Weishaupt *et al.* (1976) *Cancer Res.* 36:2326-2329).

Estudios que utilizaban PDT para el tratamiento de la CNV han demostrado que, con los parámetros de tratamiento apropiados de dosis de fotosensibilizador, dosis de luz láser, y sincronización de la irradiación, puede conseguirse un deterioro selectivo relativo para la CNV experimental, respetando los vasos retinales, los vasos coroideos principales, y con cambios mínimos en la retina neurosensorial (Husain *et al.* (1996) *ARCH. OPHTHALMOL.* 114: 978-985, Husain *et al.* (1997) *SEMINARS IN OPHTHALMOLOGY* 12: 14-25, Miller *et al.* (1995) *ARCH OPHTHALMOL.* 113: 910-818, Kramer *et al.* (1996) *OPHTHALMOLGY* 103(3): 427-438). Además, un procedimiento basado en PDT que utiliza un colorante verde de porfirina ha sido aprobado recientemente en una diversidad de países para uso en el tratamiento de la AMD neovascular.

Durante los estudios clínicos, sin embargo, se ha encontrado que la recurrencia de pérdida aparece en al menos una porción de la CNV al cabo de 1 a 3 meses post-tratamiento. El aumento de las dosis de fotosensibilizador o de luz no parece prevenir esta recurrencia, y puede conducir incluso a un deterioro indeseable no selectivo de los vasos retinales (Miller *et al.* (1999) *Archives of Ophthalmology* 117:1161-1173). Varias pruebas multicentro en Fase 3 se encuentran en curso para estudiar los tratamientos PDT repetidos, aplicados cada 3 meses. Los datos provisionales parecen prometedores en términos de tasas reducidas de pérdida moderada de visión (TAP Study Group (1999) *Archives of Ophthalmology* 117:1329-45). Sin embargo, puede esperarse que la necesidad de tratamientos PDT repetidos conduzca a un deterioro acumulativo del epitelio pigmentario retinal (RPE) y coriocapilar, lo que puede conducir a una pérdida progresiva de visión relacionada con el tratamiento.

Por consiguiente, existe todavía necesidad de métodos mejorados basados en PDT que aumenten la eficacia y selectividad del tratamiento, y que reduzcan o retarden una recurrencia del trastorno.

### Sumario de la invención

5

La presente invención se refiere a usos médicos basados en PDT, composiciones y (ilegible) para el tratamiento de afecciones oftálmicas asociadas con neovascularización coroidea indeseable, como se expone en las reivindicaciones que se acompañan. Tales afecciones incluyen, por ejemplo, AMD neovascular, síndrome de histoplasmosis ocular, miopía patológica, estrías angioideas, trastornos idiopáticos, coroiditis, ruptura coroidea, nevos coroideos suprayacentes, y ciertas enfermedades inflamatorias. La invención puede utilizarse en un método más eficaz basado en PDT para tratamiento de la CNV indeseable que presenta una o más de las ventajas siguientes: eficacia incrementada del tratamiento; selectividad incrementada para CNV; y recurrencia reducida o retardada de la afección subsiguiente a PDT.

10

La invención puede utilizarse en un método de tratamiento de la CNV indeseable en un mamífero, en donde la CNV comprende células endoteliales, por ejemplo, células endoteliales capilares. El método comprende los pasos de: (a) administrar al mamífero, por ejemplo, un primate, preferentemente, un humano, un factor anti-angiogénesis en una cantidad suficiente para permitir que una cantidad eficaz se localice en la CNV; (b) administrar al mamífero una cantidad de un fotosensibilizador (colorante PDT) suficiente para permitir que una cantidad eficaz se localice en la CNV; y (c) irradiar la CNV con luz láser a fin de que la luz sea absorbida por el fotosensibilizador de tal modo que ocluya la CNV. Durante la práctica de este método, el deterioro de las células endoteliales dispuestas en la neovascularización coroidea es mayor que el deterioro experimentado por las células endoteliales en un tratamiento similar que carece de la administración del factor anti-angiogénesis. Adicionalmente, el factor anti-angiogénesis puede potenciar la citotoxicidad de la PDT. Por ejemplo, el factor anti-angiogénesis y la PDT pueden actuar sinérgicamente para destruir de modo selectivo las células endoteliales capilares, al mismo tiempo que se respetan las células retinales, por ejemplo, las células epiteliales pigmentarias retinales y las células dispuestas en la retina neurosensorial, por ejemplo, las células fotorreceptoras y las células de Mueller.

20

El factor anti-angiogénesis puede mejorar la selectividad de la PDT, por ejemplo, ocluyendo la CNV al mismo tiempo que respeta los vasos sanguíneos circundantes, por ejemplo, la vasculatura coroidea y retinal normal, y/o tejido, por ejemplo, la retina neurosensorial suprayacente. De acuerdo con ello, la inclusión del factor anti-angiogénesis hace que el método PDT sea más selectivo para las células capilares endoteliales. Adicionalmente, esto puede ralentizar o retardar la recurrencia de la neovascularización coroidea.

30

Una diversidad de ácidos nucleicos, ácidos nucleicos peptídicos, péptidos, anticuerpos o factores proteínicos anti-angiogénesis pueden utilizarse en la invención. Factores anti-angiogénesis útiles incluyen, por ejemplo: angiostatina; endostatina; un péptido que contiene una secuencia tripeptídica RGD y capaz de fijar la integrina  $\alpha v \beta 3$ ; un inhibidor selectivo de COX-2; halofuginona; anecotave-acetato; anticuerpos y otros péptidos que fijan el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular; anticuerpos, otros péptidos, y ácidos nucleicos que fijan el factor de crecimiento endotelial vascular para prevenir o reducir su fijación a su receptor cognato; inhibidores de tirosina-quinasas; trombospondina-1; factor de crecimiento anti-epidérmico; factor de crecimiento de los hepatocitos; tromboxano; y factor de crecimiento pigmentario derivado del endotelio. Factores anti-angiogénicos preferidos incluyen angiostatina, endostatina y factor de crecimiento pigmentario derivado del epitelio.

40

El factor anti-angiogénesis no es un esteroide. El documento WO 99/03303 está enfocado en esteroides y se titula "The use of angiostatic steroids in photodynamic therapy".

45

El factor anti-angiogénesis puede, en ciertas circunstancias, co-administrarse simultáneamente con el fotosensibilizador. En una realización preferida, sin embargo, el factor anti-angiogénesis se administra al mamífero antes de la administración del fotosensibilizador.

50

La invención puede utilizarse en un método de tratamiento de la CNV indeseable en un mamífero. El método comprende los pasos de: (a) administrar a un mamífero, por ejemplo, un primate, preferentemente, un humano, una cantidad de un fotosensibilizador para permitir que una cantidad eficaz se localice en la CNV, comprendiendo el fotosensibilizador un resto diana que se fija preferentemente a ligandos de la superficie celular dispuestos en las células endoteliales, por ejemplo, células endoteliales capilares, presentes en la CNV; y (b) irradiar la CNV con un láser de tal modo que la luz es absorbida por el fotosensibilizador de tal manera que ocluye la CNV. Los restos diana se fijan preferentemente a la CNV y, por consiguiente, pueden aumentar la concentración eficaz de fotosensibilizador en la CNV con relación a las células y tejidos circundantes. De acuerdo con ello, dicho método aumenta la selectividad del método PDT para la CNV al tiempo que respeta los vasos sanguíneos circundantes retinales y coroideos grandes y la retina neurosensorial suprayacente.

55

60

El resto de direccionamiento puede ser cualquier molécula, por ejemplo, una proteína, péptido, ácido nucleico, ácido peptidil-nucleico, molécula orgánica o molécula inorgánica que tiene afinidad para las células endoteliales dentro de la CNV. Sin embargo, se prefieren las proteínas y péptidos diana. Por ejemplo, el péptido diana puede ser un péptido que direcciona la integrina  $\alpha v \beta 3$ , por ejemplo, la integrina  $\alpha v \beta 3$  o la integrina  $\alpha v \beta 5$ . Alternativamente, el péptido diana puede ser un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de fijación de antígeno del mismo, un anticuerpo policlonal o un fragmento de fijación de antígeno del mismo, o un sitio de fijación de anticuerpo biosintético que se fija preferentemente a un ligando de la superficie celular dispuesto a concentraciones o densidades elevadas en

65

la CNV. A modo de ejemplo, el resto diana puede ser un anticuerpo que se fija específicamente al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.

Se contempla que cualquier fotosensibilizador útil en la PDT puede ser útil en la práctica de la invención. Fotosensibilizadores preferidos incluyen, por ejemplo, derivados de aminoácidos, colorantes azoicos, derivados de xanteno, clorinas, derivados de tetrapirrol, ftalocianinas, y otros fotosensibilizadores seleccionados. Sin embargo, fotosensibilizadores preferidos incluyen, por ejemplo, lutecio-texafirina, benzoporfirina y derivados de la misma, así como hematoporfirina y derivados de la misma.

#### 10 Breve descripción de los dibujos

Lo que antecede y otros objetos, características, y ventajas de la presente invención, así como la invención propiamente dicha, pueden comprenderse más plenamente a partir de la descripción siguiente de realizaciones preferidas, cuando se leen junto con los dibujos que se acompañan, en los cuales:

Las figuras 1A y 1B son gráficos de barras que muestran la supervivencia *in vitro* de las células endoteliales capilares retinales de bovino (BRCE) (Fig. 1A) y células epiteliales retinales pigmentarias (RPE) (Fig. 1B) después de exposición a Lutecio-Texafirina (Lu-TeX)/PDT en presencia o ausencia de angiostatina. Las células se extendieron en placas y se expusieron a angiostatina 18 horas antes de Lu-TeX/PDT. La fracción superviviente se midió utilizando un ensayo de proliferación de una semana. Los datos representan el valor medio de experimentos triplicados  $\pm$  la desviación estándar.

#### Descripción detalla de la invención

De acuerdo con la presente invención se proporciona una combinación de un factor anti-angiogénesis y un fotosensibilizador, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una afección ocular de un mamífero que se caracteriza por neovascularización coroidea indeseable; en donde el factor anti-angiogénesis comprende un ácido nucleico, un ácido peptidil-nucleico, un péptido, un anticuerpo o una proteína.

La combinación puede tener una o más de las características expuestas en las reivindicaciones subordinadas 2 a 13.

La presente invención abarca también usos médicos.

La misma incluye el uso de un factor anti-angiogénesis y un fotosensibilizador en la preparación de medicamentos primero y segundo respectivamente para uso en combinación en el tratamiento de una afección ocular caracterizada por neovascularización coroidea indeseable; en donde el factor anti-angiogénesis es un ácido nucleico, un ácido peptidil-nucleico, un péptido, un anticuerpo o una proteína.

La misma incluye también el uso de un factor anti-angiogénesis y un fotosensibilizador en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección ocular caracterizada por neovascularización coroidea indeseable; en donde el factor anti-angiogénesis es un ácido nucleico, un ácido peptidil-nucleico, un péptido, un anticuerpo o una proteína.

La misma incluye adicionalmente el uso de un factor anti-angiogénesis en la preparación de un medicamento para uso en combinación con terapia fotodinámica para tratamiento de una afección ocular caracterizada por neovascularización coroidea indeseable; en donde el factor anti-angiogénesis es un ácido nucleico, un ácido peptidil-nucleico, un péptido, un anticuerpo o una proteína.

La misma incluye adicionalmente el uso de un fotosensibilizador en la preparación de un medicamento para uso en terapia fotodinámica en combinación con un factor anti-angiogénesis para tratamiento de una afección ocular caracterizada por neovascularización coroidea indeseable; en donde el factor anti-angiogénesis es un ácido nucleico, un ácido peptidil-nucleico, un péptido, un anticuerpo o una proteína.

#### Descripción detallada de la invención

La invención puede utilizarse en un método mejorado basado en PDT para el tratamiento de afecciones oculares caracterizadas por presentar una CNV indeseable. Tales afecciones incluyen, por ejemplo, AMD neovascular, síndrome de histoplasmosis ocular, miopía patológica, estrías angioideas, trastornos idiopáticos, coroiditis, ruptura coroidea, nevos coroideos suprayacentes, y ciertas enfermedades inflamatorias. La invención proporciona una o más de las ventajas siguientes: eficiencia de tratamiento incrementada; selectividad incrementada para la CNV; y recurrencia reducida o retardada de la afección después de la PDT.

La invención puede utilizarse en un método basado en PDT de tratamiento de la CNV diana indeseable. El método requiere la administración de un fotosensibilizador a un mamífero que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento en una cantidad suficiente para permitir que una cantidad eficaz (es decir, una cantidad suficiente para facilitar la PDT) del fotosensibilizador se localice en la CNV diana. Después de la administración del fotosensibilizador, la CNV se irradia luego con luz láser en condiciones tales que la luz es absorbida por el fotosensibilizador. El fotosensibilizador, cuando es activado por la luz, genera oxígeno singlete y radicales libres, por ejemplo, especies de oxígeno reactivas,

## ES 2 311 507 T3

lo que da como resultado el deterioro del tejido circundante. Por ejemplo, el deterioro de las células endoteliales inducido por PDT da como resultado adhesión y desgranulación plaquetaria, conduciendo a estasis y agregación de las células sanguíneas y oclusión vascular.

5 Un aumento en la eficacia y/o selectividad de la PDT, y/o reducción o retardo de la recurrencia de la CNV puede alcanzarse mediante administración de un factor anti-angiogénico al mamífero antes de o simultáneamente con la administración del fotosensibilizador. El fotosensibilizador puede utilizarse con una molécula de direccionamiento que dirige el fotosensibilizador a la CNV.

10 Se contempla que una diversidad de fotosensibilizadores útiles en la PDT pueden ser útiles en la práctica de la invención e incluyen, por ejemplo, derivados de aminoácidos, colorantes azoicos, derivados de xanteno, clorinas, derivados de tetrapirrol, ftalocianinas, y otros fotosensibilizadores seleccionados.

15 Derivados de aminoácidos incluyen, por ejemplo, ácido 5-aminolevulínico (Berg *et al.* (1997) PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG. 65: 403-409; El-Far *et al.* (1985) CELL. BIOCHEM. FUNCTION 3, 115-119). Colorantes azoicos incluyen, por ejemplo, Sudán I, Sudán II, Sudán III, Sudán IV, Negro Sudán, anaranjado disperso, rojo disperso, rojo de aceite O, azul tripán, rojo congo,  $\beta$ -caroteno (Mosky *et al.* (1984) Exp. Res. 155, 389-396). Derivados de xanteno incluyen, por ejemplo, rosa bengala.

20 Las clorinas incluyen, por ejemplo, lisil-clorina p6 (Berg *et al.* (1997) *supra*) y etiobenzoclorina (Berg *et al.* (1997) *supra*), 5, 10, 15, 20-tetra(m-hidroxifenil)-clorina (M-THPC), N-aspartil-clorina e6 (Dougherty *et al.* (1998) J. NATL. CANCER INST. 90: 889-905), y bacterioclorina (Korbelik *et al.* (1992) J. PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG. 12: 107-119).

25 Derivados de tetrapirrol incluyen, por ejemplo, Lutecio-Texafirina (Lu-Tex) PCI-0123 (Dougherty *et al.* (1998) *supra*, Young *et al.* (1996) PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG. 63: 892-897); derivado de benzoporfirina (BPD) (Pats. US Núms. 5.171.749, 5.214.036, 5.283.255, y 5.798.349, Jori *et al.* (1990) LASERS MED. SCI. 5, 115-120), monoácido derivado de benzoporfirina (BPD-MA) (Pat. U.S. Núms. 5.171.749, 5.214.036, 5.283.255, y 5.798.3439, Berg *et al.* (1997) *supra*, Dougherty *et al.* (1998) *supra*), hematoporfirina (Hp) (Jori *et al.* (1990) *supra*), derivados de hemato-  
30 porfirina (HpD) (Berg *et al.* (1997) *supra*, West *et al.* (1990) IN. J. RADIAT. BIOL. 58: 145-156), porfimer-sodio o Photofrin (PHP) (Berg *et al.* (1997) *supra*), Photofrin II (PII) (He *et al.* (1994) PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG. 59: 468-473), protoporfirina IX (PpIX) (Dougherty *et al.* (1998) *supra*, He *et al.* (1994) *supra*), meso-tetra-(4-carboxifenil)porfina (TCPP) (Musser *et al.* (1982) RES. COMMUN. CHEM. PATHOL. PHARMACOL. 2, 251-2599, meso-tetra-(4-sulfonato-fenil)porfina (TSPP) (Musser *et al.* (1982) *supra*), uroporfirina I (UROP-I) (El-Far *et al.* (1985)  
35 CELL. BIOCHEM. FUNCTION 3, 115-119), uroporfirina III (UROP-III) (El-Far *et al.* (1985) *supra*), estaño-etil-etioipurpurina (SnET2), (Dougherty *et al.* (1998) *supra* 90: 889-905) y 13,17-bis[1-carboxipropionil]-carbamoiletil-8-etenil-2-hidroxi-3-hidroxiiminoetilideno-2,7,12,18-tetra-metil-6-porfirin-sodio (ATX-S10(Na)) Mori *et al.* (2000) JPN. J. CANCER RES. 91:753-759, Obana *et al.* (2000) ARCH. OPHTHALMOL. 118:650-658, Obana *et al.* (1999) LASERS SURG. MED. 24: 209-222).

40 Las ftalocianinas incluyen, por ejemplo, cloroaluminio-ftalocianina (AlPcCl) (Rerko *et al.* (1992) Photochem. Photobiol. 55, 75-80), aluminio-ftalocianina con 2-4 grupos sulfonato (AlPcS<sub>2-4</sub>) (Berg *et al.* (1997) *supra*, Glassberg *et al.* (1991) Lasers Surg. Med. 11, 472-439), cloro-aluminio-ftalocianina sulfonada (CASPC) (Roberts *et al.* (1991) J. Natl Cancer Inst. 83, 18-32), ftalocianina (PC) (Jori *et al.* (1990) *supra*), silicio-ftalocianina (Pc4), (He *et al.* (1998) Photochem. Photobiol. 67:720-728, Jori *et al.* (1990) *supra*), magnesio-ftalocianina (Mg<sup>2+</sup>-PC) (Jori *et al.* (1990) *supra*), ftalocianina de cinc (ZnPC) (Berg *et al.* (1997) *supra*). Otros fotosensibilizadores incluyen, por ejemplo, tionina, azul de toluidina, rojo neutro y azure c.

50 No obstante, fotosensibilizadores preferidos incluyen, por ejemplo, Lutecio-Texafirina (Lu-Tex), un fotosensibilizador de nueva generación actualmente en pruebas clínicas para la CNV debido a sus propiedades clínicas favorables que incluyen absorción a aproximadamente 730 nm, que permite penetración profunda en los tejidos y aclaramiento rápido, que está disponible de Alcon Laboratories, Fort Worth, TX. Otros fotosensibilizadores preferidos incluyen benzoporfirina y derivados de benzoporfirina, por ejemplo, BPD-MA y BPD-DA, disponibles de QLT Phototherapeutics, Inc., Vancouver, Canadá.

55 El fotosensibilizador se formula preferiblemente en un sistema de suministro que proporciona concentraciones elevadas del fotosensibilizador a la CNV. Tales formulaciones pueden incluir, por ejemplo, la combinación de un fotosensibilizador con un vehículo que proporciona concentraciones elevadas del fotosensibilizador a la CNV y/o acoplamiento del fotosensibilizador a un ligando específico de fijación que se fija preferentemente a un componente  
60 específico de la superficie celular de la CNV.

En una realización preferida, el fotosensibilizador puede combinarse con un vehículo basado en lípidos. Por ejemplo, se ha encontrado que formulaciones de liposomas son particularmente eficaces para suministrar el fotosensibilizador, la porfirina verde, y más particularmente BPD-MA al componente de lipoproteínico de baja densidad del plasma, que actúa a su vez como vehículo para suministrar el fotosensibilizador más eficazmente a la CNV. Se ha demostrado que números incrementados de receptores LDL están asociados con la CNV, y por aumentar la distribución del fotosensibilizador en la fase de lipoproteínas de la sangre, el mismo puede suministrarse más eficazmente a la CNV. Ciertos fotosensibilizadores, por ejemplo, las porfirinas verdes, y en particular BPD-MA, interaccionan fuertemente

con las lipoproteínas. La LDL propiamente dicha puede utilizarse como vehículo, pero LDL es considerablemente más cara y menos práctica que una formulación de liposomas. Por tanto LDL, o preferiblemente liposomas, son vehículos preferidos para las porfirinas verdes dado que las porfirinas verdes interaccionan fuertemente con las lipoproteínas y pueden empaquetarse fácilmente en liposomas. Composiciones de porfirinas verdes formuladas como lipocomplejos, con inclusión de liposomas, se describen, por ejemplo en las patentes U.S. núms. 5.214.036, 5.707.608 y 5.798.749. Formulaciones de liposomas de porfirina verde pueden obtenerse de QLT Phototherapeutics, Inc., Vancouver, Canadá. Se contempla que ciertos otros fotosensibilizadores pueden formularse análogamente con vehículos lípidos, por ejemplo, liposomas o LDL, para suministrar el fotosensibilizador a la CNV.

Adicionalmente, el fotosensibilizador puede acoplarse a un ligando de fijación específica que se fija preferentemente a un componente de la superficie celular de la CNV, por ejemplo, el motivo de asentamiento endotelial neovascular. Parece ser que una diversidad de ligandos de la superficie celular se expresan a niveles mayores en los nuevos vasos sanguíneos con relación a otras células o tejidos.

Las células endoteliales en los nuevos vasos sanguíneos expresan varias proteínas que están ausentes o son apenas detectables en los vasos sanguíneos establecidos (Folkman (1995) *Nature Medicine* 1:27-31), e incluyen integrinas (Brooks *et al.* (1994) *Science* 264:569-571; Friedlander *et al.* (1995) *Science* 270:1500-1502) y receptores para ciertos factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La selección *in vivo* de genotecas de péptidos de fago ha identificado también péptidos expresados por la vasculatura que son específicos de órganos, lo que implica que muchos tejidos tienen "direcciones" vasculares (Pasqualini *et al.* (1996) *Nature* 380: 364-366). Se contempla que un resto de direccionamiento adecuado puede dirigir un fotosensibilizador al endotelio de la CNV, aumentando con ello la eficacia y reduciendo la toxicidad de la PDT.

Varias moléculas de direccionamiento pueden utilizarse para dirigir los fotosensibilizadores al endotelio vascular. Por ejemplo, las integrinas  $\alpha$ -v, en particular  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha v\beta 5$ , parecen expresarse en el tejido neovascular ocular, tanto en muestras clínicas como en modelos experimentales (Corjay *et al.* (1997) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, S965; Friedlander *et al.* (1995) *supra*). De acuerdo con ello, moléculas que fijan preferentemente integrinas  $\alpha$ -v pueden utilizarse para direccionar el fotosensibilizador a la CNV. Por ejemplo, antagonistas de péptidos cíclicos de estas integrinas se han utilizado para inhibir la neovascularización en modelos experimentales (Friedlander *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9764-9769). Ha sido identificado un motivo peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos, en una dirección del terminal N al terminal C, ACDCRGDCFC (SEQ ID NO: 2) - conocido también como RGD-4C -que se fija selectivamente a las integrinas humanas  $\alpha$ -v y se acumula en la neovascularización tumoral más eficazmente que otros péptidos de direccionamiento de angiogénesis (Arap *et al.* (1998) *Nature* 279:377-380; Eyerby *et al.* (1999) *Nature Medicine* 5: 1032-1038). Puede utilizarse también angiostatina como molécula de direccionamiento para el fotosensibilizador. Estudios realizados han demostrado, por ejemplo, que la angiostatina se fija específicamente a ATP-sintasa dispuesta en la superficie de las células endoteliales humanas (Moser *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2811-2816).

Otra molécula de direccionamiento potencial es un anticuerpo para el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-2R). Pruebas clínicas y experimentales soportan fuertemente un papel para VEGF en la neovascularización ocular, particularmente la neovascularización asociada a isquemia (Adamis *et al.* (1996) *Arch. Ophthalmol.* 114:66-71; Tolentino *et al.* (1996) *Arch. Ophthalmol.* 114:964-970; Tolentino *et al.* (1996) *Ophthalmology* 103:1820-1828). Los anticuerpos para el receptor VEGF (VEGFR-2 conocido también como KDR) pueden fijarse también preferentemente al endotelio neovascular. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "anticuerpo" incluye, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de fijación de antígeno del mismo (por ejemplo, una molécula Fv, Fab, Fab' o (Fab')<sub>2</sub>), un anticuerpo policlonal o un fragmento de fijación de antígeno del mismo, o un sitio de fijación de anticuerpo biosintético, por ejemplo, un sFv (patentes U.S. núms. 5.091.513; 5.132.405; 5.258.498, y 5.482.858) que se fija específicamente a un ligando diana. Como se utilizan en esta memoria, los términos se fija "específicamente" o "preferentemente" debe entenderse que significan que la molécula de direccionamiento, por ejemplo, el anticuerpo, se fija al ligando complementario o diana con una afinidad de fijación de al menos 10<sup>5</sup>, y más preferiblemente 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>.

La molécula de direccionamiento puede sintetizarse utilizando metodologías conocidas y utilizadas en la técnica. Por ejemplo, pueden sintetizarse proteínas y péptidos utilizando químicas de síntesis de péptidos sintéticos convencionales o expresarse como proteínas o péptidos recombinantes en un sistema de expresión recombinante (véase, por ejemplo, "Molecular Cloning" Sambrook *et al.* compiladores, Cold Spring Harbour Laboratories). Análogamente, pueden prepararse y purificarse anticuerpos utilizando metodologías convencionales, por ejemplo, como se describe en "Practical Immunology", Butt, W.R. compilador, 1984 Marcel Dekker, Nueva York y "Antibodies, A Laboratory Approach", Harlow *et al.*, compiladores (1988), Cold Spring Harbour Press. Una vez creado, el agente de direccionamiento puede acoplarse al fotosensibilizador utilizando químicas estándar de acoplamiento, empleando por ejemplo reactivos de reticulación convencionales, por ejemplo, reactivos de reticulación heterobifuncionales disponibles, por ejemplo, de Pierce, Rockford IL.

Una vez formulado, el fotosensibilizador puede administrarse por cualquiera de una gran diversidad de medios, por ejemplo, por vías oral, parenteral, o rectal. Se prefiere la administración parenteral, tal como intravenosa, intramuscular o subcutánea. Es especialmente preferida la inyección intravenosa. La dosis de fotosensibilizador puede variar ampliamente, dependiendo del tejido a tratar; el sistema de suministro físico en el que se transporta el mismo, por ejemplo en la forma de liposomas; o si el mismo está acoplado a un ligando específico de la diana, tal como un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente activo.

## ES 2 311 507 T3

Debe indicarse que los diversos parámetros utilizados para la terapia fotodinámica selectiva eficaz están interrelacionados. Por consiguiente, la dosis debería ajustarse también con respecto a otros parámetros, por ejemplo, fluencia, irradiación, duración de la luz utilizada en la PDT, e intervalo de tiempo entre la administración de la dosis y la irradiación terapéutica. Todos estos parámetros deberían ajustarse para producir un deterioro significativo de la CNV sin deteriorar significativamente el tejido circundante.

Típicamente, la dosis de fotosensibilizador utilizada está dentro del intervalo que va desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg, con preferencia desde aproximadamente 0,15 a aproximadamente 5,0 mg/kg, y de modo aún más preferible desde aproximadamente 0,25 a aprox. 2,0 mg/kg. Adicionalmente, a medida que se reduce la dosis de fotosensibilizador, por ejemplo, desde aproximadamente 2 a aproximadamente 1 mg/kg en el caso de la porfirina verde o BPD-MA, la fluencia requerida para cerrar la CNV puede aumentar, por ejemplo desde aproximadamente 50 a aproximadamente 100 Joules/cm<sup>2</sup>. Pueden observarse tendencias similares con otros fotosensibilizadores expuestos en esta memoria.

Después que se ha administrado el fotosensibilizador, la CNV se irradia a una longitud de onda situada típicamente alrededor de la absorbancia máxima del fotosensibilizador, por regla general en el intervalo de aproximadamente 550 nm a aproximadamente 750 nm. Una longitud de onda dentro de este intervalo es especialmente preferida para la penetración incrementada en los tejidos corporales. Longitudes de onda preferidas utilizadas para ciertos fotosensibilizadores incluyen, por ejemplo, aproximadamente 690 nm para el monoácido del derivado de benzoporfirina, aproximadamente 630 nm para el derivado de hematoporfirina, aproximadamente 675 nm para la cloro-aluminio-ftalocianina sulfonada de, aproximadamente 660 nm para la etil-etioipurpurina de estaño, aproximadamente 730 nm para lutecio-texafirina, aproximadamente 670 nm para ATX-S10(NA), aproximadamente 665 nm para N-aspartil-clorina e6, y aproximadamente 650 nm para 5, 10, 15, 20-tetra(m-hidroxifenil)clorina.

Se cree que, como resultado de la irradiación, el fotosensibilizador en su estado de triplete interacciona con oxígeno y otros compuestos para formar compuestos intermedios reactivos, tales como oxígeno singulete y especies de oxígeno reactivas, que pueden romper las estructuras celulares. Dianas celulares posibles incluyen la membrana celular, la mitocondria, las membranas lisosómicas, y el núcleo. Pruebas procedentes de modelos tumorales y neovasculares indican que la oclusión de la vasculatura es un mecanismo principal de la terapia fotodinámica, que se produce por deterioro de las células endoteliales, con adhesión plaquetaria, desgranulación, y formación de trombo subsiguientes.

La fluencia durante el tratamiento de irradiación puede variar ampliamente, dependiendo del tipo de fotosensibilizador utilizado, el tipo de tejido, la profundidad del tejido diana, y la cantidad de fluido o sangre suprayacente. Las fluencias varían con preferencia desde aproximadamente 10 a aprox. 400 Joules/cm<sup>2</sup> y más preferiblemente varían desde aproximadamente 50 a aprox. 200 Joules/cm<sup>2</sup>. La radiancia varía por regla general desde aproximadamente 50 mW/cm<sup>2</sup> a aproximadamente 1800 mW/cm<sup>2</sup>, de modo más preferible desde aproximadamente 100 mW/cm<sup>2</sup> a aproximadamente 900 mW/cm<sup>2</sup>, y de modo todavía más preferible dentro del intervalo de aproximadamente 150 mW/cm<sup>2</sup> a aproximadamente 600 mW/cm<sup>2</sup>. Se contempla que para muchas aplicaciones prácticas, la radiancia estará comprendida en el intervalo de aproximadamente 300 mW/cm<sup>2</sup> a aproximadamente 900 mW/cm<sup>2</sup>. Sin embargo, el uso de radiancias mayores puede seleccionarse como eficaz y presenta la ventaja de acortar los tiempos de tratamiento.

El tiempo de fotoirradiación después de la administración del fotosensibilizador puede ser importante como una forma de maximizar la selectividad del tratamiento, minimizando con ello el deterioro de las estructuras distintas de los tejidos diana. El tiempo óptimo después de la administración del fotosensibilizador hasta el fototratamiento puede variar ampliamente dependiendo del modo de administración, la forma de administración por ejemplo en forma de liposomas o como un complejo con LDL, y el tipo de tejido diana. Por ejemplo, el derivado de benzoporfirina se hace presente típicamente en la neovasculatura diana dentro de un minuto después de la administración y persiste durante aproximadamente 50 minutos, la lutecio-texafirina se hace presente típicamente en el interior de la neurovasculatura diana en el transcurso de un minuto después de la administración y persiste durante aproximadamente 20 minutos, la N-aspartil-clorina e6 se hace presente típicamente en la neovasculatura diana en el transcurso de un minuto después de la administración y persiste durante aproximadamente 20 minutos, y el rosa bengala se hace presente típicamente en la neovasculatura diana en el transcurso de un minuto después de la administración y persiste durante aproximadamente 10 minutos.

La oclusión vascular eficaz ocurre generalmente a veces en el intervalo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 3 horas después de la administración del fotosensibilizador. Sin embargo, como en el caso de las porfirinas verdes, es indeseable realizar la PDT dentro de los primeros 5 minutos después de la administración a fin de prevenir el deterioro indebido de los vasos retinales que contienen todavía concentraciones relativamente altas de fotosensibilizador.

La eficacia de la PDT puede monitorizarse utilizando metodologías convencionales, por ejemplo, por la vía de fotografía o angiografía del fundus. La oclusión puede observarse usualmente por métodos angiográficos por hipofluorescencia en las áreas tratadas en los marcos angiográficos tempranos. Durante los marcos angiográficos tardíos puede comenzar a aparecer una corona de hiperfluorescencia que llena el área tratada, representando posiblemente fuga de los coriocapilares adyacentes a través del epitelio pigmentario retinal deteriorado en el área tratada. Los vasos retinales grandes en el área tratada se perfunden típicamente después de la terapia fotodinámica.

Generalmente se encuentra un deterioro retinal mínimo en la correlación histopatológica y depende de la fluencia y el intervalo de tiempo después de la irradiación que se administra el fotosensibilizador. Se contempla que la elección del fotosensibilizador apropiado, dosificación, modo de administración, formulación, tiempo después de administración antes de irradiación, y los parámetros de irradiación pueden determinarse empíricamente.

Se contempla que una diversidad de factores anti-angiogénicos pueden combinarse con la PDT para tratar la CNV indeseable. El patrón anti-angiogénesis puede potenciar la citotoxicidad de la PDT mejorando con ello la oclusión de la neovascularización coroidea. Adicionalmente, el factor anti-angiogénesis puede mejorar la selectividad de la PDT, por ejemplo, por oclusión de la CNV al tiempo que respeta los vasos sanguíneos circundantes, por ejemplo, los vasos sanguíneos retinales y coroidales grandes y/o tejido circundante, por ejemplo, el epitelio retinal. Adicionalmente, el factor anti-angiogénesis puede utilizarse para reducir o retardar la recurrencia de la afección.

El término "factor anti-angiogénesis" debe entenderse que significa una proteína, un péptido, un ácido nucleico (ácido ribonucleico (RNA) o ácido desoxirribonucleico (DNA)), ácido peptidilnucleico, o anticuerpo, que reduce o inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos en un mamífero. Se contempla que inhibidores útiles de la angiogénesis, si no son ya conocidos, pueden identificarse utilizando una diversidad de ensayos bien conocidos y utilizados en la técnica. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, el ensayo de proliferación de células endoteliales capilares de bovino, el ensayo de la membrana corioalantoica del pollo (CAL) o ensayo de la córnea del ratón. Sin embargo, se prefiere el ensayo CAM (véase, por ejemplo, O'Reilly *et al.* (1994) *Cell* 79: 315-328 y O'Reilly *et al.* (1997) *Cell* 88:277-285). Resumidamente, los embriones con yemas intactas se separan de huevos blancos de 3 días y se colocan en una cápsula Petri. Después de incubación a 37°C, con 3% de CO<sub>2</sub> durante 3 días, se aplica un disco de metilcelulosa que contiene el inhibidor de angiogénesis supuesto a la membrana corioalantoica de un embrión individual. Después de incubación durante aproximadamente 48 horas, se observan las membranas corioalantoicas bajo un microscopio respecto a la evidencia de zonas de inhibición.

Numerosos factores anti-angiogénesis son bien conocidos y están detalladamente documentados en la técnica (véase, por ejemplo, el documento PCT/US 99/08335). Ejemplos de factores anti-angiogénesis útiles en la práctica de la invención incluyen, por ejemplo, los inhibidores proteína/péptido de angiogénesis tales como: angiostatina, un fragmento proteolítico de plasmidógeno (O'Reilly *et al.* (1994) *Cell* 79:315-328, y las Patentes U.S. núms. 5.733.876; 5.837.682; y 5.885.795) que incluyen secuencias de aminoácidos de longitud total de angiostatina, fragmentos bioactivos de la misma, y análogos de la misma, endostatina, un fragmento proteolítico del colágeno XVIII (O'Reilly *et al.* (1997) *Cell* 88:277-285, Cirri, *et al.* (1999) *Int. Biol. Marker* 14:263-267, y la Patente U.S. No. 5.854.205) con inclusión de secuencias de aminoácidos de longitud total de endostatina, fragmentos bioactivos de la misma, y análogos de la misma; péptidos que contienen la secuencia del tripéptido RGD y capaces de fijar la integrina  $\alpha v \beta_3$  (Brooks *et al.* (1994) *Cell* 79: 1157-1184, Brooks *et al.* (1994) *Science* 264: 569-571); ciertos anticuerpos y fragmentos de fijación de antígeno de los mismos y péptidos que se fijan preferentemente a la integrina  $\alpha v \beta_3$  encontrada en las células epiteliales vasculares tumorales (Brooks *et al.*, *supra*, Friedlander *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9764-9769); ciertos anticuerpos y fragmentos de fijación de antígeno de los mismos y péptidos que se fijan preferentemente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (Ciardello *et al.*, (1996) *J. Natl. Cancer Inst* 88:1770-1776, Ciardello *et al.*, (2000) *Clin. Cancer Res.* 6:3739-3747); anticuerpos, proteínas, péptidos y/o ácidos nucleicos que se fijan preferentemente a y neutralizan el factor de crecimiento endotelial vascular (Adamis *et al.* (1996) *Arch. Ophthalmol.* 114:66-71), anticuerpos, proteínas, y/o péptidos que se fijan preferentemente a y neutralizan el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular; el factor de crecimiento anti-fibroblastos, el factor de crecimiento anti-epidérmico (Ciardello *et al.*, (2000) *Clin. Cancer Res.* 6:3739-3747) que incluyen secuencias de aminoácidos de longitud total, fragmentos bioactivos y análogos de los mismos, y el factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario (Dawson (1999) *Science* 2035:245-248) que incluye secuencias de aminoácidos de longitud total, fragmentos bioactivos y análogos de los mismos. Los fragmentos bioactivos se refieren a porciones de la proteína intacta que tienen al menos 30%, más preferiblemente al menos 70%, y muy preferiblemente al menos 90% de la actividad biológica de las proteínas intactas. Los análogos se refieren a especies y variantes alélicas de la proteína intacta, o reemplazamientos, inserciones o deleciones de aminoácidos de la misma que tienen al menos 30%, más preferiblemente al menos 70%, y muy preferiblemente 90% de la actividad biológica de la proteína intacta.

Se ha informado también que varias citoquinas, con inclusión de fragmentos bioactivos de las mismas y análogos de las mismas tienen actividad anti-angiogénica y por tanto pueden ser útiles en la práctica de la invención. Ejemplos incluyen, por ejemplo, IL-12, que según se informa actúa por un mecanismo dependiente de IFN- $\gamma$  (Voest *et al.* (1995) *J. Natl. Canc. Inst.* 87:581-586); IFN- $\alpha$ , que se ha demostrado es anti-angiogénico por sí solo o en combinación con otros inhibidores (Brem *et al.* (1993) *J. Piriatr. Surg.* 28:1253-1257). Adicionalmente, los interferones IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$  tienen, según se informa, efectos inmunológicos, así como propiedades anti-angiogénicas, que son independientes de sus actividades anti-virales. Sin embargo, los factores anti-angiogénicos preferidos incluyen endostatina y angiostatina.

El factor anti-angiogénesis puede sintetizarse utilizando metodologías conocidas y utilizadas en la técnica. Por ejemplo, pueden sintetizarse proteínas y péptidos y purificarse utilizando químicas convencionales de péptidos sintéticos y protocolos de purificación, o expresarse como proteínas o péptidos recombinantes en un sistema de expresión recombinante (véase, por ejemplo, "Molecular Cloning" Sambrook *et al.* compiladores, Cold Spring Harbour Laboratories). Análogamente, pueden prepararse y purificarse anticuerpos utilizando metodologías convencionales, por ejemplo, como se describe en "Practical Immunology", Butt, W.R. compilador, 1984 Marcel Dekker, Nueva York y "Antibodies, A Laboratory Approach" Harlow *et al.*, compiladores (1988), Cold Spring Harbor Press.

## ES 2 311 507 T3

En la extensión en que el factor anti-angiogénesis es un ácido nucleico o ácido peptidil-nucleico, tales compuestos pueden sintetizarse por cualquiera de las metodologías de síntesis de oligonucleótidos y ácidos peptidil-nucleicos conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, PCT/EP92/20702 y PCT/US94/013523) y utilizarse en terapia antisentido. Las secuencias antisentido de oligonucleótidos y ácidos peptidil-nucleicos, usualmente de 10 a 100 y más preferiblemente de 15 a 50 unidades de longitud, son susceptibles de hibridación a un transcrito génico y/o de mRNA y, por tanto, pueden utilizarse para inhibir la transcripción y/o la traducción de una proteína diana. Debe apreciarse, sin embargo, que las secuencias de oligorribonucleótidos son generalmente más susceptibles de ataque enzimático por las ribonucleasas que lo son las secuencias de desoxirribonucleótidos. Por tanto, se prefieren los oligodesoxirribonucleótidos a los oligorribonucleótidos para uso *in vivo*. En el caso de secuencias nucleotídicas, pueden reemplazarse los enlaces fosfodiésteres por enlaces tioéster, lo que hace que las moléculas resultantes sean más resistentes a la degradación por las nucleasas. Adicionalmente, se aprecia que las secuencias de ácidos peptidil-nucleicos, al contrario que las secuencias de ácidos nucleicos regulares, no son susceptibles de degradación por las nucleasas y, por tanto, es probable que tengan mayor longevidad *in vivo*. Adicionalmente, se ha encontrado que las secuencias de ácido peptidil-nucleico se fijan a cadenas complementarias de DNA y RNA monocatenarias más fuertemente en las secuencias de DNA correspondientes (PCT/EP92/20702). Adicionalmente, en la medida en que el factor anti-angiogénesis es un compuesto orgánico o inorgánico, tales compuestos pueden sintetizarse, extraerse y/o purificarse por procedimientos estándar conocidos en la técnica.

El tipo y la cantidad de factor anti-angiogénesis a administrar pueden depender de la PDT y el tipo de célula a tratar. Se contempla, sin embargo, que los factores anti-angiogénesis, modos de administración y dosificaciones óptimas pueden determinarse empíricamente. El factor anti-angiogénesis puede administrarse en un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable de tal modo que la administración no afecte desfavorablemente de cualquier otro modo al balance de electrolitos y/o volumétrico del receptor. El excipiente puede comprender, por ejemplo, solución salina fisiológica.

Los inhibidores de la angiogénesis basados en proteínas, péptidos o ácidos nucleicos pueden administrarse a dosis comprendidas, por ejemplo, desde aproximadamente 0,001 a aproximadamente 500 mg/kg, de modo más preferible desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 250 mg/kg, y de modo muy preferible desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg. Por ejemplo, los anticuerpos que fijan el factor de crecimiento epitelial vascular pueden administrarse por vía intravenosa a dosis comprendidas desde aproximadamente 0,1 a aprox. 5 mg/kg una sola vez cada 2 a 4 semanas. La endostatina, por ejemplo, puede administrarse por vía intravenosa sobre una base diaria a dosis que varían desde aproximadamente 1 a aprox. 50 mg/kg por día. Con relación a la administración intravítrea, el factor anti-angiogénesis, por ejemplo, los anticuerpos que fijan el factor epitelial vascular, se administra por regla general periódicamente como bolus a dosis comprendidas entre aproximadamente 10  $\mu$ g y aproximadamente 5 mg/ ojo y más preferiblemente entre aproximadamente 100  $\mu$ g y aprox. 2 mg/ojo.

El factor anti-angiogénesis se administra preferiblemente al mamífero antes de la PDT. De acuerdo con ello, es preferible administrar el factor anti-angiogénesis antes de la administración del fotosensibilizador. El factor anti-angiogénesis, como el fotosensibilizador, puede administrarse en una cualquiera de una diversidad de modos, por ejemplo, por vías oral, parenteral, o rectal. Sin embargo, se prefiere la administración parenteral, tal como intravenosa, intramuscular, subcutánea, e intravítrea. La administración puede proporcionarse como un bolus periódico (por ejemplo, por vía intravenosa o intravítrea) o como una infusión continua desde un depósito interno (por ejemplo, desde un implante bioerosionable dispuesto en una localización intra- o extra-ocular) o desde un depósito externo (por ejemplo, desde una bolsa intravenosa). El factor anti-angiogénesis puede administrarse localmente, por ejemplo, por liberación continua desde un dispositivo de suministro de fármaco de liberación sostenida inmovilizado a una pared interna del ojo o por la vía de liberación controlada trans-escleral direccionada a la coroides (véase, PCT/US00/00207).

El factor anti-angiogénesis puede proporcionarse en un kit que puede comprender opcionalmente un inserto de paquete con instrucciones referentes al modo de tratamiento de una afección de este tipo. Una composición que comprende a la vez un fotosensibilizador y un factor anti-angiogénesis puede proporcionarse para uso en la presente invención. La composición puede comprender un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Así pues, la presente invención incluye una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un fotosensibilizador y un factor anti-angiogénesis; así como la composición para uso en medicamento. Más preferiblemente, sin embargo, la invención se refiere al uso en terapia de combinación, en cuyo caso un factor anti-angiogénesis y un fotosensibilizador se administran separadamente. Con preferencia, el factor anti-angiogénesis se administra antes de la administración del fotosensibilizador. Las instrucciones para dicha administración puede proporcionarse con el factor anti-angiogénesis y/o con el fotosensibilizador. Si se desea, el factor anti-angiogénesis y el fotosensibilizador pueden proporcionarse juntos en un kit, que incluye opcionalmente una inserción de paquete con instrucciones para el uso. El factor anti-angiogénesis y el fotosensibilizador se proporcionan preferiblemente en envases separados. Para cada administración, el factor anti-angiogénesis y/o el fotosensibilizador pueden proporcionarse en forma de dosis unitaria o de dosis múltiple. Las dosis preferidas de fotosensibilizador y factor anti-angiogénico, sin embargo, son como se ha descrito arriba.

Aunque los usos médicos, composiciones y combinaciones de la invención que anteceden pueden ser útiles en la neovascularización coroidea indeseable tratada y por tanto para mejorar los síntomas de trastornos oculares que incluyen, por ejemplo, AMD, síndrome de histoplasmosis ocular, miopía patológica, estrías angioideas, trastornos idiopáticos, coroiditis, ruptura coroidea, nevos coroideos suprayacentes, y enfermedades inflamatorias, se contempla que los

## ES 2 311 507 T3

mismos pueden ser útiles también en el tratamiento de otras formas de neovascularización ocular. Más específicamente, aquéllos pueden ser útiles asimismo para el tratamiento y eliminación o reducción de la neovascularización corneal, la neovascularización del iris, la neovascularización retinal, los angiomas retinales y los hemangiomas coroideos.

5 La invención se ilustra adicionalmente por referencia a los ejemplos no limitantes siguientes.

### Ejemplo 1

#### 10 *El Factor Anti-Angiogénesis Potencia el Efecto de PDT en las Células Endoteliales*

Se realizaron experimentos para determinar si la citotoxicidad resultante de la PDT puede potenciarse por la adición de un factor anti-angiogénesis. Se trataron las células de interés por PDT sola o en combinación con un factor anti-angiogénesis y se evaluó el efecto sobre la citotoxicidad de la PDT por un ensayo de proliferación celular.

15 Se dejaron crecer células endoteliales capilares retinales de bovino (BRCE) (de Patricia A. D'Amore, Schepens Eye Research Institute, Boston, MA) y células epiteliales pigmentarias de retina humana (RPE) (de Anthony P. Adamis, Massachusetts Eye & Ear Infirmary, Boston, MA) a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma, St. Louis, MO) 5% de suero de bovino fetal desactivado por calentamiento (FBS, Gibco, Grand Island, NY), suplementado con L-glutamina, penicilina, y estreptomina (Gibco Grand Island, NY). Se obtuvo Lutecio-Texafirina (Lu-Tex) de Alcon Laboratories, Inc. (Fort Worth, TX) como una solución stock de 2 mg/ml, estable en la oscuridad a 4°C, y se utilizó de acuerdo con las directrices del fabricante.

25 Se midió la supervivencia de las células utilizando un ensayo de proliferación celular. Resumidamente, las células BRCE o RPE se extendieron en placas a una densidad de 10<sup>5</sup> células en DMEM con 5% de FBS y se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 18 horas, y en caso deseado, se añadió angiostatina humana recombinante (Calbiochem, La Jolla, CA) a una concentración de 500 mg/ml. 18 horas más tarde, se retiró el medio y se reemplazó por 3 µg/ml de Lu-Tex en medio completo. 30 minutos más tarde, se expusieron los cultivos a irradiación temporizada utilizando un fotocoagulador argón/colorante a 732 nm y sistema de suministro de láser (modelo 920, Coherent Inc., Palo Alto, CA).  
30 La radiancia se suministró a una tasa de 10 mW/cm<sup>2</sup> para dar una dosis total de 5 a 20 J/cm<sup>2</sup>, y el tiempo de irradiación estaba comprendido entre 7 y 28 minutos. Después de la irradiación, se retiró el medio y se reemplazó con medio completo. Los cultivos se devolvieron a la incubadora durante 7 días, después de lo cual las células se dispersaron en tripsina, se contaron en modalidad enmascarada, y se determinó la fracción superviviente. Los resultados, consignados como el valor medio de muestras triplicadas ± DE, se resumen en la Tabla 1. Los cultivos se fotografiaron en  
35 diversos momentos después de Lu-Tex/PDT utilizando una apertura numérica 16X-0,32 en un microscopio invertido con contraste de fases (Diaphot, Nikon, Melville, NY).

40 (Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

## ES 2 311 507 T3

TABLA 1

*Sumario de la Supervivencia Celular (%) en Función del Tratamiento\**

Linea de células	Lu-TeX/PDT	Angiostatina	Angiostatina seguida por Lu-TeX/PDT	Lu-TeX/PDT seguido por angiostatina
<b>BRCE</b>	79.13±4.05 (5J/cm <sup>2</sup> )	87.39±5.76	55.22±3.65	77.61±3.52
	53.17±0.32 (10J/cm <sup>2</sup> )		38.11±2.50	67.16±3.20
	33.34±2.26 (20J/cm <sup>2</sup> )		0.90±0.32	32.97±2.20
<b>RPE</b>	94.55±1.60 (5J/cm <sup>2</sup> )	99.09±0.8	91.84±7.97	
	59.59±3.56 (10J/cm <sup>2</sup> )		56.84±6.61	
	53.47±3.18 (20J/cm <sup>2</sup> )		45.83±5.51	

\* El efecto anti-endotelial interactivo *in vitro* del tratamiento combinado con angiostatina y Lu-TeX/PDT es mayor que el aditivo cuando se compara con la suma de los efectos esperados de cada tratamiento aislado. La potenciación del efecto de Lu-TeX/PDT en las células BRCE era eficaz con pre-exposición a angiostatina solamente. No se observó efecto alguno de la angiostatina en el caso de las células RPE. Los datos son el % medio de supervivencia celular ± DE.

Con objeto de evaluar el efecto de la combinación de angiostatina con Lu-TeX/PDT sobre la supervivencia de las células BRCE, se pretrataron las células durante 18 horas con 500 ng/ml de angiostatina, después de lo cual se trataron con Lu-TeX/PDT a diversas fluencias. Se midió la supervivencia celular por el ensayo de proliferación celular de una semana. Cuando se expusieron a angiostatina exclusivamente, el ensayo de proliferación demostró una destrucción del 12,61% de las células BRCE para la dosis de angiostatina utilizada (Tabla 1). La pre-exposición de las células BRCE a angiostatina no parecía interferir con la absorción celular subsiguiente de Lu-TeX. Y lo que es más importante, los resultados demostraron un efecto citotóxico sinérgico de angiostatina y Lu-TeX/PDT sobre las células BRCE para todas las fluencias utilizadas (5, 10 y 20 J/cm<sup>2</sup>), sobrepasando consistentemente la citotoxicidad resultante de Lu-TeX/PDT sola, angiostatina sola o la suma aritmética de sus toxicidades respectivas (Tabla 1, Fig. 1A). Los controles consistían en células expuestas exclusivamente a la luz debido a que no se observó toxicidad alguna en la oscuridad para la concentración de Lu-TeX utilizada. Adicionalmente, se observó que la angiostatina no era eficaz en la potenciación del efecto de Lu-TeX/PDT si se suministraba después de PDT.

En contraste con los resultados obtenidos con las células BRCE, no se observó citotoxicidad alguna cuando se trataron células RPE humanas con angiostatina humana, y no se observó destrucción interactiva alguna después de exposición a angiostatina y Lu-TeX/PDT (Figura 1B, Tabla 1). Cuando se combinó con angiostatina, Lu-TeX/PDT tenía una dosis letal (DL<sub>100</sub>) de 20 J/cm<sup>2</sup> para las células BRCE, mientras que Lu-TeX/PDT sola requería 40 J/cm<sup>2</sup> para alcanzar el mismo efecto en las células BRCE. Estudios previos demostraron que a fluencias de 20 y 40 J/cm<sup>2</sup>, la supervivencia de las células RPE es aproximadamente 43% y 21%, respectivamente.

Los datos muestran un efecto anti-proliferativo específico de la angiostatina sobre las células BRC como se demuestra por la reducción en el número de células en un ensayo de proliferación de una semana. En contraste, no se observó efecto alguno de la angiostatina en las células RPE. De acuerdo con ello, las células BRCE parecen ser otra línea de células endoteliales, junto con las células microvasculares de la corteza adrenal de los bovinos, las células ca-

5 pilares de la corteza adrenal de los bovinos, las células aórticas de los bovinos, las células de la vena umbilical humana y las células endoteliales microvasculares de la dermis humana (Mauceri *et al.* (1998) Nature 394: 287-291, Lucas *et al.* (1998) Blood 92: 4730-41), que es direccionada específicamente por la angiostatina. En este estudio, se utilizaron células BRCE que eran una línea endotelial capilar representativa del segmento posterior para testar el efecto anti-angiogénico de la angiostatina. El descubrimiento de que la angiostatina induce apoptosis en las células BRCE sugiere que la muerte celular podría contribuir a la reducción global del número de células. Sin embargo, se sabe poco acerca del mecanismo exacto antiangiogénico de la angiostatina (Lucas *et al.* (1998) Blood 92: 4730-4741).

10 En resumen, los estudios demuestran que Lu-Tex/PDT y angiostatina tienen efectos citotóxicos combinados sobre las células endoteliales capilares de la retina, pero no sobre las células epiteliales pigmentadas. Sin embargo, cuando se administró angiostatina después de PDT, la combinación no potenciaba los efectos de PDT. En la combinación de angiostatina antes de Lu-Tex/PDT, una fluencia de 20 J/cm<sup>2</sup> era suficiente para alcanzar prácticamente un 100% de mortalidad de BRCE. En ausencia de angiostatina, se requería una dosis de luz de 40 J/cm<sup>2</sup> para alcanzar este nivel de citotoxicidad. Para la dosis de luz de 20 J/cm<sup>2</sup>, la supervivencia de las células RPE después de PDT se incrementaba en un 20%. Los resultados soportan por tanto el potencial de la combinación de angiostatina con Lu-Tex/PDT para mejorar la erradicación de la CNV y reducir los efectos deletéreos sobre la RPE.

### Ejemplo 2

#### 20 *Morfología Celular Después de PDT con Factor Antiangiogénico*

Se realizaron experimentos para establecer de qué modo afecta la PDT a la morfología celular de las células BRCE y RPE. Se trataron las células y se expusieron a PDT sola o en combinación con angiostatina como se describe en el Ejemplo 1. Aunque las células aparecían gravemente deterioradas inmediatamente después de la PDT, se producía una recuperación subsiguiente en ciertas circunstancias. Una semana después de la PDT, algunas células desaparecieron, mientras que aquellas que se mantenían recuperaron su forma de husillo y su capacidad de fijación.

30 En las células BRCE que se cebaron inicialmente con angiostatina seguida por PDT, se observó muerte celular extensa y masiva al cabo de una semana. Únicamente se observaron residuos de células y cuerpos densamente refractarios de células moribundas flotando en el medio. Las partículas se recuperaron y se pusieron en medio completo reciente, pero ninguna presentaba signo alguno de nueva fijación o proliferación en una cápsula nueva. La combinación de angiostatina y Lu-Tex/PDT, por consiguiente, parece ser letal para las células BRCE en las condiciones utilizadas.

35 Las células BRCE de control y las células RPE que se trataron con angiostatina sola durante 18 horas continuaban proliferando y alcanzaron la confluencia. No se observó efecto aditivo alguno de angiostatina con Lu-Tex/PDT en las células RPE. Las células RPE sometidas a Lu-Tex/PDT solo o con angiostatina aparecían inalteradas como se evidenciaba por su morfología.

### 40 Ejemplo 3

#### *Suministro Direccionado de Fotosensibilizador a la Neovascularización Coroidea*

Se contempla que un fotosensibilizador puede dirigirse al endotelio de la CNV por acoplamiento del fotosensibilizador a un endotelio neovascular por fijación de restos con objeto de aumentar la eficacia y reducir la toxicidad de la PDT. Pueden utilizarse varias moléculas de direccionamiento para direccionar los fotosensibilizadores al endotelio vascular. Las integrinas  $\alpha$ -v, en particular las integrinas  $\alpha$ -v $\beta$ -3 y  $\alpha$ -v $\beta$ -5, parecen expresarse en el tejido neovascular ocular, tanto en especímenes clínicos como en modelos experimentales (Corjay *et al.* (1997) *supra*; Friedlander *et al.* (1995) *supra*). Se han utilizado antagonistas peptídicos cíclicos de estas integrinas para inhibir la neovascularización en modelos experimentales (Friedlander *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9764-9769). Se identificó un motivo peptídico ACDCRGDCFC (SEQ ID No: 2) - denominado también RGD-4C -, que se fija selectivamente a las integrinas  $\alpha$ -v humanas y se acumula en la neovascularización tumoral más eficazmente que cualesquiera otros péptidos de direccionamiento a la angiogénesis (Arap *et al.* (1998) Nature 279: 377-380). Otra molécula de direccionamiento potencial es un anticuerpo para el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-2R). Pruebas clínicas y experimentales soportan fuertemente un papel para VEGF en la neovascularización ocular, particularmente la neovascularización asociada a isquemia (Adamis *et al.* (1996) ARCH. OPHTHALMOL. 114: 66-71; Tolentino *et al.* (1996) ARCH. OPHTHALMOLOGY 103:1820-1828). El anticuerpo para el receptor VEGF (VEGFR-2, conocido también como KDR) puede esperarse que se fije preferentemente al endotelio neovascular.

### 60 *Diseño Experimental*

El fotosensibilizador Verteporfina (QLT Phototherapeutics, Inc., Vancouver, BC) o Lutecio-Texafirina (Alcon Laboratories, Fort Worth, TX) se acoplará a un resto de direccionamiento, por ejemplo, un péptido RGD-4C, o a un anticuerpo receptor anti-VEGF utilizando químicas de acoplamiento estándar. Las características espectrales (emisión y excitación) del complejo fotosensibilizador resultante pueden medirse *in vitro*. Subsiguientemente, pueden realizarse estudios *in vitro* utilizando células BRCE y RPE, para evaluar la absorción celular y la fototoxicidad después de la PDT. Los experimentos pueden enfocar los parámetros de tratamiento PDT con inclusión de la sincronización óptima así como la dosimetría de fármaco y luz para fototoxicidad selectiva *in vitro*. A continuación, pueden testarse

## ES 2 311 507 T3

la eficacia y selectividad de la PDT utilizando el fotosensibilizador fijado *in vivo* en el modelo de CNV de la rata. Los resultados de PDT con fotosensibilizador que comprenden la molécula de direccionamiento pueden compararse luego con los resultados de PDT con el mismo fotosensibilizador que carece de la molécula de direccionamiento.

5 Puede inducirse la CNV en animales utilizando un láser de kriptón, y documentarse por angiografía digital del fundus con fluoresceína. Más específicamente, el modelo de lesión por láser en la rata es una modificación de un modelo similar en el mono (Dobi *et al.* (1989) ARCH. OPHTHALMOL. 107:264-269; Ryan (1982) ARCH. OPHTHALMOL. 100:1804-1809; Tobe *et al.* (1994) J. JPN. OPHTHALMOL. SOC. 98:837-845). Resumidamente, pueden producirse 10 5-6 quemaduras por láser de kriptón de alta intensidad (100  $\mu\text{m}$  de tamaño del punto, duración 0,1 segundo, 160 mW) de una manera peripapilar. La CNV como se evidencia por hiperfluorescencia y fuga tardía puede documentarse utilizando angiografía digital con fluoresceína y se espera que se desarrolle en al menos el 60% de las lesiones dentro de 2-3 semanas de la lesión causada por el láser.

15 La PDT puede realizarse luego sobre áreas de CNV y coroides normal, y los efectos pueden evaluarse angiográfica e histológicamente. De modo más específico, la PDT puede realizarse utilizando inyección en la vena de la cola del fotosensibilizador que contiene una molécula de direccionamiento o carece de la misma, seguido por irradiación mediante láser del área de tratamiento. La PDT puede aplicarse también a áreas de CNV en un solo ojo y a áreas de coroides normal en el otro ojo. Los parámetros del fotosensibilizador y del láser se basarán en experimentos previos utilizando Verteporfina y Lu-TeX en el modelo del mono, así como alguna dosimetría preliminar en el modelo de la 20 rata.

La eficacia de la PDT puede evaluarse como sigue:

25 (a) *Eficacia de la Oclusión de la CNV.* La oclusión eficaz de la CNV puede evaluarse por la ausencia de fuga de CNV por angiografía con fluoresceína 24 horas después de la PDT. Esta metodología ha sido bien establecida en la lesión por láser en el caso del mono. La histopatología puede efectuarse utilizando microscopía óptica.

30 (b) *Selectividad de Efecto.* Dado que la CNV en este modelo se desarrolla en un área de lesión producida por láser, es difícil evaluar los efectos de la PDT sobre la retina y la coroides cuando se tratan áreas de la CNV. Por consiguiente, para demostrar la selectividad de PDT para la CNV, puede aplicarse también PDT a áreas de retina y coroides normales y utilizarse un esquema publicado de graduación histopatológica para cuantificar el deterioro para RPE, fotorreceptores, y vasos retinales y coroides (Kramer *et al.* (1996) Ophthalmology 103: 427-438).

35 (c) *Comparación de los Efectos de PDT frente a los regímenes PDT combinados.* Los efectos de PDT pueden compararse entre grupos de animales con CNV tratados con PDT utilizando fotosensibilizador solo, y grupos que reciben PDT modificada (es decir fotosensibilizador direccionado). Puede aplicarse PDT a la CNV y a áreas normales. En primer lugar, puede determinarse si la oclusión de la CNV ocurre para la misma dosis de luz (fluencia  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) utilizando la PDT modificada como en el caso de la PDT sola. A continuación, para la dosis de luz identificada, 40 pueden compararse los efectos de PDT modificada y PDT sola, sobre la coroides normal. Como ejemplo, utilizando el fotosensibilizador direccionado, es posible conseguir la oclusión de la CNV a una fluencia menor que en el caso del fotosensibilizador sin combinar, y a esta fluencia puede encontrarse un deterioro mucho menor para la RPE en las áreas normales tratadas con PDT utilizando fotosensibilizador direccionado.

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una combinación de un factor antiangiogénesis y un fotosensibilizador, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una afección ocular de un mamífero que se **caracteriza** por neovascularización coroidea no deseada; en donde el factor antiangiogénesis comprende un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico, un péptido, un anticuerpo o una proteína.
- 10 2. La combinación que se describe en la reivindicación 1, en donde la afección ocular es AMD neovascular, síndrome de histoplasmosis ocular, miopía patológica, estrías angioideas, un trastorno idiopático, coroiditis, ruptura coroidea, nevos coroides suprayacentes, o una afección inflamatoria.
- 15 3. La combinación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para el uso descrito en esta memoria, en donde el mamífero es un primate (v.g. un humano).
- 15 4. La combinación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para el uso descrito en esta memoria, en donde el factor anti-angiogénesis es para administración antes de la administración del fotosensibilizador.
- 20 5. La combinación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para el uso descrito en esta memoria, en donde el fotosensibilizador es un derivado de aminoácido, un colorante azoico, un derivado de xanteno, una clorina, un derivado de tetrapirrol, o una ftalocianina.
- 25 6. La combinación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para el uso descrito en esta memoria, en donde el fotosensibilizador es lutecio-texafirina, una benzoporfirina, un derivado de benzoporfirina, o un derivado de hemato-porfirina.
- 30 7. La combinación de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para el uso descrito en esta memoria, en donde el factor anti-angiogénesis es angiostatina, endostatina, un péptido que contiene una secuencia tripeptídica RGD y capaz de fijar la integrina  $\alpha\nu\beta3$ , o un factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario.
- 30 8. La combinación de una cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para el uso descrito en esta memoria, en donde el fotosensibilizador comprende un resto de direccionamiento que se fija preferentemente a las células endoteliales de la neovascularización.
- 35 9. La combinación de la reivindicación 8 para el uso descrito en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el resto de direccionamiento es un péptido o es un anticuerpo.
- 40 10. La combinación de la reivindicación 9 para el uso descrito en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el resto de direccionamiento es un péptido que se fija preferentemente a una integrina  $\alpha-\nu\beta$  o es un anticuerpo que se fija específicamente a un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.
- 45 11. La combinación de la reivindicación 10 para el uso descrito en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la integrina es integrina  $\alpha-\nu\beta3$  o integrina  $\alpha-\nu\beta5$ .
- 45 12. La combinación de la reivindicación 9 para el uso descrito en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de fijación de antígeno del mismo, un anticuerpo policlonal o un fragmento de fijación de antígeno del mismo, o un sitio de fijación biosintético.
- 50 13. La combinación de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para el uso descrito en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en donde el resto de direccionamiento mejora la especificidad del fotosensibilizador con relación al fotosensibilizador que carece del resto de direccionamiento.
- 55 14. El uso de un factor anti-angiogénesis y un fotosensibilizador en la preparación de medicamentos primero y segundo respectivamente para uso en combinación en el tratamiento de una afección ocular **caracterizada** por neovascularización coroidea no deseada; en donde el factor anti-angiogénesis es como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, o 7 y el fotosensibilizador es como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1, 5, 6, u 8 a 13.
- 60 15. El uso de un factor anti-angiogénesis y un fotosensibilizador en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección ocular **caracterizada** por neovascularización coroidea no deseada; en donde el factor anti-angiogénesis es como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, o 7 y el fotosensibilizador es como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1, 5, 6, u 8 a 13.
- 65 16. El uso de un factor anti-angiogénesis en la preparación de un medicamento para uso en combinación con terapia fotodinámica para el tratamiento de una afección ocular **caracterizada** por neovascularización coroidea no deseada; en donde el factor anti-angiogénesis es como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 ó 7.

## ES 2 311 507 T3

17. El uso de un fotosensibilizador en la preparación de un medicamento para uso en la terapia fotodinámica en combinación con un factor anti-angiogénesis para el tratamiento de una afección ocular **caracterizada** por neovascularización coroidea no deseada; en donde el factor anti-angiogénesis es como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 ó 7.

5

18. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17; en donde la afección ocular es AMD neovascular, síndrome de histoplasmosis ocular, miopía patológica, estrías angioideas, un trastorno idopático, coroiditis, ruptura coroidea, nevos coroides suprayacentes o una afección inflamatoria.

10

19. Un kit que comprende un factor anti-angiogénesis y un fotosensibilizador; en donde el factor anti-angiogénesis es como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, ó 7 y el fotosensibilizador es como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1, 5, 6, u 8 a 13; incluyendo opcionalmente dicho kit instrucciones para uso.

15

20. Un kit de acuerdo con la reivindicación 19, en donde las instrucciones están presentes e incluyen instrucciones para administrar el factor anti-angiogénesis para administración anterior a la administración del fotosensibilizador.

20

21. Una composición que comprende un factor anti-angiogénesis y un fotosensibilizador, en donde el factor anti-angiogénesis es como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, ó 7 y el fotosensibilizador es como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1, 5, 6 ó 8 a 13.

20

22. Un kit de acuerdo con la reivindicación 19 o la reivindicación 20, o una composición de acuerdo con la reivindicación 21, para uso en medicina.

25

23. Una combinación, uso, kit o composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el factor anti-angiogénesis y el fotosensibilizador son sinérgicamente eficaces en el tratamiento de neovascularización coroidea no deseada.

30

35

40

45

50

55

60

65

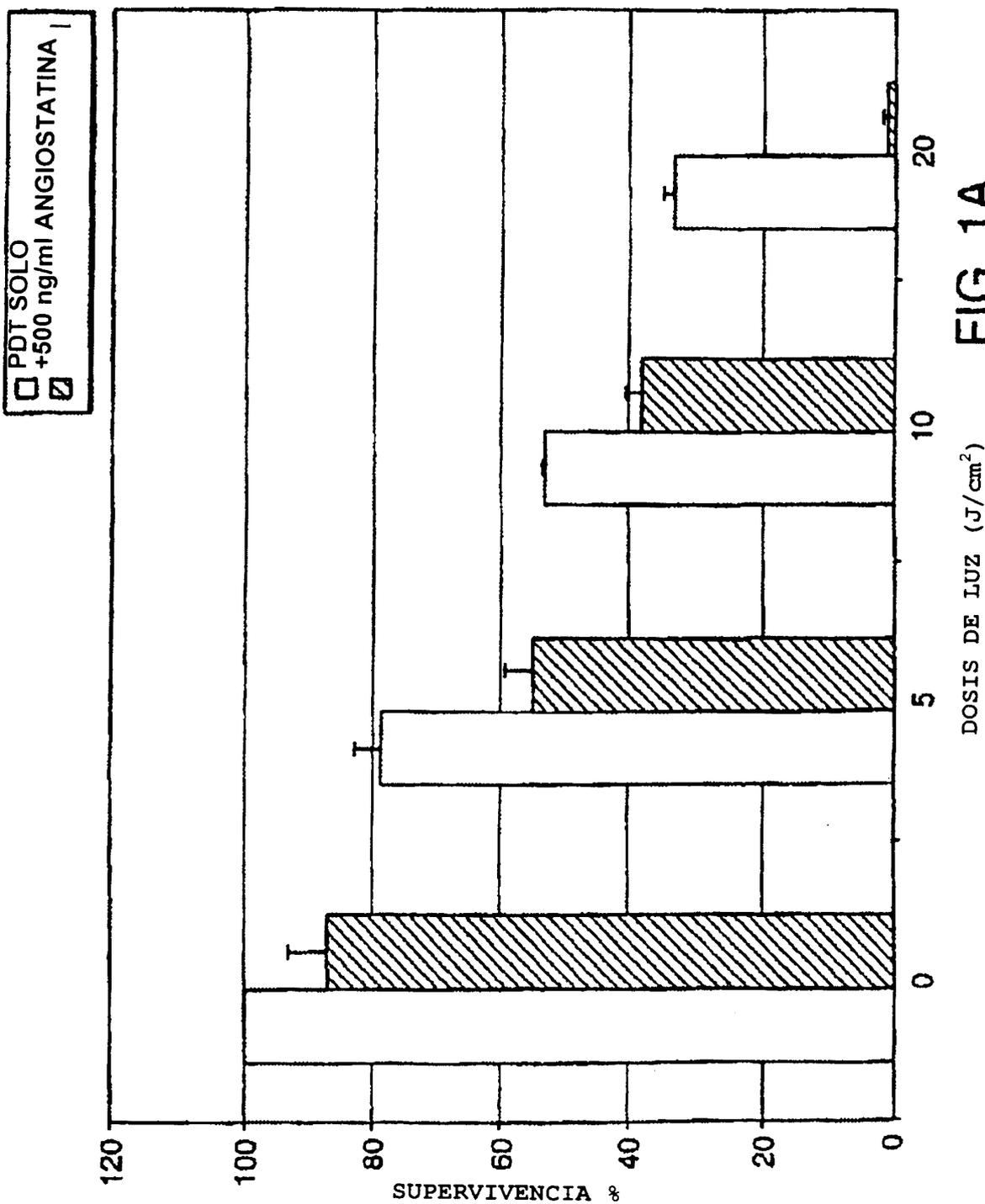
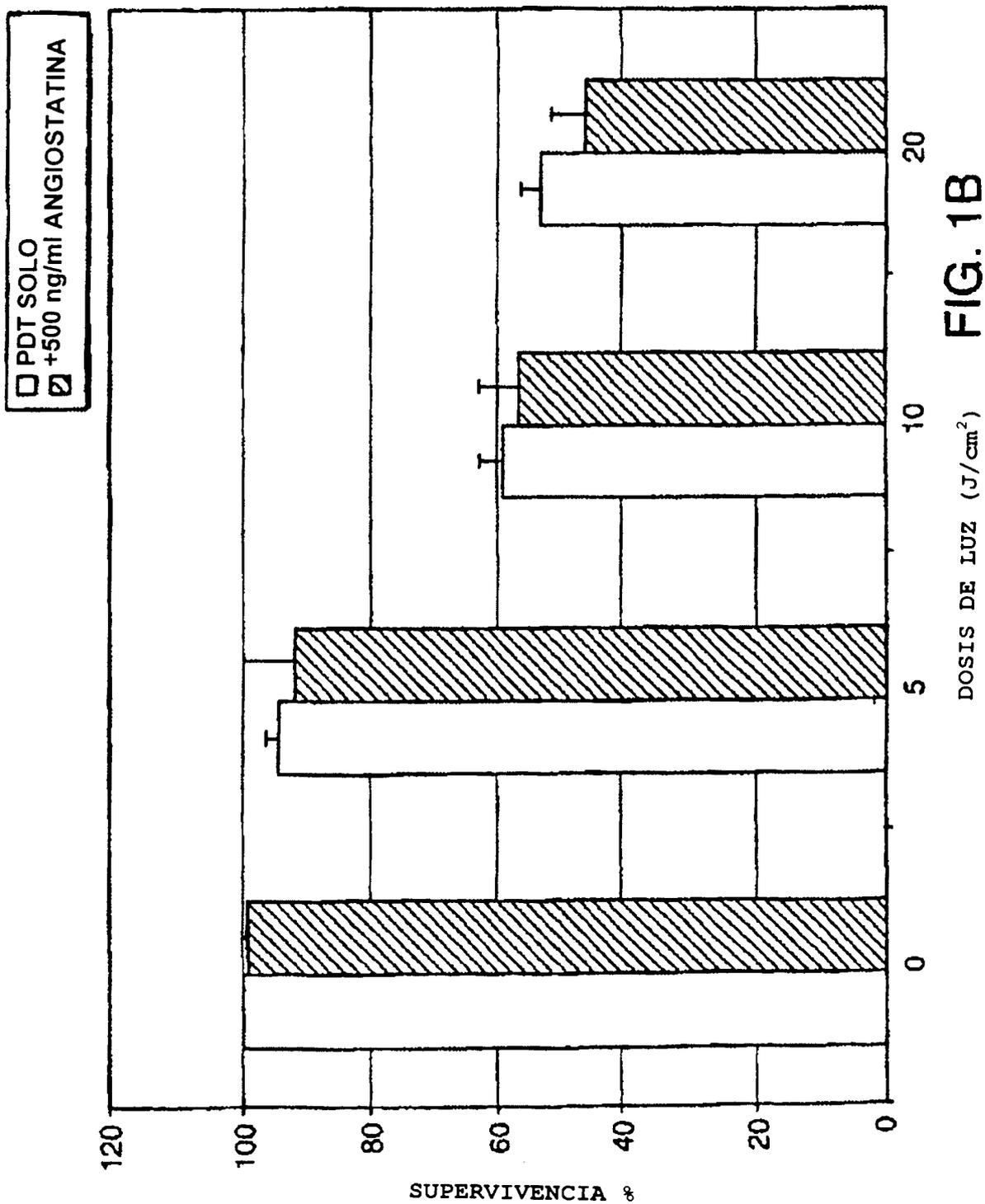


FIG. 1A



# ES 2 311 507 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Massachusetts Eye and Ear Infirmary
- 5 <120> Terapia Fotodinámica Para Tratamiento de Afecciones Oftálmicas
- <130> MEE-002PC
- 10 <160> 3
- <170> PatentIn version 3.0
- 15 <210> 1  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>  
<223> Secuencia Sintética
- 25 <400> 1
- Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys  
1 5 10
- 30 <210> 2  
<211> 10  
<212> PET  
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>  
<223> Secuencia Sintética
- 40 <400> 2
- Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys  
1 5 10
- 45 <210> 3  
<211> 4  
<212> PET  
<213> Secuencia Artificial
- 50 <220>  
<223> Secuencia Sintética
- 55 <400> 3
- 60 Asp Glu Val Asp  
1
- 65