



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT.

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 04-42441

54. TÍTULO Procedimientos para tratar enfermedades
Neovasculares oculares.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K31/7105 // A61K31/311 // A61K31/7125

71. SOLICITANTE EGYTECH PHARMACEUTICALS.

DOMICILIO 500 SEVENTH AVENUE, 18TH FLOOR NEW YORK
NY 10018, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

74. APODERADO CARLOS R. OLARTE.

22. BOGOTÁ, D. C., MAYO 03, 2004.

04/13.

OLARTE RAISBECK



SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación : 04042441 00000000 Folios: 116
Fecha (USD): 2004-05-07 17:09:49
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

SOLICITANTE (71)	Nombre: <u>EYETECH PHARMACEUTICALS</u>	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
	Dirección: <u>500 Seventh Avenue, 18th Floor</u> <u>New York, NY 10018, E.U.A.</u> Nacionalidad o Domicilio: <u>ESTADOUNIDENSE</u> Lugar de Constitución: <u>Delaware, E.U.A.</u> Teléfono: _____ Fax: _____ E-mail: _____	

REPRESENTANTE APODERADO	Nombre: <u>CARLOS R. OLARTE</u>	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>79782747Bta</u> <u>TP 74.295</u>
	Dirección: <u>Wold Trade Center Torre A,</u> <u>Calle 100 No. 8ª-37 Piso 10</u> Teléfono: <u>601-7700</u> Fax: <u>601-7799</u> E-mail: <u>office@olarteraisbeck.com</u>	

INVENTOR (ES) (72)	Nombre: <u>DAVID R. GUYER</u>
	Dirección: <u>530 East 76th Street, Apt. 17G, New York, NY 10021,</u> <u>Estados Unidos de América</u> Nacionalidad o Domicilio: <u>ESTADOUNIDENSE</u>

PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US02/35986 Fecha Noviembre 8, 2002
Publicación Internacional No. WO 03/039404 Fecha Mayo 15, 2003

Título (54) PROCEDIMIENTOS PARA TRATAR ENFERMEDADES NEOVASCULARES
OCULARES

Clasificación Internacional (51) A61F // A61K31/7105; A61K31/71 // A61K31/7125

Prioridad SI ☒ N ☐	(33) País de Origen <u>US</u>	(32) Fecha <u>Noviembre 9, 2001</u>	(31) Número de Solicitud <u>60/332,304</u>
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____

Comprobante de pago No. 33,175 Fecha Abril 27, 2004

10 **ANEXOS**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del Interventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12.
- ☐ De ser el caso, Información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.
- ☒ Otros.

1 **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

2 **Solicito la concesión de la patente,**

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

3

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04042441 00000000 Folios: 116
Fecha (AMD): 2004-05-07 17:09:49
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NRC1 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 33,175
FECHA : ABRIL 27 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
FREDERICK TORRES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	22152651	27/04/2004	2,830,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

A

TRADUCCIÓN FICIAL No. 04-166

Efectuada el día 13 de abril de 2004, de un documento escrito en Inglés, al cual para su Identificación se le estampa el sello de María del Pilar Iglesias, Traductora e Intérprete Oficial por Resolución No. 819 de abril de 1971 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia.

CESIÓN

PC32191/700124

CO-1

Por contraprestación onerosa recibida por mi de **EYETECH PHARMACEUTICALS**, sociedad constituida y existente conforme a las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, domiciliada en 500 Seventh Avenue, 18th Floor, New York, NY 10018, Estados Unidos de América, por el presente vendo y cedo a la mencionada **EYETECH PHARMACEUTICALS**, todo mi derecho, título e interés en mi invento para una nueva y útil Mejora en **MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEOVASCULARES OCULARES** en cuanto respecta a la República de Colombia, tan ampliamente como se describe en las especificaciones, y por el presente autorizo y solicito al Comisario de Patentes de Colombia que expida dicha patente a **EYETECH PHARMACEUTICALS** de conformidad con esta Cesión.

En fe de lo cual firmo este documento de mi puño y letra,
(Fdo.) David R. Guyer, en New York, New York, el 3/25/04


**TRADUCCION Y
INTERPRETE OFICIAL**
Resolución No. 819 de 1971

S

Certificado, Verificado y Autenticado en la ciudad de Egham
en Surrey a los 31 días del mes de marzo de 2004.

(Fdo) Kenneth Greenwood, Notario Público (Sello Oficial)

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

El presente documento público

2. Fue firmado por Kenneth Greenwood

3. Que actuó en su calidad de Notario Público

4. Lleva el sello del mencionado Notario Público

Se certificó

5. En Londres 6. El 01 de abril de 2004

7. Por parte del Principal Secretario de Estado de Su
Majestad para Asuntos Extranjeros y de la Mancomunidad.

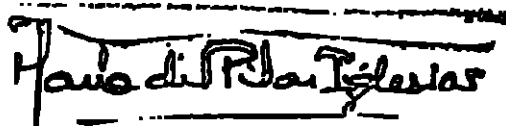
8. Bajo el Número **G385237**

9. Sello de la Oficina de Asuntos Extranjeros y de la
Mancomunidad

10. Firmado por J. Ireland, Secretario de Estado

Es traducción fiel y completa efectuada por:

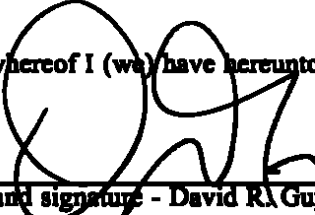

María del Pilar Iglesias
C.C. 41.339.183 de Bogotá


María del Pilar Iglesias
C. C. 41.339.183 de Bogotá
Interprete Oficial según Resolución No. 819 de
8 de Abril de 1971 del Ministerio de Justicia

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by EYETECH PHARMACEUTICALS a corporation organized under the laws of the State of Delaware, United States of America whose full post office address is 500 Seventh Avenue, 18th Floor, New York, NY 10018, United States of America, I (we) do hereby sell and assign to the said EYETECH PHARMACEUTICALS, all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in METHODS FOR TREATING OCULAR NEOVASCULAR DISEASES so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said EYETECH PHARMACEUTICALS in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

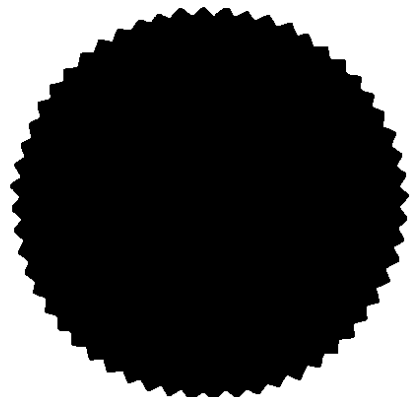
3/25/04  New York, New York
Place, date and signature - David R. Guyer

EXECUTION
Certified Verified and Authenticated
In The Town Of Egham In Surrey

This

3rd Day Of March 2004

KENNETH GREENWOOD
NOTARY PUBLIC
HORNE ENGALL AND FREEMAN



2899

7

APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by K Greenwood
a été signé par
3. Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres

Certified/Attesté

6. the/le 01 April 2004

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **G385237**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: J. Ireland



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the mission representing that country.

i

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 May 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/039404 A2

(51) International Patent Classification: A61F

(74) Agent: CLARK, Paul, T.; Clark & Elbing LLP, 101 Federal Street, Boston, MA 02110 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/35986

(22) International Filing Date:
8 November 2002 (08.11.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/332,304 9 November 2001 (09.11.2001) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 60/332,304 (CIP)
Filed on 9 November 2001 (09.11.2001)

(81) Designated States (*national*): AH, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KB, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (*for all designated States except US*): EYE-TECH PHARMACEUTICALS [US/US]; 500 Seventh Avenue, 18th Floor, New York, NY 10018 (US).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (*for US only*): GUYER, David, R. [US/US]; 530 East 76th Street, Apt. 17G, New York, NY 10021 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS FOR TREATING OCULAR NEOVASCULAR DISEASES

(57) Abstract: Disclosed herein are methods for treating ocular neovascular disease using anti-VEGF therapy in combination with a second therapy that inhibits the development of ocular neovascularization or destroys abnormal blood vessels in the eye, such as photodynamic therapy.



WO 03/039404 A2

aig

5

METHODS FOR TREATING OCULAR NEOVASCULAR DISEASES**Field of the Invention**

The invention relates to methods for treating ocular neovascularization using agents that inhibit VEGF.

10

Background of the Invention

Angiogenesis, or abnormal blood vessel growth, has been implicated as an important cause of pathological states in many areas of medicine, including ophthalmology, cancer, and rheumatology. For example, the exudative or
15 neovascular form of age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of blindness in the elderly. There is currently no standard and effective therapy for the treatment of exudative ADM in most patients. Thermal laser photocoagulation and photodynamic therapy (PDT) have been shown to be beneficial for subgroups of such patients. However, only a fraction of eyes meet
20 the eligibility criteria for such therapeutic interventions and those treated have a high recurrence rate.

Recent pre-clinical studies have suggested that pharmacological intervention or anti-angiogenesis therapy may be useful to treat various forms of ocular neovascularization, such as choroidal neovascularization (CNV). Much of
25 this work has focused on blocking vascular endothelial growth factor (VEGF), which has been implicated in the pathogenesis of CNV secondary to AMD and the pathogenesis of diabetic retinopathy. VEGF is an important cytokine growth factor involved in angiogenesis and appears to play a critical role in the development of ocular neovascularization. Human studies have shown that high
30 concentrations of VEGF are present in the vitreous in angiogenic retinal disorders but not in inactive or non-neovascularization disease states. Excised human CNV

10
A

after experimental submacular surgery have also shown high VEGF levels. Other studies have shown regression or prevention of neovascularization in multiple vascular beds in several animal models, using various types of anti-VEGF agents, including antibody fragments. Thus, anti-VEGF therapy is a promising new
5 treatment for AMD, diabetic retinopathy, and related disorders.

In addition to a potential anti-angiogenic effect, anti-VEGF therapy may be useful as an anti-permeability agent. VEGF was initially referred to as vascular permeability factor due to its potent ability to induce leakage from blood vessels. Recent research has shown that VEGF may be important in causing
10 vessel leakage in diabetic retinopathy and that the diabetes-induced blood-retinal barrier breakdown can be dose-dependently inhibited with anti-VEGF therapy. Anti-VEGF therapy may, therefore, represent a two-prong attack on CNV via its anti-angiogenic and anti-permeability properties.

Existing methods for treating ocular neovascular disease are in need of
15 improvement in their ability to inhibit or eliminate various forms of neovascularization, including choroidal neovascularization secondary to AMD and diabetic retinopathy. Furthermore, there is a continuing and significant need to identify new therapies to treat ocular neovascularization. The present invention fulfills these needs and further provides other related advantages.

20

Summary of the Invention

We have conducted clinical trials of an anti-VEGF aptamer with and without photodynamic therapy in patients with subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration to determine
25 the safety profile of multiple injection therapy. We found that anti-VEGF therapy with or without photodynamic therapy (PDT) was both safe and effective in treating patients suffering from AMD and related disorders. Most patients receiving the anti-VEGF aptamer exhibited stable or improved vision three months after treatment. Those receiving anti-VEGF therapy in combination with
30 PDT exhibited the most dramatic improvement in vision. Thus, anti-VEGF therapy, either alone or in conjunction with angiogenic therapies, is clearly a

11/10

promising treatment for various forms of ocular neovascularization, including AMD and diabetic retinopathy.

Accordingly, the present invention features a method for treating a patient suffering from an ocular neovascular disease, which method includes the following steps: (a) administering to the patient an effective amount of an anti-VEGF aptamer; and (b) providing the patient with phototherapy, such as photodynamic therapy or thermal laser photocoagulation.

In one embodiment of the invention, the photodynamic therapy (PDT) includes the steps of: (i) delivering a photosensitizer to the eye tissue of a patient; and (ii) exposing the photosensitizer to light having a wavelength absorbed by the photosensitizer for a time and at an intensity sufficient to inhibit neovascularization in the patient's eye tissue. A variety of photosensitizers may be used, including but not limited to, benzoporphyrin derivatives (BPD), monoaspartyl chlorin e6, zinc phthalocyanine, tin etiopurpurin, tetrahydroxy tetraphenylporphyrin, and porfimer sodium (PHOTOFRIN®), and green porphyrins.

In a related aspect, the present invention provides a method for treating an ocular neovascular disease in a patient, which method involves administering to the patient: (a) an effective amount of an anti-VEGF aptamer; and (b) a second compound capable of diminishing or preventing the development of unwanted neovasculation. The anti-VEGF agents or other compounds that may be combined with anti-VEGF aptamers include, but are not limited to: antibodies or antibody fragments specific to VEGF; antibodies specific to VEGF receptors; compounds that inhibit, regulate, and/or modulate tyrosine kinase signal transduction; VEGF polypeptides; oligonucleotides that inhibit VEGF expression at the nucleic acid level, for example antisense RNAs; retinoids; growth factor-containing compositions; antibodies that bind to collagens; and various organic compounds and other agents with angiogenesis inhibiting activity.

In a preferred embodiment of the invention, the anti-VEGF agent is a nucleic acid ligand to vascular endothelial growth factor (VEGF). The VEGF nucleic acid ligand may include ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and/or

12/11

modified nucleotides. In particularly preferred embodiments, the VEGF nucleic acid ligand includes 2'-F-modified nucleotides, 2'-O-methyl (2'-OMe) modified nucleotides, and/or a polyalkylene glycol, such as polyethylene glycol (PEG). In some embodiments, the VEGF nucleic acid ligand is modified with a moiety, for example a phosphorothioate, that decreases the activity of endonucleases or exonucleases on the nucleic acid ligand relative to the unmodified nucleic acid ligand, without adversely affecting the binding affinity of the ligand.

In yet another aspect, the invention provides a method for treating an ocular neovascular disease in a patient, which method involves the steps of: (a) administering to the patient an effective amount of an agent that inhibits the development of ocular neovascularization, for example, an anti-VEGF aptamer; and (b) providing the patient with a therapy that destroys abnormal blood vessels in the eye, for example PDT.

The anti-VEGF aptamer may be administer intraocularly by injection into the eye. Alternatively, the aptamer may be delivered using an intraocular implant.

The methods of the invention can be used to treat a variety of neovascular diseases, including but not limited to, ischemic retinopathy, intraocular neovascularization, age-related macular degeneration, corneal neovascularization, retinal neovascularization, choroidal neovascularization, diabetic macular edema, diabetic retina ischemia, diabetic retinal edema, and proliferative diabetic retinopathy.

Other advantages and features of the present invention will be apparent from the following detailed description thereof and from the claims.

Definitions

By "ocular neovascular disease" is meant a disease characterized by ocular neovascularization, i.e. the development of abnormal blood vessels in the eye of a patient.

13. 12

By "patient" is meant any animal having ocular tissue that may be subject to neovascularization. Preferably, the animal is a mammal, which includes, but is not limited to, humans and other primates. The term also includes domesticated animals, such as cows, hogs, sheep, horses, dogs, and cats.

5 By "phototherapy" is meant any process or procedure in which a patient is exposed to a specific dose of light of a particular wavelength, including laser light, in order to treat a disease or other medical condition.

By "photodynamic therapy" or "PDT" is meant any form of phototherapy that uses a light-activated drug or compound, referred to herein as a
10 photosensitizer, to treat a disease or other medical condition characterized by rapidly growing tissue, including the formation of abnormal blood vessels (i.e., angiogenesis). Typically, PDT is a two-step process that involves local or systemic administration of the photosensitizer to a patient followed by activation of the photosensitizer by irradiation with a specific dose of light of a particular
15 wavelength.

By "anti-VEGF agent" is meant a compound that inhibits the activity or production of vascular endothelial growth factor ("VEGF").

By "photosensitizer" or "photoactive agent" is meant a light-absorbing drug or other compound that upon exposure to light of a particular wavelength
20 becomes activated thereby promoting a desired physiological event, e.g., the impairment or destruction of unwanted cells or tissue.

By "thermal laser photocoagulation" is meant a form of photo-therapy in which laser light rays are directed into the eye of a patient in order to cauterize abnormal blood vessels in the eye to seal them from further leakage.

25 By "effective amount" is meant an amount sufficient to treat a symptom of an ocular neovascular disease.

The term "light" as used herein includes all wavelengths of electromagnetic radiation, including visible light. Preferably, the radiation wavelength is selected to match the wavelength(s) that excite(s) the
30 photosensitizer. Even more preferably, the radiation wavelength matches the

14.43

excitation wavelength of the photosensitizer and has low absorption by non-target tissues.

Brief Description of the Drawing

5 FIGURE 1 is the chemical structure of the anti-VEGF agent NX1838.

Detailed Description

10 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) is an important stimulus for the growth of new blood vessels in the eye. We have discovered that anti-VEGF therapy provides a safe and effective treatment for neovascular disease, especially when combined with a secondary therapy that is able to reduce or eliminate ocular neovascularization, such as, for example, photodynamic therapy (PDT). We found that the combination of these therapies is far superior at treating
15 conditions characterized by the development of unwanted neovasculture in the eye than most conventional treatments, including the use of either of these therapies alone.

 Accordingly, the present invention provides a method of treating an ocular neovascular disease which involves administering to a patient an anti-VEGF
20 agent and treating the patient with phototherapy (e.g., PDT) or with other therapies, such as photocoagulation, that destroy abnormal blood vessels in the eye. This method can be used to treat a number of ophthalmological diseases and disorders marked by the development of ocular neovascularization, including but not limited to, ischemic retinopathy, intraocular neovascularization, age-related
25 macular degeneration, corneal neovascularization, retinal neovascularization, choroidal neovascularization, diabetic macular edema, diabetic retina ischemia, diabetic retinal edema, and proliferative diabetic retinopathy.

Anti-VEGF Therapy

30 A variety of anti-VEGF therapies that inhibit the activity or production of VEGF, including aptamers and VEGF antibodies, are available and can be

15 2A

used in the methods of the present invention. The preferred anti-VEGF agents are nucleic acid ligands of VEGF, such as those described in U.S. Patent Nos. 6,168,778 B1; 6,147,204; 6,051,698; 6,011,020; 5,958,691; 5,817,785; 5,811,533; 5,696,249; 5,683,867; 5,670,637; and 5,475,096. A particularly
5 preferred anti-VEGF agent is EYE001 (previously referred to as NX1838), which is a modified, pegylated aptamer that binds with high affinity to the major soluble human VEGF isoform and has the general structure shown in FIGURE 1 (described in U.S. Patent No. 6,168,788; Journal of Biological Chemistry, Vol. 273(32): 20556-20567 (1998); and In Vitro Cell Dev. Biol.-
10 Animal Vol. 35:533-542 (1999)).

Alternatively, the anti-VEGF agents may be, for example, VEGF antibodies or antibody fragments, such as those described in U.S. Patent Nos. 6,100,071; 5,730,977; and WO 98/45331. Other suitable anti-VEGF agents or compounds that may be used in combination with anti-VEGF agents according to
15 the present invention include, but are not limited to, antibodies specific to VEGF receptors (e.g., U.S. Patent Nos. 5,955,311; 5,874,542; and 5,840,301); compounds that inhibit, regulate, and/or modulate tyrosine kinase signal transduction (e.g., U.S. Patent No. 6,313,138 B1); VEGF polypeptides (e.g., U.S. Patent No. 6,270,933 B1 and WO 99/47677); oligonucleotides that inhibit VEGF
20 expression at the nucleic acid level, for example antisense RNAs (e.g., U.S. Patent Nos. 5,710,136; 5,661,135; 5,641,756; 5,639,872; and 5,639,736); retinoids (e.g., U.S. Patent No. 6,001,885); growth factor-containing compositions (e.g., U.S. Patent No. 5,919,459); antibodies that bind to collagens (e.g., WO 00/40597); and various organic compounds and other agents with
25 angiogenesis inhibiting activity (U.S. Patent Nos. 6,297,238 B1; 6,258,812 B1; and 6,114,320).

Administration of Anti-VEGF Agents

Once a patient has been diagnosed with a neovascular disorder of the eye, the patient is treated by administration of an anti-VEGF agent in order to block
30 the negative effects of VEGF, thereby alleviating the symptoms associated with the neovascularization. As discussed above, a wide variety of anti-VEGF agents

16 AS

are known in the art and may be used in the present invention. Methods for preparing these anti-VEGF agents are also well-known and many are commercially available medications.

The anti-VEGF agents can be administered systemically, e.g. orally or by IM or IV injection, in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier adapted for the route of administration. A variety of physiologically acceptable carriers can be used to administer the anti-VEGF agents and their formulations are known to those skilled in the art and are described, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences, (18th edition), ed. A. Geninaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA and Pollock et al.

The anti-VEGF agents are preferably administered parenterally (e.g., by intramuscular, intraperitoneal, intravenous, intraocular, intravitreal, or subcutaneous injection or implant). Formulations for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, or emulsions. A variety of aqueous carriers can be used, e.g., water, buffered water, saline, and the like. Examples of other suitable vehicles include polypropylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils, gelatin, hydrogenated naphthalenes, and injectable organic esters, such as ethyl oleate. Such formulations may also contain auxiliary substances, such as preserving, wetting, buffering, emulsifying, and/or dispersing agents. Biocompatible, biodegradable lactide polymer, lactide/glycolide copolymer, or polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers may be used to control the release of the active ingredients.

Alternatively, the anti-VEGF agents can be administered by oral ingestion. Compositions intended for oral use can be prepared in solid or liquid forms, according to any method known to the art for the manufacture of pharmaceutical compositions. The compositions may optionally contain sweetening, flavoring, coloring, perfuming, and preserving agents in order to provide a more palatable preparation.

Solid dosage forms for oral administration include capsules, tablets, pills, powders, and granules. Generally, these pharmaceutical preparations contain active ingredient admixed with non-toxic pharmaceutically acceptable excipients.

12
No

These may include, for example, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate, lactose, sucrose, glucose, mannitol, cellulose, starch, calcium phosphate, sodium phosphate, kaolin and the like. Binding agents, buffering agents, and/or lubricating agents (e.g., magnesium stearate) may also be used.

5 Tablets and pills can additionally be prepared with enteric coatings.

Liquid dosage forms for oral administration include pharmaceutically acceptable emulsions, solutions, suspensions, syrups, and soft gelatin capsules. These forms contain inert diluents commonly used in the art, such as water or an oil medium, and can also include adjuvants, such as wetting agents, emulsifying agents, and suspending agents.

10

The anti-VEGF agents can also be administered topically, for example, by patch or by direct application to the eye, or by iontophoresis.

The anti-VEGF agents may be provided in sustained release compositions, such as those described in, for example, U.S. Patent Nos. 5,672,659 and

15 5,595,760. The use of immediate or sustained release compositions depends on the nature of the condition being treated. If the condition consists of an acute or over-acute disorder, treatment with an immediate release form will be preferred over a prolonged release composition. Alternatively, for certain preventative or long-term treatments, a sustained released composition may be appropriate.

20

The anti-VEGF agent may also be delivered using an intraocular implant. Such implants may be biodegradable and/or biocompatible implants, or may be non-biodegradable implants. The implants may be permeable or impermeable to the active agent, and may be inserted into a chamber of the eye, such as the anterior or posterior chambers or may be implanted in the sclera, transchoroidal space, or an avascularized region exterior to the vitreous. In a preferred

25 embodiment, the implant may be positioned over an avascular region, such as on the sclera, so as to allow for transcleral diffusion of the drug to the desired site of treatment, e.g. the intraocular space and macula of the eye. Furthermore, the site of transcleral diffusion is preferably in proximity to the macula.

30

18
A

Examples of implants for delivery of an anti-VEGF agent include, but are not limited to, the devices described in U.S. Patent Nos. 3,416,530; 3,828,777; 4,014,335; 4,300,557; 4,327,725; 4,853,224; 4,946,450; 4,997,652; 5,147,647; 5,164,188; 5,178,635; 5,300,114; 5,322,691; 5,403,901; 5,443,505; 5,466,466; 5,476,511; 5,516,522; 5,632,984; 5,679,666; 5,710,165; 5,725,493; 5,743,274; 5,766,242; 5,766,619; 5,770,592; 5,773,019; 5,824,072; 5,824,073; 5,830,173; 5,836,935; 5,869,079; 5,902,598; 5,904,144; 5,916,584; 6,001,386; 6,074,661; 6,110,485; 6,126,687; 6,146,366; 6,251,090; and 6,299,895, and in WO 01/30323 and WO 01/28474, all of which are incorporated herein by reference.

10 ***Dosage***

The amount of active ingredient that is combined with the carrier materials to produce a single dosage will vary depending upon the subject being treated and the particular mode of administration. Generally, the anti-VEGF agent should be administered in an amount sufficient to reduce or eliminate a symptom of an ocular neovascular disease.

Dosage levels on the order of about 1 µg/kg to 100 mg/kg of body weight per administration are useful in the treatment of the above mentioned neovascular disorders. When administered directly to the eye, the preferred dosage range is about 0.3 mg to about 3 mg per eye. The dosage may be administered as a single dose or divided into multiple doses. In general, the desired dosage should be administered at set intervals for a prolonged period, usually at least over several weeks, although longer periods of administration of several months or more may be needed.

One skilled in the art will appreciate that the exact individual dosages may be adjusted somewhat depending on a variety of factors, including the specific anti-VEGF agent being administered, the time of administration, the route of administration, the nature of the formulation, the rate of excretion, the particular disorder being treated, the severity of the disorder, and the age, weight, health, and gender of the patient. Wide variations in the needed dosage are to be expected in view of the differing efficiencies of the various routes of administration. For instance, oral administration generally would be expected to

19. pg

require higher dosage levels than administration by intravenous or intravitreal injection. Variations in these dosage levels can be adjusted using standard empirical routines for optimization, which are well-known in the art. The precise therapeutically effective dosage levels and patterns are preferably determined by
5 the attending physician in consideration of the above identified factors.

In addition to treating pre-existing neovascular diseases, anti-VEGF agents can be administered prophylactically in order to prevent or slow the onset of these disorders. In prophylactic applications, an anti-VEGF agent is administered to a patient susceptible to or otherwise at risk of a particular neovascular disorder.
10 Again, the precise amounts that are administered depend on various factors such as the patient's state of health, weight, etc.

Effectiveness of Anti-VEGF Therapy

In order to assess the effectiveness of anti-VEGF therapy to treat ocular neovascularization, we conducted a number of studies, which are described in the
15 examples below, that involved the administration of an anti-VEGF aptamer with and without photodynamic therapy in patients suffering from subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. A Phase 1A single intravitreal injection study of anti-VEGF therapy for patients with subfoveal choroidal neovascularization (CNV) secondary to age-related macular
20 degeneration (AMD) revealed an excellent safety profile (Example 6). Ophthalmic evaluation revealed that 80% of patients showed stable or improved vision 3 months after treatment and that 27% of eyes demonstrated a 3-line or greater improvement in vision on the ETDRS chart at this time period. No significant related adverse events were reported locally or systemically. These
25 data demonstrated that anti-VEGF therapy is a promising new avenue for the treatment of neovascular diseases of the eye, including exudative macular degeneration and diabetic retinopathy.

We also performed a Phase 1B multiple descending dose safety study of anti-VEGF therapy using multiple intravitreal injections of the anti-VEGF
30 aptamer with or without photodynamic therapy in patients with subfoveal CNV secondary to AMD (Example 7). The safety study showed no significant safety

20
14

issues related to the drug. Ophthalmic evaluation revealed that 87.5% of patients that received the anti-VEGF aptamer alone showed stable or improved vision 3 months after treatment and that 25% of eyes demonstrated a 3-line or greater improvement in vision on the ETDRS chart at this time period. A 60% 3-line gain at 3 months was noted in patients that received both the anti-VEGF aptamer and photodynamic therapy. Multiple intravitreal injections of the anti-VEGF aptamer were very well tolerated in this Phase 1B study.

The results of this Phase 1B multiple intravitreal injection clinical study of anti-VEGF therapy (Example 7) expand the excellent safety profile reported by our Phase 1A single-injection study (Example 6). Specifically, the Phase 1B study shows the intraocular and systemic safety of three consecutive anti-VEGF aptamer intravitreal injections given monthly. No serious related adverse events were noted. The adverse events encountered appeared to be unrelated or minor events in some cases probably due to the intravitreal injection itself.

The 3-line gain observed in 25% of the aptamer only treated group at 3 months compares favorably to historical controls such as the results of the pivotal trial of PDT (2.2%) and its controls (1.4%) at 3 months (Arch Ophthalmol 1999, 117:1329-1345) and a sham radiation control group (3%) (Ophthalmology 1999, 106;12:2239-2247) where no more than 3% of patients showed such an improvement at this same time period.

The 25% 3-line gain at 3 months is consistent with the 26.7% improvement rate noted in the Phase 1A study of the aptamer. It may be that the anti-permeability effects of the drug caused resorption of subretinal fluid and, thus improved vision in these cases. Interestingly, a recent study using an anti-VEGF antibody fragment from Genentech also showed a 26% 3-line gain rate in a Phase 1 clinical trial. This antibody fragment shares the same mechanism of blocking extracellular VEGF as the anti-VEGF aptamer.

The stabilization or improvement rate of 87.5% observed at 3 months in the Phase 1B study also compares favorably with the 50.5% rate for the PDT-treated patients in that pivotal trial (Arch Ophthalmol 1999, 117:1329-1345), the

270

44% rate in the PDT controls, and 48% rate in the sham radiation control group (Ophthalmology 1999, 106;12:2239-2247).

The 60% 3-line gain at 3 months in the patients that received both the anti-VEGF aptamer and PDT was also very encouraging. In the pivotal Phase 3 PDT trial only 2.2% of patients showed such visual improvement (Arch Ophthalmol 1999, 117:1329-1345). Both of these study groups included eyes with classic subfoveal CNV. The improvement in vision observed in these eyes is supported by the finding that the investigators choose to re-treat with PDT at 3 months in only 40% of cases compared to the 93% re-treatment rate reported in the pivotal PDT trial (Arch Ophthalmol 1999, 117:1329-1345).

In addition, numerous pre-clinical studies now show that anti-VEGF therapy can prevent VEGF-induced neovascularization of the cornea, iris, retina, and choroid (Arch Ophthalmol 1996, 114:66-7; Invest Ophthalmol Vis Sci 1994, 35:101). The pre-clinical studies described below in Examples 1-5 with EYE001 provide evidence that anti-VEGF therapy may be useful in decreasing vascular permeability and ocular neovascularization. The anti-VEGF aptamer showed great efficacy in the ROP retinal neovascularization model where 80% of retinal neovascularization was inhibited compared to controls ($p = 0.0001$). The Miles assay model showed almost complete attenuation of VEGF mediated vascular leakage following addition of EYE001 and the corneal angiogenesis model also showed a significant reduction in neovascularization with EYE001. The Miles Assay study in guinea pigs suggests that the anti-VEGF aptamer can significantly decrease vascular permeability. This property of decreasing vascular permeability may prove to be clinically important for decreasing fluid and edema in CNV and diabetic macular edema. Thus, anti-VEGF therapy may act both as an anti-permeability and/or anti-angiogenic agent.

Photodynamic Therapy (PDT)

As discussed above, one embodiment of the method of the invention involves administering an anti-VEGF agent in combination with photodynamic therapy (PDT). PDT is a two-step process that starts with the local or systemic

22
28

administration of a light-absorbing photosensitive agent, such as a porphyrin derivative, that accumulates selectively in target tissues of the patient. Upon irradiation with light of an activating wavelength, reactive oxygen species are produced in cells containing the photosensitizer, which promote cell death. For example, in the treatment of eye diseases characterized by ocular neovascularization, a photosensitizer is selected that accumulates in the neovasculature of the eye. The patient's eye is then exposed to light of an appropriate wavelength, which results in the destruction of the abnormal blood vessels, thereby improving the patient's visual acuity.

10 *Photosensitizers*

The photodynamic therapy according to the invention can be performed using any of a number of photoactive compounds. For example, the photosensitizer can be any chemical compound that collects in one or more types of selected target tissues and, when exposed to light of a particular wavelength, absorbs the light and induces impairment or destruction of the target tissues. Virtually any chemical compound that homes to a selected target and absorbs light may be used in this invention. Preferably, the photosensitizer is nontoxic to the animal to which it is administered and is capable of being formulated in a nontoxic composition. The photosensitizer is also preferably nontoxic in its photodegraded form. Ideal photosensitizers are characterized by a lack of toxicity to cells in the absence of the photochemical effect and are readily cleared from non-target tissues.

A comprehensive listing of photosensitizers may be found, for example, in Kreimer-Birnbaum, Sem. Hematol. 26:157-73, 1989. Photosensitive compounds include, but are not limited to, chlorins, bacteriochlorins, phthalocyanines, porphyrins, purpurins, merocyanines, pheophorbides, psoralens, aminolevulinic acid (ALA), hematoporphyrin derivatives, porphycenes, porphacyanine, expanded porphyrin-like compounds and pro-drugs such as δ -aminolevulinic acid, which can produce drugs such as protoporphyrin. (See, e.g., photosensitizers described in any of U.S. Pat. Nos. 5,438,071; 5,405,957; 5,198,460; 5,190,966; 5,173,504; 5,171,741; 5,166,197; 5,095,030; 5,093,349; 5,079,262; 5,028,621;

23 92

5,002,962; 4,968,715; 4,920,143; 4,883,790; 4,866,168; and 4,649,151.)

Preferred photosensitizing agents are benzoporphyrin derivatives (BPD), monoaspartyl chlorin e6, zinc phthalocyanine, tin etiopurpurin, tetrahydroxy tetraphenylporphyrin, and porfimer sodium (PHOTOFRIN®). A particularly
5 potent group of photosensitizers includes green porphyrins, which are described in detail in Levy et al., U.S. Pat. No. 5,171,749.

Any of the photosensitizers described above can be used in the methods of the invention. Of course, mixtures of two or more photoactive compounds can also be used; however, the effectiveness of the treatment depends on the
10 absorption of light by the photosensitizer so that if mixtures are used, components with similar absorption maxima are preferred.

The photosensitizing agents of the present invention preferably have an absorption spectrum that is within the range of wavelengths between 350 nm and 1200 nm, preferably between about 400 and 900 nm and, most preferably,
15 between 600 and 800 nm.

The photosensitizer is formulated so as to provide an effective concentration to the target ocular tissue. The photosensitizer may be coupled to a specific binding ligand which may bind to a specific surface component of the target ocular tissue or, if desired, by formulation with a carrier that delivers
20 higher concentrations to the target tissue. The nature of the formulation will depend in part on the mode of administration and on the nature of the photosensitizer selected. Any pharmaceutically acceptable excipient, or combination thereof, appropriate to the particular photoactive compound may be used. Thus, the photosensitizer may be administered as an aqueous composition,
25 as a transmucosal or transdermal composition, or in an oral formulation.

As previously mentioned, the method of the invention is particularly effective to treat patients suffering from loss of visual acuity associated with unwanted neovasculation. Increased numbers of LDL receptors have been shown to be associated with neovascularization. Green porphyrins, and in particular
30 BPD-MA, strongly interact with such lipoproteins. LDL itself can be used as a carrier for green porphyrins, or liposomal formulations may be used. Liposomal

formulations are believed to deliver green porphyrins selectively to the low-density lipoprotein component of plasma which, in turn acts as a carrier to deliver the active ingredient more effectively to the desired site. By increasing the partitioning of the green porphyrin into the lipoprotein phase of the blood, liposomal formulations can result in a more efficient delivery of the photosensitizer to neovasculature. Compositions of green porphyrins involving lipocomplexes, including liposomes, are described in U.S. Pat. No. 5,214,036. Liposomal BPD-MA for intravenous administration can be obtained from QLT PhotoTherapeutics Inc., Vancouver, British Columbia.

The photosensitizer can be administered locally or systemically in any of a wide variety of ways, for example, orally, parenterally (e.g., intravenous, intramuscular, intraperitoneal or subcutaneous injection), topically via patches or implants, or the compound may be placed directly in the eye. The photosensitizing agent can be administered in a dry formulation, such as pills, capsules, suppositories, or patches. The photosensitizing agent also may be administered in a liquid formulation, either alone with water, or with pharmaceutically acceptable excipients, such as are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences, supra. The liquid formulation also can be a suspension or an emulsion. Suitable excipients for suspensions for emulsions include water, saline, dextrose, glycerol, and the like. These compositions may contain minor amounts of nontoxic auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, antioxidants, pH buffering agents, and the like.

The dose of photosensitizer can vary widely depending a variety of factors, such as the type of photosensitizer; the mode of administration; the formulation in which it is carried, such as in the form of liposomes; or whether it is coupled to a target-specific ligand, such as an antibody or an immunologically active fragment. Other factors which impact the dose of photosensitizing agent include the target cell(s) sought, the patient's weight, and the timing of the light treatment. While various photoactive compounds require different dosage ranges, if green porphyrins are used, a typical dosage is of the range of 0.1-50

259A

mg/M² (of body surface area) preferably from about 1-10 mg/M² and even more preferably about 2-8 mg/M².

The various parameters used for photodynamic therapy in the invention are interrelated. Therefore, the dose should also be adjusted with respect to other parameters, for example, fluence, irradiance, duration of the light used in photodynamic therapy, and time interval between administration of the dose and the therapeutic irradiation. All of these parameters should be adjusted to produce significant enhancement of visual acuity without significant damage to the eye tissue.

10 *Light Treatment*

After the photosensitizer has been administered to the patient, the target ocular tissue is irradiated with light at a wavelength that is absorbed by the photosensitizer that was used. The spectra for the photosensitizers described herein are known in the art; for any particular photoactive compound, it is a trivial matter to ascertain the spectrum. For green porphyrins, the desired wavelength range is generally between about 550 and 695 nm. A wavelength in this range is especially preferred for enhanced penetration into bodily tissues.

As a result of being exposed to light, the photosensitizer enters an excited state and is believed to interact with other compounds to form reactive intermediates, such as singlet oxygen, which can cause disruption of cellular structures. Possible cellular targets include the cell membrane, mitochondria, lysosomal membranes, and the nucleus. Evidence from tumor and neovascular models indicates that occlusion of the vasculature is a major mechanism of photodynamic therapy, which occurs by damage to endothelial cells, with subsequent platelet adhesion, degranulation, and thrombus formation.

The fluence during the irradiating treatment can vary widely, depending on type of tissue, depth of target tissue, and the amount of overlying fluid or blood, but preferably varies from about 50-200 Joules/cm².

26
25

The irradiance typically varies from about 150-900 mW/cm², with the range between about 150-600 mW/cm² being preferred. However, the use of higher irradiances may be selected as effective and having the advantage of shortening treatment times.

5 The optimum time following photoactive agent administration until light treatment can also vary widely depending on the mode of administration, the form of administration, and the specific ocular tissue being targeted. Typical times after administration of the photoactive agent range from about 1 minute to about 2 hours, preferably about 5-30 minutes, and more preferably about 10-25
10 minutes.

The duration of radiation exposure is preferably between about 1 and 30 minutes, depending on the power of the radiation source. The duration of light irradiation also depends on the fluence desired. For example, for an irradiance of 600 mW/cm², a fluence of 50 J/cm² requires 90 seconds of irradiation; 150 J/cm²
15 requires 270 seconds of irradiation.

The radiation is further defined by its intensity, duration, and timing with respect to dosing with the photosensitive agent (post injection interval). The intensity must be sufficient for the radiation to penetrate skin and/or to reach the target tissues to be treated. The duration must be sufficient to photoactivate
20 enough photosensitive agent to act on the target tissues. Both intensity and duration must be limited to avoid overtreating the patient. The post injection interval before light application is important, because in general the sooner light is applied after the photosensitive agent is administered, 1) the lower is the required amount of light and 2) the lower is the effective amount of
25 photosensitive agent.

Clinical examination and fundus photography typically reveal no color change immediately following photodynamic therapy, although a mild retinal whitening occurs in some cases after about 24 hours. Closure of choroidal neovascularization is preferably confirmed histologically by the observation of
30 damage to endothelial cells. Observations to detect vacuolated cytoplasm and

27
qjb

abnormal nuclei associated with disruption of neovascular tissue may also be evaluated.

In general, effects of the photodynamic therapy as regards reduction of neovascularization can be performed using standard fluorescein angiographic techniques at specified periods after treatment. The effectiveness of PDT may also be determined through a clinical evaluation of visual acuity, using means standard in the art, such as conventional eye charts in which visual acuity is evaluated by the ability to discern letters of a certain size, usually with five letters on a line of given size.

10

Other therapies for treating neovascular disease

In addition to PDT, there are a number of other therapies for treating neovascular disease which may be used in combination with anti-VEGF therapies. For example, a form of photo-therapy known as Thermal Laser Photocoagulation is a standard ophthalmic procedure for the treatment of a range of eye disorders, including retinal vascular problems (e.g. diabetic retinopathy), choroidal vascular problems and macular lesions (e.g. senile macular degeneration). This procedure involves the use of laser light to cauterize abnormal blood vessels in the eye of a patient in order to seal them from further leakage. (See, e.g. Arch. Ophthalmol. 1991, 109:1109-1114). Alternatively, compounds capable of diminishing or preventing the development of unwanted neovasculation, including other anti-VEGF agents, anti-angiogenesis agents, or other agents that inhibit the development of ocular neovascularization may be used in combination with anti-VEGF therapy.

25

The features and other details of the invention will now be more particularly described and pointed out in the following examples describing preferred techniques and experimental results. These examples are provided for the purpose of illustrating the invention and should not be construed as limiting.

28
27

EXAMPLES

In the following Examples, the anti-VEGF pegylated aptamer EYE001 was used. As discussed above, this aptamer is a polyethylene glycol (PEG)-
5 conjugated oligonucleotide that binds to the major soluble human VEGF isoform, VEGF₁₆₅, with high specificity and affinity. The aptamer binds and inactivates VEGF in a manner similar to that of a high-affinity antibody directed towards VEGF. Examples 1-5 report the pre-clinical results of studies with the anti-
10 VEGF aptamer in various models of ocular neovascularization, Example 6 reports the clinical phase IA safety results in humans with exudative AMD, and Example 7 reports the clinical phase IB results. Generally, dosages and concentrations are expressed as the oligonucleotide weight of EYE001 (NX1838) only and are based
on an approximate extinction coefficient for the aptamer of 37 μ g/mL/A₂₆₀ unit.

15 Example 1: Cutaneous Vascular Permeability Assay (Miles Assay)

One of the biological activities of VEGF is to increase vascular permeability through specific binding to receptors on vascular endothelial cells. The interaction results in relaxation of the tight endothelial junctions with
subsequent leakage of vascular fluid. Vascular leakage induced by VEGF can be
20 measured *in-vivo* by following the leakage of Evans Blue Dye from the vasculature of the guinea pig as a consequence of an intradermal injection of VEGF (Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis. Am J Pathol. 1995, 146:1029.) Similarly, the assay can be
25 used to measure the ability of a compound to block this biological activity of VEGF.

VEGF₁₆₅ (20-30nM) was premixed *ex-vivo* with EYE001 (30nM to 1 μ M) and subsequently administered by intradermal injection into the shaved skin on the dorsum of guinea pigs. Thirty minutes following injection, the Evans Blue
30 dye leakage around the injection sites was quantified by use of a computerized morphometric analysis system. The data (not shown) demonstrated that VEGF-

29

induced leakage of the indicator dye from the vasculature can be almost completely inhibited by the co-administration of EYE001 at concentrations as low as 100 nM.

5 **Example 2: Corneal Angiogenesis Assay**

Methacrylate polymer pellets containing VEGF₁₆₅ (3 pmol) were implanted into the corneal stroma of rats to induce blood vessel growth into the normally avascular cornea. EYE001 was administered intravenously to the rats at doses of 1, 3, and 10 mg/kg either once or twice daily for 5 days. At the end of the
10 treatment period, all of the individual corneas were photomicrographed. The extent to which new blood vessels developed in the corneal tissue, and their inhibition by EYE001, were quantified by standardized morphometric analysis of the photomicrographs.

The data (not shown) demonstrated that systemic treatment with EYE001
15 results in significant inhibition (65%) of VEGF-dependent angiogenesis in the cornea when compared to treatment with phosphate buffered saline (PBS). Once daily treatment with 10 mg/kg was as effective as twice daily treatment. The 3 mg/kg dose had activity similar to the 10 mg/kg dose but significant efficacy was not evident at 1 mg/kg.

20

Example 3: Retinopathy of Prematurity Study

Even though ROP is clearly distinct from diabetic retinopathy and AMD, the mouse model of ROP has been used to demonstrate a role for VEGF in the abnormal retinal vascularization that occurs in this disease (Smith LE,
25 Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, Amato DR, Sullivan R, D'Amore PA. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994;35:101.) These data provided a rationale for studying the anti-angiogenic properties of EYE001 in this model.

Litters of 9, 8, 8, 7 and 7 mice, respectively, were left in room air or made
30 hyperoxic and were treated intraperitoneally with PBS or EYE001 (1, 3, or 10 mg/kg/day). The endpoint of the assay, outgrowth of new capillaries through

30 2d

the inner limiting membrane of the retina into the vitreous humor, was assessed by microscopic identification and counting of the neovascular buds in 20 histologic sections of each eye from all of the treated and control mice. A reduction in retinal neovasculation of 80% relative to the untreated control was
5 seen at both the 10 mg/kg and 3 mg/kg doses ($p = 0.0001$ for both).

Example 4: Human Tumor Xenografts

The *in-vivo* efficacy of EYE001 was tested in human tumor xenografts (A673 rhabdomyosarcoma and Wilms tumor) implanted in nude mice. In both
10 cases, mice were treated with 10mg/kg EYE001 given intraperitoneally once a day following development of established tumors (200 mg). Control groups were treated with a sequence scrambled control aptamer (oligonucleotide).

Treatment of mice with 10 mg/kg of EYE001 once daily inhibited A673 rhabdomyosarcoma tumor growth by 80% and Wilms tumor by 84% relative to
15 the control. In the Wilms tumor model, two weeks after termination of therapy, tumor size rebounded so vigorously in treated animals that there was no longer any difference in tumor size compared to controls.

Example 5: Intravitreal Pharmacokinetics of EYE001 in Rabbits

Rabbits were obtained and cared for in accordance with all applicable state and federal guidelines and adhered to the "Principles of Laboratory Animal Care" (NIH publication #85-23, revised 1985). A total of 18 male New Zealand White rabbits were administered EYE001 by intravitreal injection. Each animal received a dose as a bilateral injection of 0.50 mg/eye (1.0 mg/animal) in a
25 volume of 40 μ L/eye. EDTA-Plasma and vitreous humor samples were collected over a 28-day period following dose administration and stored frozen (-70°C) until assayed. Vitreous humor from each eye was collected separately after the animals were sacrificed by exsanguination. EYE001 concentrations in vitreous humor samples were determined by an HPLC assay method similar to that
30 described previously by Tucker et al. (Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in

31/28

5 rhesus monkeys. J. Chromatogr. Biomed. Appl. 1999, 732:203-212) and by a dual hybridization assay method similar to that described previously by Drolet et al. (Pharmacokinetics and Safety of an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Aptamer (NX1838) Following Injection into the Vitreous Humor of Rhesus
5 Monkeys. Pharm. Res., 2000, 17:1503-1510.) The vitreous humor concentration was calculated by averaging the results from both assays. EYE001 concentrations in plasma were determined only by the dual hybridization assay.

Following a single dose of EYE001 as a bilateral administration of 0.50 mg/eye (1.0 mg/animal), the initial vitreous humor levels were approximately 350
10 $\mu\text{g/mL}$ and decreased by an apparent first order elimination process to approximately 1.7 $\mu\text{g/mL}$ by day 28. The estimated terminal half-life was 83 hours similar to the 94-hour half-life observed in rhesus monkeys (Drolet et al., *supra*). At four weeks following administration of EYE001, drug levels in the vitreous humor (~ 190 nM) remained well above the K_D for VEGF (200 pM)
15 suggesting that once monthly dosing in humans is appropriate, assuming that pharmacokinetic parameters are comparable in the rabbit and human vitreous humor. In contrast to the high levels of EYE001 found in the vitreous humor, the plasma concentrations were significantly lower and ranged from 0.092 to 0.005 $\mu\text{g/mL}$ from day 1 to day 21. Plasma levels declined by an apparent first order
20 elimination process as well with an estimated terminal half-life of 84 hours. The plasma terminal half-life thus mimicked the vitreous humor half-life as observed in rhesus monkeys (Drolet et al., *supra*) and is indicative of classical flip-flop kinetics in which the clearance from the eye is the rate-determining step for plasma clearance. These data are consistent with a highly stable (nuclease
25 resistant) aptamer that undergoes a slow rate of release from the vitreous humor into the systemic circulation.

Example 6: Clinical Trial-Phase IA Study

30 We performed a multi-centered, open-label, dose-escalation study of a single intravitreal injection of EYE001 in patients with subfoveal CNV secondary to age-related macular degeneration and with a visual acuity worse

32
32

than 20/200 on the ETDRS chart. The starting dose was 0.25mg injected once intravitreously. Dosages of 0.5, 1, 2 and 3mg were also tested. Complete ophthalmic examination with fundus photography and fluorescein angiography was performed. A total of 15 patients were treated.

5 **Selection Criteria.**

Patients for the study were selected using the following inclusion and exclusion criteria:

10 **Inclusion Criteria:** Patients were required to be > 50 years and in generally good health, have a best corrected visual acuity in the study eye worse than 20/200 on the ETDRS chart, and 20/400 or worse for at least the first patient of each cohort (n = 3); best corrected visual acuity in the fellow eye equal to or better than 20/64; subfoveal CNV (classic and/or occult CNV) of >3.5 Macular Photocoagulation Study (MPS) disc areas in size; clear ocular media and adequate pupillary dilatation to permit good quality stereoscopic fundus
15 photography; and intraocular pressure of 22mmHg or less.

20 **Exclusion Criteria:** Exclusions included significant media opacities, including cataract, which might interfere with visual acuity, assessment of toxicity, or fundus photography; presence of ocular disease, including glaucoma, diabetic retinopathy, retinal vascular occlusion or other conditions (other than CNV from AMD) which might significantly affect vision; presence of other
25 causes of CNV, including pathologic myopia (spherical equivalent of -8 diopters or more negative), the ocular histoplasmosis syndrome, angioid streaks, choroidal rupture and multifocal choroiditis; patients in whom additional laser treatment for CNV might be indicated or considered; any intraocular surgery within 3 months
30 of study entry; blood occupying >50% of the lesion; previous vitrectomy; previous or concomitant therapy with another investigational agent to treat AMD except multivitamins and trace minerals; any of the following underlying systemic diseases including uncontrolled diabetes mellitus or presence of diabetic retinopathy; cardiac disease including myocardial infarction within 12 months prior to study entry, and/or coronary disease associated with clinical symptoms, and/or indications of ischemia noted on ECG; stroke (within 12 months of study

332

entry); active bleeding disorders; any major surgical procedure within one month of study entry; active peptic ulcer disease with bleeding within 6 months of study entry; and concomitant systemic therapy with corticosteroids (e.g. oral prednisone), or other anti-angiogenic drugs (e.g. thalidomide).

5 **Study Medication.**

The drug product was a ready-to-use sterile solution composed of EYE001 (formerly NX1838) dissolved in 10mM sodium phosphate and 0.9% sodium chloride buffer injection and presented in a sterile and pyrogen free 1 cc glass body syringe barrel, with a coated stopper attached to a plastic plunger, and a
10 rubber end cap on the pre-attached 27 gauge needle. The pegylated aptamer was supplied at active drug concentrations of 1, 2.5, 5, 10, 20 or 30mg/ml of EYE001 (expressed as oligonucleotide content) in order to provide a 100µl delivery volume.

Patient Enrollment.

15 Before recruitment of patients into the study, written Institutional Review Board (IRB) approval of the protocol, informed consent and any additional patient information was obtained.

Results.

A single dose-ranging safety study was performed in 15 patients at doses
20 varying from 0.25 to 3.0 mg/eye without reaching dose-limiting toxicity. Viscosity of the formulation prevented further dose escalation past 3mg. Patients ranged in age from 64 to 92 years old. Eight males and seven females were entered and all were Caucasian. Eleven of the fifteen patients experienced a total of seventeen mild or moderate, adverse events including six, which were
25 probably or possibly related to administration of EYE001: mild intraocular inflammation, scotoma, visual distortion, hives, eye pain and fatigue. In addition, there was one severe adverse event, which was unrelated to test drug. This was the diagnosis of breast carcinoma in one patient, where the lump had been noted prior to treatment.

30

34
33

At 3 months after injection of BYE001, 12 out of 15 (80%) eyes showed stable or improved vision. Four patients (26.7%) had significantly improved vision at the same time point, which was defined as a 3-line, or greater, increase in vision on the ETDRS chart. Patients with such improved vision at 3 months
5 noted increases of +6, +4 and +3 lines on an ETDRS chart. No unexpected visual safety events were noted. Evaluation of color photographs and fluorescein angiograms revealed no signs of retinal or choroidal toxicity.

Our Phase IA clinical study showed that single intravitreal doses of the anti-VEGF aptamer could be administered safely up to 3mg/eye. No significant
10 ocular or systemic side effects were noted.

Clinicians agree that a minimum of one-year follow-up is desirable to evaluate any potential treatment for exudative AMD. Nevertheless, 3-month data is available from some prospective studies and is useful to assess both ophthalmic safety and any potential trends of a new therapy.

15 Historical controls indicate that only 1.4% (pivotal photodynamic trial) (Arch Ophthalmol 1999, 117:1329-1345) and 3.0% (radiation study) (1999, 106:12:2239-2247) of eyes have shown significant visual improvement as defined by a gain of 3 or more lines on an ETDRS chart at 3 months. In addition, the PDT – treated group of the TAP study (Arch Ophthalmol 1999, 117:1329-1345)
20 only noted such improved vision in 2.2% of cases at 3 months. These findings confirm our clinical impression that it is rare to see significant visual improvement at any time frame with any type (classic, occult or mixed) of CNV secondary to AMD.

In our study, at three months after intravitreal administration of the anti-
25 VEGF aptamer, 80% of eyes showed stabilized or improved vision with 26.7% showing an increase in 3 or more lines on the ETDRS chart. These visual improvements are supported by clinical and angiographic findings in some of the aptamer-treated patients. Stabilization of vision has always been the goal of exudative AMD studies, so the significant visual acuity improvement (3 ETDRS
30 lines) seen in 26.7% of patients at 3 months with only one dose was unexpected. Clearly, historical controls are inappropriate for comparison. In addition, the

35 28

short follow-up period, small sample size, and different CNV type (i.e. percentage of classic, occult, or mixed CNV) precluded any final conclusions or comparisons. However, it appears that the aptamer-treated eyes have certainly shown at least excellent visual safety at 3 months and justify further studies.

5 In summary, pre-clinical and early clinical results with single intravitreal injections of the anti-VEGF aptamer are very encouraging. The safety of single-dose intravitreal injections of dosages up to 3mg/eye has been established.

Example 7: Clinical Trial-Phase IB Study

10 We conducted a multi-center, open-label, repeat dose Phase IB study of 3mg/eye of EYE001 (anti-VEGF aptamer) in patients with subfoveal CNV secondary to AMD with a visual acuity worse than 20/100 in the study eye and better or equal to 20/400 in the fellow eye. If 3 or more patients experienced Dose-Limiting Toxicity (DLT's), the dose was reduced to 2mg and then 1mg, if
15 necessary. The intended number of patients to be treated was 20; 10 patients with the anti-VEGF aptamer alone and 10 patients with both anti-VEGF therapy and PDT. Eleven sites in the U.S. were selected for the studies.

Definition of DLT(s)

If a patient in the study experienced any of the following DLTs, the dosage
20 was reduced as described above:

Ophthalmic DLT:

Photographic Evaluation.

Accelerated formation of cataract: progression of one unit defined by the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) Lens Opacity Grading Protocol as
25 adapted from the Wisconsin Cataract Grading System.

Clinical Examination.

Clinically significant inflammation, which was severe (obscuring visualization of the retinal vasculature) and vision threatening.

Other ocular abnormalities not usually seen in patients with AMD, such as
30 retinal, arterial, or venous occlusion, acute retinal detachment, and diffuse retinal hemorrhage.

36 25

- Visual acuity: doubling or worsening of the visual angle (loss of ≥ 15 letters); transition to no light perception (NLP) for patients whose beginning visual acuity score is less than 15 letters unless the loss of vision is due to a vitreous hemorrhage related to the injection procedure between Days 2 through 7, Days 30-35, or Days 58-63.

Tonometry: increase from baseline of intraocular pressure (IOP) by ≥ 25 mmHg on two separate examinations at least one day apart or a sustained pressure of 30 mmHg for more than a week despite pharmacological intervention.

Fluorescein Angiogram

- Significant retinal or choroidal vascular abnormalities not seen at baseline, such as: choroidal nonperfusion (effecting one or more quadrants) delay in arterio-venous transit times (greater than 15 seconds); retinal arterial or venous occlusion (any deviation from baseline); or diffuse retinal permeability alteration effecting retinal circulation in the absence of intraocular inflammation

Systemic DLT:

Grade III (severe) or IV (life-threatening) toxicities, or any significant severe toxicity deemed related to study drug by the investigator.

Selection Criteria.

- Patients for the study were selected using the following inclusion and exclusion criteria:

- Inclusion Criteria:** The ophthalmic criteria included best corrected visual acuity in the study eye worse than 20/100 on the ETDRS chart, best corrected visual acuity in the fellow eye equal to or better than 20/400, subfoveal choroidal neovascularization with active CNV (either classic and/or occult) of less than 12 total disc areas in size secondary to age related macular degeneration, clear ocular media and adequate pupillary dilatation to permit good quality stereoscopic fundus photography, and intraocular pressure of 21 mmHg or less. General criteria included patients of either sex, aged ≥ 50 years; performance Status ≤ 2 according to the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) / World Health Organization (WHO) scale, normal electrocardiogram (ECG) or clinically non-significant changes; women must be using an effective contraceptive, be post-

3x
5b

menopausal for at least 12 months prior to study entry, or surgically sterile; if not, a serum pregnancy test must be performed within 48 hours prior to treatment and the result made available prior to treatment initiation, an effective form of contraceptive should be implemented for at least 28 days following the last dose
5 of EYE001; adequate hematological function: hemoglobin ≥ 10 g/dl; platelet count $\geq 150 \times 10^9/l$; WBC $\geq 4 \times 10^9/l$; PTT within normal range of institution; adequate renal function: serum creatinine and BUN within 2 x the upper limit of normal (ULN) institution; adequate liver function: serum bilirubin ≤ 1.5 mg/dl; SGOT/ALT, SGPT/AST, and alkaline phosphatase within 2 x ULN of institution;
10 written informed consent; and ability to return for all study visits.

Exclusion Criteria: Patients were not eligible for the study if any of the following criteria were present in the study eye or systemically: patients scheduled to receive, or have received any prior Photodynamic Therapy with Visudyne; significant media opacities, including cataract, which might interfere
15 with visual acuity, assessment of toxicity or fundus photography; presence of other causes of choroidal neovascularization, including pathologic myopia (spherical equivalent of -8 diopters or more negative), the ocular histoplasmosis syndrome, angioid streaks, choroidal rupture and multifocal choroiditis; patients in whom additional laser treatment for choroidal neovascularization might be
20 indicated or considered; any intraocular surgery within 3 months of study entry; previous vitrectomy; previous or concomitant therapy with another investigational agent to treat AMD except multivitamins and trace minerals; previous radiation to the fellow eye with photons or protons; known allergies to the fluorescein dye used in angiography or to the components of EYE001
25 formulation; any of the following underlying systemic diseases including: uncontrolled diabetes mellitus or presence of diabetic retinopathy, cardiac disease: myocardial infarction within 12 months prior to study entry, and/or coronary disease associated with clinical symptoms, and/or indications of ischemia noted on ECG, impaired renal or hepatic function, stroke (within 12
30 months of study entry), active infection, active bleeding disorders, any major surgical procedure within one month of study entry, active peptic ulcer disease

38 21 3

with bleeding within 6 months of study entry; concomitant systemic therapy with corticosteroids (e.g. oral prednisone), or other anti-angiogenic drugs (e.g. thalidomide); previous radiation to the head and neck; any treatment with an investigational agent in the past 60 days for any condition; any diagnosis of cancer in the past 5 years, with the exception of basal or squamous cell carcinoma.

Study Medication.

Drug Supply

EYE001 was used as the anti-VEGF therapy in this study. EYE001 drug substance is a pegylated anti-VEGF aptamer. It was formulated in phosphate buffered saline at pH 5-7. Sodium hydroxide or hydrochloric acid may be added for pH adjustment.

EYE001 was formulated at three different concentrations: 3mg/100ul, 2mg/100ul and 1mg/100ul packaged in a sterile 1ml, USP Type I graduated glass syringe fitted with a sterile 27-gauge needle. The drug product was preservative-free and intended for single use by intravitreal injection only. The product was not used if cloudy or particles were present.

The active ingredient was EYE001 Drug Substance, (Pegylated) anti-VEGF aptamer, and 30 mg/ml, 20mg/ml and 10mg/ml concentrations. The excipients were Sodium Chloride, USP; Sodium Phosphate Monobasic, Monohydrate, USP; Sodium Phosphate Dibasic, Heptahydrate, USP; Sodium Hydroxide, USP; Hydrochloric acid, USP; and Water for injection, USP.

Dose and Administration

Preparation. The drug product was a ready-to-use sterile solution provided in a single-use glass syringe. The syringe was removed from refrigerated storage at least 30 minutes (but not longer than 4 hours) prior to use to allow the solution to reach room temperature. Administration of the syringe contents involved attaching the threaded plastic plunger rod to the rubber stopper inside the barrel of the syringe. The rubber end cap was then removed to allow administration of the product.

39.4

Treatment Regimen and Duration. EYE001 was administered as a 100 μ l intravitreal injections on three occasions at 28 day intervals. Patients were enrolled to receive 3mg/injection. If 3 or more patients experienced Dose-Limiting Toxicity (DLT's), the dose was reduced to 2mg and further to 1mg, if
5 necessary, each in an additional 10 patients.

PDT Administration.

PDT was given with EYE001 only in cases with predominantly classic CNV. The standard requirements and procedures for PDT administration were used as described in Arch Ophthalmol 1999, 117:1329-1345. PDT was required
10 to be given 5-10 days prior to administration of the anti-VEGF aptamer.

Patient Enrollment.

Before recruitment of patients into the study, written Institutional Review Board (IRB) approval of the protocol, and informed consent form were obtained. Case report form screening pages were completed by study site personnel.
15 Patients who meet the eligibility criteria and have provided written informed consent were enrolled in the study.

Follow-up Schedule.

Patients were clinically evaluated by the ophthalmologist several days after injection and again one-month later just prior to the next injection. ETDRS visual
20 acuities, kodachrome photography and fluorescein angiography were performed monthly for the first 4 months.

Endpoints.

The safety parameters given under the DLT section above were the primary endpoint of the studies. In addition, the percentage of patients with
25 stabilized (0 line change or better) or improved vision at 3 months, the percentage of patients with a 3-line or greater improvement at 3 months, and the need for PDT re-treatment at 3 month as determined by the investigator were other endpoints studied.

Results.

30 No serious related adverse events were noted for the 21 patients treated in this study. Two patients experienced serious unrelated adverse events. One

40
JH

patient, an 86 year-old woman with a long-standing history of peripheral vascular disease as well as borderline hypertension and type II diabetes mellitus experienced 2 myocardial infarctions, the second of which was fatal. The first event occurred 11 days following the first intraocular injection of anti-VEGF aptamer. The second event occurred 16 days following the third and last injection. The acute myocardial infarctions took place approximately 2 months apart. These events were believed to be unrelated to aptamer therapy by the investigator and systemic levels of the drug are negligible based on pharmacokinetic data. A second patient, a 76 year-old man with a 10-month history of depression attempted suicide with ingestion of acetaminophen 11 days after the third and last dose of anti-VEGF aptamer. The patient's mental condition improved. Treatment of the patient has remained unchanged and the patient is presently followed in the study.

Tables 1A-C show the unrelated or non-severe events reported in these groups. In patients treated with the anti-VEGF aptamer alone, ocular adverse events probably associated with administration of the anti-VEGF aptamer included vitreous floaters (4 Events), mild anterior chamber inflammation (3 Events), ocular irritation (2 Events), increased intraocular pressure (1 Event), intraocular air (1 Event), vitreous haze (1 Event), subconjunctival hemorrhage (1 Event), eye pain (1 Event), lid edema/erythema (1 Event), dry eye (1 Event) and conjunctival injection (1 Event). Events possibly related to administration of anti-VEGF aptamer included, asteroid hyalosis (1 Event), abnormal vision (1 Event) and fatigue (1 Event). Events termed unrelated to administration of anti-VEGF aptamer included headache (1 Event) and weakness (1 Event). In patients treated with the anti-VEGF aptamer and PDT adverse events probably associated with this combination of therapy included ptosis (5 Events), mild anterior chamber inflammation (4 Events), corneal abrasion (3 Events), eye pain (3 Events), foreign body sensation (2 Events), chemosis (1 Event), subconjunctival hemorrhage (1 Event) and vitreous prolapse (1 Event). Events possibly related to combination therapy included fatigue (2 Events). Events unrelated to combination therapy included pigment epithelial detachment (1 Event), joint pain

41.
AD

(1 Event), upper respiratory infection (1 Event) and bladder infection (1 Event).
The increase in ptosis and corneal abrasion seen in the setting of combination
therapy may be related to the use of a contact lens in association with PDT. Of
note, all instances of anterior chamber inflammation or vitreous haze were mild
5 and transient in nature.

42
A8

Table 1A. Adverse events associated with administration of anti-VEGF aptamer alone or in combination with PDT.

Adverse Event	Anti-VEGF Aptamer alone		Anti-VEGF Aptamer + PDT n=20	
Ptosis	0		5 (45.4)	
Lid Edema/Erythema	1 (10)		2 (18.2)	
Conjunctival Injection	1 (10)		0	
Chemosis	0		1 (9.1)	
Subconjunctival Hemorrhage	1 (10)		1 (9.1)	
Dry Eye	1 (10)		0	
Corneal Abrasion	0		3 (27.3)	
Anterior Chamber Inflammation	3 (30)	1+ Cells	4 (36.4)	Trace Cells
		Trace Cells		1+ KP; Trace Cells
		Trace Cells		Trace Cells
		Trace Cells		Trace Cells
IOP Increase	1 (10)		0	
Pupillary Abnormalities	0		0	
Rubeosis	0		1 (9.1)	
Cataract	0		0	
Vitreous Haze	1 (10)		2 (18.2)	
Vitreous Prolapse	0		1 (9.1)	
Vitreous Floaters	4 (40)		0	
Asteroid Hyalosis	1 (10)		0	
Intraocular Air	1 (10)		0	
Peripapillary Hemorrhage	0		1 (9.1)	

43
APZ

Adverse Event	Anti-VEGF Apoptin N (25) n (%)	Anti-VEGF Apoptin + PEG N (25) n (%)
Pigment Epithelial Detachment	0	1 (9.1)
Abnormal Vision	1 (10)	0
Photopsia	1 (10)	0
Foreign Body Sensation	1 (10)	2 (18.2)
Eye Pain	1 (10)	3 (27.3)
Blepharospasm	0	1 (9.1)
Ocular Irritation	2 (20)	1 (9.1)
Ocular Tenderness	0	1 (9.1)
Ocular Pruritis	1 (10)	0
Tearing	1 (10)	0
Headache	1 (10)	0
Rhinorrhea	0	1 (9.1)
Fatigue	1 (10)	2 (18.2)
Weakness	1 (10)	0
Joint Pain	0	1 (9.1)
Upper Respiratory Infection	0	1 (9.1)
Bladder Infection	0	1 (9.1)

44 AB

Table 1B. Adverse events associated with administration of anti-VEGF aptamer alone.

Adverse Event Reporting Group	Number of Subjects
Probably:	
Vitreous Floaters	4
Anterior Chamber Inflammation	3
Ocular Irritation	2
Vitreous Haze	1
Increased Intraocular Pressure	1
Intraocular Air	1
Subconjunctival Hemorrhage	1
Conjunctival Injection	1
Eye Pain	1
Lid Edema/Erythema	1
Dry Eye	1
Possibly:	
Asteroid Hyalosis	1
Abnormal Vision	1
Fatigue	1
Unrelated:	
Headache	1
Weakness	1

45
AH

Table 1C. Adverse events associated with administration of anti-VEGF aptamer and PDT.

Adverse Event (Reason for Visit)	Number of Patients (n)
Probably:	
Ptoxis	5
Anterior Chamber Inflammation	4
Corneal Abrasion	3
Eye Pain	3
Foreign Body Sensation	2
Chemosis	1
Subconjunctival Hemorrhage	1
Vitreous Prolapse	1
Possibly:	
Fatigue	2
Unrelated:	
Pigment Epithelial Detachment	1
Joint Pain	1
Upper Respiratory Infection	1
Bladder Infection	1

5 Two patients elected to prematurely terminate their participation in the study. One patient believed that her vision was not improving and did not want further injections. The other patient had depression and transportation problems. Both patients withdrew their consent prior to the third and last injection of the aptamer. Visual acuity in both patients remained stable throughout their

10 participation in the study. A third patient died prior to the final visit.

No dose decrease was required for any patients in the study. Review of color photographs and fluorescein angiograms of these patients revealed no signs of retinal vascular or choroidal toxicity.

46
AS

Of those patients (N=8) who completed the 3-month treatment regimen of the anti-VEGF aptamer alone 87.5% had stabilized or improved vision and 25.0% had a 3-line improvement of vision on the ETDRS chart at 3 months (See Table 2).

5

Table 2. Visual data of patients with subfoveal CNV treated with anti-VEGF aptamer alone.

Patient	Baseline	Day 8	Day 20	Day 32	Day 45	Δ Lines
03-001	20/50	20/40	20/40	20/32	20/32	+2
04-001	20/125	20/64	20/80	20/80	20/80	+2
06-001	20/160	20/125	20/100	20/125	OUT	+1
07-001	20/100	20/100	20/64	20/80	20/80	+1
07-002	20/320	20/80	20/64	20/64	20/50	+8
08-001	20/125	20/125	20/100	20/100	20/160	-1
09-001	20/500	20/200	20/400	20/320 (Day 36)	OUT	+2
10-001	20/500	20/640	20/500	20/400	20/500	0
10-002	20/200	20/125	20/160	20/160	20/160	+1
10-003	20/400	20/160	20/160	20/160	20/126	+5

47
26

CHANGE IN VISION AT 3 MONTHS

	Stabilized or Improved	Unimproved
EYE001 Treated - (N=8) which represents all eyes that completed the protocol.	87.5%	25.0%

Eleven patients were treated with both the anti-VEGF aptamer and PDT.
In this group of patients (N=10) who completed the 3-month treatment regimen,
90% had stabilized or improved vision and 60% showed a 3-line improvement of
vision on the ETDRS chart at 3 months (Table 3). These 3-line improvements
included gains of +3, +5, +4, +4, +6, and +3 ETDRS lines of vision.

48
A1

Table 3. Visual data of patients with subfoveal CNV treated with anti-VEGF aptamer combined with PDT.

Patient	Baseline	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Response	Score
06-011	20/400	20/320	20/100	20/640	20/200	NO	+3
06-012	20/250	20/160	20/125	20/125	20/80	NO	+5
08-011	20/40	20/32	20/20	20/20	20/26	YES	+2
10-011	20/160	20/160	20/160	20/160	OUT	NO	0
05-011	20/100	20/64	20/64	20/64	20/40	NO	+4
12-011	20/160	20/100	20/250	20/200	20/200	NO	-1
06-013	20/800	20/640	20/800	20/800	20/320	YES	+4
02-011	20/500	20/200	20/160	20/80	20/126	YES	+6
06-014	20/100	20/80	20/80	20/40	20/100	NO	0
06-015	20/125	20/40	20/64	20/50	20/80	NO	+2
02-012	20/500	20/500	20/125	20/320	20/250	YES	+3

49
46

CHANGE IN VISION AT 3 MONTHS

	Estimated or Improved	Estimated or Improved
EYE001 Treated - (N=10) which represents all eyes that completed the protocol.	90%	60%

Of the remaining patients who did not show a 3-line gain, only one showed a loss of vision at 3 months and this patient lost only one line of vision at this time point. No patient in this group lost more than one line of vision at 3 months.

Repeat PDT treatment at 3 months (whose need was solely determined by the investigator) was performed in 4 of 10 eyes (40%) that participated for the complete duration of the study.

10

Other Embodiments

Although the present invention has been described with reference to preferred embodiments, one skilled in the art can easily ascertain its essential characteristics and without departing from the spirit and scope thereof, can make various changes and modifications of the invention to adapt it to various usages and conditions. Those skilled in the art will recognize or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed in the scope of the present invention.

All publications, patents, and patent applications mentioned in this specification are herein incorporated by reference.

We claim:

5⁹
AAClaims

1. A method for treating an ocular neovascular disease in a patient, said method comprising the steps of:
 - (a) administering to said patient an effective amount of an anti-VEGF aptamer; and
 - (b) providing said patient with phototherapy.
2. The method of claim 1, wherein said phototherapy comprises photodynamic therapy (PDT).
3. The method of claim 1, wherein said phototherapy comprises thermal laser photocoagulation.
4. The method of claim 1, wherein said neovascular disease is selected from the group consisting of ischemic retinopathy, intraocular neovascularization, age-related macular degeneration, corneal neovascularization, retinal neovascularization, choroidal neovascularization, diabetic macular edema, diabetic retina ischemia, diabetic retinal edema, and proliferative diabetic retinopathy.
5. The method of claim 4, wherein said neovascular disease is age-related macular degeneration.
6. The method of claim 4, wherein said neovascular disease is proliferative diabetic retinopathy.
7. The method of claim 1, wherein said anti-VEGF aptamer comprises a nucleic acid ligand to vascular endothelial growth factor (VEGF).

51.
40

8. The method of claim 7, wherein said VEGF nucleic acid ligand comprises ribonucleic acid.

9. The method of claim 7, wherein said VEGF nucleic acid ligand comprises deoxyribonucleic acid.

10. The method of claim 7, wherein said VEGF nucleic acid ligand comprises modified nucleotides.

11. The method of claim 10, wherein said VEGF nucleic acid ligand comprises 2'-F-modified nucleotides.

12. The method of claim 11, wherein said VEGF nucleic acid ligand comprises a polyalkylene glycol.

13. The method of claim 12, wherein said polyalkylene glycol is polyethylene glycol (PEG).

14. The method of claim 7, wherein said VEGF nucleic acid ligand comprises ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid.

15. The method of claim 10, wherein said VEGF nucleic acid ligand comprises 2'-O-methyl (2'-OMe) modified nucleotides.

16. The method of claim 10 wherein said VEGF nucleic acid ligand is modified with a moiety that decreases the activity of endonucleases or exonucleases on the nucleic acid ligand relative to the unmodified nucleic acid ligand, without adversely affecting the binding affinity of said ligand.

17. The method of claim 16, wherein said moiety comprises a phosphorothioate.

52
61

18. The method of claim 1, wherein said anti-VEGF aptamer is administered by injection.

19. The method of claim 1, wherein said step of administering comprises introducing a device into the eye of said patient, said device comprising said anti-VEGF aptamer.

20. The method of claim 19, wherein said device delivers said anti-VEGF aptamer to the eye by transcleral diffusion.

21. The method of claim 19, wherein said device delivers said anti-VEGF aptamer directly into the vitreous humor of the eye.

22. The method of claim 2, wherein said photodynamic therapy (PDT) comprises the steps of:

- (i) delivering a photosensitizer to the eye tissue of said patient; and
- (ii) exposing the photosensitizer to light having a wavelength absorbed by said photosensitizer for a time and at an intensity sufficient to inhibit neovascularization in said eye tissue.

23. The method of claim 22, wherein said photosensitizer is selected from the group consisting of benzoporphyrin derivatives (BPD), monoaspartyl chlorin e6, zinc phthalocyanine, tin etiopurpurin, tetrahydroxy tetraphenylporphyrin, and porfimer sodium (PHOTOFRIN®), and green porphyrins.

24. The method of claim 22, wherein said photosensitizer is a benzoporphyrin derivative.

53.
52

25. A method for treating an ocular neovascular disease in a patient, said method comprising administering to said patient:

- (a) an effective amount of an anti-VEGF aptamer; and
- (b) a second compound capable of diminishing or preventing the development of unwanted neovasculation.

26. The method of claim 25, wherein said neovascular disease is selected from the group consisting of ischemic retinopathy, intraocular neovascularization, age-related macular degeneration, corneal neovascularization, retinal neovascularization, choroidal neovascularization, diabetic macular edema, diabetic retina ischemia, diabetic retinal edema, and proliferative diabetic retinopathy.

27. The method of claim 26, wherein said neovascular disease is age-related macular degeneration.

28. The method of claim 27, wherein said neovascular disease is proliferative diabetic retinopathy.

29. The method of claim 25, wherein said anti-VEGF aptamer comprises a nucleic acid ligand to vascular endothelial growth factor (VEGF).

30. The method of claim 29, wherein said VEGF nucleic acid ligand comprises ribonucleic acid.

31. The method of claim 29, wherein said VEGF nucleic acid ligand comprises deoxyribonucleic acid.

32. The method of claim 29, wherein said VEGF nucleic acid ligand comprises modified nucleotides.

52
B

33. The method of claim 32, wherein said VEGF nucleic acid ligand comprises 2'-F-modified nucleotides.

34. The method of claim 33, wherein said VEGF nucleic acid ligand comprises a polyalkylene glycol.

35. The method of claim 34, wherein said polyalkylene glycol is polyethylene glycol (PEG).

36. The method of claim 25, wherein said second compound comprises a VEGF antibody.

37. The method of claim 32, wherein said VEGF nucleic acid ligand comprises 2'-O-methyl (2'-OMe) modified nucleotides.

38. The method of claim 32, wherein said VEGF nucleic acid ligand is modified with a moiety that decreases the activity of endonucleases or exonucleases on the nucleic acid ligand relative to the unmodified nucleic acid ligand, without adversely affecting the binding affinity of said ligand.

39. The method of claim 38, wherein said moiety comprises a phosphorothioate.

40. The method of claim 25, wherein said anti-VEGF aptamer is administered by injection.

41. The method of claim 25, wherein said step of administering comprises introducing a device into the eye of said patient, said device comprising said anti-VEGF aptamer.

55
5A

42. The method of claim 41, wherein said device delivers said anti-VEGF aptamer to the eye by transcleral diffusion.

43. The method of claim 41, wherein said device delivers said anti-VEGF aptamer directly into the vitreous humor of the eye.

44. A method for treating an ocular neovascular disease in a patient, said method comprising the steps of:

- (a) administering to said patient an effective amount of an anti-VEGF aptamer that inhibits the development of ocular neovascularization; and
- (b) providing said patient with a therapy that destroys abnormal blood vessels in the eye.

45. The method of claim 44, wherein said aptamer inhibits a growth factor.

46. The method of claim 45, wherein said growth factor is VEGF.

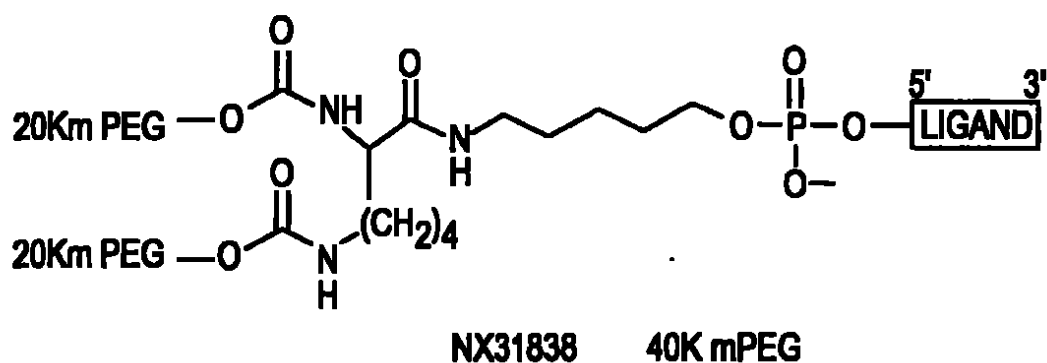
47. The method of claim 46, wherein said aptamer is a nucleic acid ligand to VEGF.

48. The method of claim 47, wherein said therapy is photodynamic therapy (PDT).

49. A method for treating an ocular neovascular disease in a patient, said method comprising administering to an eye of said patient between about 0.3mg to about 3mg of a modified nucleic acid ligand to VEGF.

56


FIG. 1



Ligand Component =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-3'3'-dT
 (VEGF ligand)

5x 26

PROCEDIMIENTOS PARA TRATAR ENFERMEDADES**NEOVASCULARES OCULARES****Campo de la Invención**

La invención se refiere a procedimientos para tratar la neovascularización ocular
5 usando agentes que inhiben el VEGF.

Antecedentes de la Invención

La angiogénesis o crecimiento anormal de los vasos sanguíneos, ha estado
implicada como una importante causa de estados patológicos en muchas áreas de la
medicina, incluyendo oftalmología, cáncer y reumatología. Por ejemplo, la forma
10 exudativa o neovascular de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es
una de las principales causas de ceguera en personas mayores. Actualmente, en la
mayoría de los pacientes no hay ninguna terapia convencional y eficaz para el
tratamiento de ADM exudativa. Se ha demostrado que la fotocoagulación térmica con
láser y la terapia fotodinámica (PDT) son beneficiosas para subgrupos de tales
15 pacientes. Sin embargo, sólo una fracción de ojos reúne los criterios de elegibilidad para
tales intervenciones terapéuticas y los que se han tratado tienen un alto porcentaje de
reaparición.

Recientes estudios preclínicos han sugerido que la intervención farmacológica o
terapia anti-angiogénesis puede ser útil para tratar diversas formas de
20 neovascularización ocular, tales como la neovascularización coroidal (CNV). Gran parte
de este trabajo se ha enfocado en el bloqueo del factor de crecimiento del endotelio
vascular (VEGF), que ha estado implicado en la patogénesis de CNV secundaria a
AMD y en la patogénesis de retinopatías diabéticas. VEGF es un importante factor de
crecimiento de citoquinas implicado en la angiogénesis y parece desempeñar un papel
25 vital en el desarrollo de la neovascularización ocular. Los estudios en humanos han

58
5/

demostrado que en el vítreo en caso de trastornos retinianos angiogénicos pero no en estados de enfermedad inactivos o de no neovascularización están presentes altas concentraciones de VEGF. La CNV humana escindida después de una intervención quirúrgica submacular experimental también ha mostrado altos niveles de VEGF. Otros estudios han mostrado una regresión o prevención de la neovascularización en múltiples lechos vasculares en varios modelos de animal, usando diversos tipos de agentes anti-VEGF, incluyendo fragmentos de anticuerpo. De esta forma, la terapia anti-VEGF es un nuevo tratamiento prometedor para AMD, retinopatía diabética y trastornos relacionados. --- --

10 Además de un potencial efecto anti-angiogénico, la terapia anti-VEGF puede ser útil como agente anti-permeabilidad. Inicialmente, VEGF se refirió al el factor de permeabilidad vascular debido a su gran capacidad para inducir la filtración desde los vasos sanguíneos. Recientes investigaciones han demostrado que VEGF puede ser importante a la hora de provocar la filtración de los vasos en la retinopatía diabética y
15 que la ruptura de la barrera hematorretinaria inducida por la diabetes puede inhibirse de una forma dependiente de la dosis con una terapia anti-VEGF. Por lo tanto, la terapia anti-VEGF puede representar un ataque bifásico en la CNV mediante sus propiedades anti-angiogénicas y anti-permeabilidad.

Los procedimientos existentes para tratar la enfermedad neovascular ocular
20 necesitan mejorar en cuanto a capacidad para inhibir o eliminar diversas formas de neovascularización, incluyendo la neovascularización coroidal secundaria a AMD y retinopatías diabéticas. Además, hay una continua y significativa necesidad de identificar nuevas terapias para tratar la neovascularización ocular. La presente invención cumple estas necesidades y además proporciona otras ventajas relacionadas.

5a
50

Se han realizado ensayos clínicos de un aptámero anti-VEGF con y sin terapia fotodinámica en pacientes con neovascularización coroidal subfovea secundaria a la degeneración macular relacionada con la edad para determinar un perfil de seguridad de la terapia de múltiples inyecciones. Se descubrió que la terapia anti-VEGF con o sin la

5 terapia fotodinámica (PDT) era a la vez segura y eficaz para tratar a los pacientes que padecían AMD y trastornos relacionados. La mayoría de los pacientes que recibieron el aptámero anti-VEGF presentaron una visión estable o mejorada tres meses después del tratamiento. Los que recibieron terapia anti-VEGF en combinación con PDT presentaron la mejora más espectacular de la visión. De esta forma, la terapia anti-

10 VEGF, ya sea por si solo o junto con terapias angiogénicas, es un tratamiento claramente prometedor para diversas formas de neovascularización ocular, incluyendo AMD y retinopatía diabética.

Por consiguiente, la presente invención describe un procedimiento para tratar a un paciente que padece una enfermedad neovascular ocular, el cual incluye las

15 siguientes etapas: (a) administrar al paciente una cantidad eficaz de un aptámero anti-VEGF; y (b) proporcionar al paciente una fototerapia, tal como terapia fotodinámica o fotocoagulación térmica con láser.

En una realización de la invención, la terapia fotodinámica (PDT) incluye las etapas de: (i) suministrar un fotosensibilizador al tejido ocular de un paciente; y (ii)

20 exponer el fotosensibilizador a la luz que tiene una longitud de onda absorbida por el fotosensibilizador durante un período de tiempo y a una intensidad suficiente para inhibir la neovascularización en el tejido ocular del paciente. Pueden usarse diversos fotosensibilizadores, incluyendo pero sin limitación, derivados de benzoporfirina (BPD), monoaspartil clorina e6, ftalocianina de cinc, etiopurpurina de estaño,

25 tetrahidroxi tetrafenil porfirina, y porfimer de sodio (PHOTOFRIN®), y porfirinas

60
SR

verdes.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad neovascular ocular en un paciente, el cual implica administrar al paciente: (a) una cantidad eficaz de un aptámero anti-VEGF; y (b) un
5 segundo compuesto capaz de disminuir o prevenir el desarrollo de neovascularización no deseada. Los agentes anti-VEGF u otros compuestos que pueden combinarse con aptámeros anti-VEGF incluyen, pero sin limitación: anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos de VEGF, anticuerpos específicos de receptores de VEGF; compuestos que inhiben, regulan y/o modulan la transducción de la señal tirosina
10 quinasa; polipéptidos de VEGF; oligonucleótidos que inhiben la expresión de VEGF en el nivel de ácido nucleico, por ejemplo, ARN antisentido; retinoides; composiciones que contienen el factor de crecimiento; anticuerpos que se unen a colágenos; y diversos compuestos orgánicos y otros agentes con actividad que inhibe la angiogénesis.

En una realización preferida de la invención, el agente anti-VEGF es un ligando
15 de ácido nucleico para el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El ligando de ácido nucleico de VEGF puede incluir ácido ribonucleico, ácido desoxirribonucleico y/o nucleótidos modificados. En realizaciones particularmente preferidas, el ligando de ácido nucleico de VEGF incluye nucleótidos 2'-F-modificados, nucleótidos 2'-O-metilo (2'-OMe) modificados, y/o un polialquilenglicol, tal como el
20 polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, el ligando de ácido nucleico de VEGF se modifica con un fragmento, por ejemplo un fosforotioato, que disminuye la actividad de endonucleasas o exonucleasas en el ligando de ácido nucleico con relación al ligando de ácido nucleico no modificado, sin afectar de forma adversa la afinidad de unión del ligando.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar una

61
GD

enfermedad neovascular ocular en un paciente, el cual implica la etapas de: (a) administrar al paciente una cantidad eficaz de un agente que inhibe el desarrollo de la neovascularización ocular, por ejemplo, un aptámero anti-VEGF; y (b) proporcionar al paciente una terapia que destruya los vasos sanguíneos anormales en el ojo, por ejemplo

5 PDT.

El aptámero anti-VEGF puede administrarse por vía intraocular mediante una inyección en el ojo. Como alternativa, el aptámero puede suministrarse usando un implante intraocular.

Los procedimientos de la invención pueden usarse para tratar diversas

10 enfermedades neovasculares, incluyendo pero sin limitación, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización de la córnea, neovascularización retiniana, neovascularización coroidal, edema macular diabético, isquemia retiniano diabético, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa.

15 Otras ventajas y características de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la misma y de las reivindicaciones.

Definiciones

Por "enfermedad neovascular ocular" se entiende una enfermedad caracterizada por una neovascularización ocular, es decir, el desarrollo de vasos sanguíneos

20 anormales en el ojo de un paciente.

Por "paciente" se entiende cualquier animal que tiene tejido ocular que puede someterse a neovascularización. Preferiblemente, el animal es un mamífero que incluye, pero sin limitación, seres humanos y otros primates. El término también incluye animales domésticos, tales como vacas, cerdos, ovejas, caballos, perros y gatos.

25 Por "fototerapia" se entiende cualquier proceso o procedimiento en el que un

b2
fz

paciente se expone a una dosis específica de luz de una longitud de onda particular, incluyendo la luz de un láser, para tratar una enfermedad u otra afección médica.

Por "terapia fotodinámica" o "PDT" se entiende cualquier forma de fototerapia que use un fármaco o compuesto activado por luz, denominado en este documento
5 fotosensibilizador, para tratar una enfermedad u otra afección médica caracterizada por un tejido que crece rápidamente, incluyendo la formación de vasos sanguíneos anormales (es decir, angiogénesis). Típicamente, la PDT es un procedimiento de dos etapas que implica una administración local o sistémica del fotosensibilizador a un paciente seguido de la activación del fotosensibilizador mediante irradiación con una
10 dosis específica de luz de una longitud de onda particular.

Por "agente anti-VEGF" se entiende un compuesto que inhibe la actividad o producción del factor de crecimiento del endotelio vascular ("VEGF").

Por "fotosensibilizador" o "agente fotoactivo" se entiende un fármaco que absorbe la luz u otro compuesto que tras exponerse a la luz de una longitud de onda
15 particular se activa, promoviendo, por lo tanto, una situación fisiológica deseada, por ejemplo, el deterioro o destrucción de células o tejido no deseado.

Por "fotocoagulación térmica con láser" se entiende una forma de fototerapia en la cual los rayos de luz del láser se dirigen al ojo de un paciente para cauterizar los vasos sanguíneos anormales del ojo para sellarlos de una filtración posterior.

20 Por "cantidad eficaz" se entiende una cantidad suficiente para tratar un síntoma de una enfermedad neovascular ocular.

El término "luz" como se usa en este documento incluye todas las longitudes de onda de la radiación electromagnética, incluyendo la luz visible. Preferiblemente, la longitud de onda de la radiación se selecciona para ajustar la longitud o longitudes de
25 onda que excitan el fotosensibilizador. Incluso más preferiblemente, la longitud de onda

de la radiación se ajusta a la longitud de onda de la excitación del fotosensibilizador y tiene una baja absorción por parte de tejidos no diana.

Breve Descripción de los Dibujos

La FIGURA 1 es la estructura química del agente anti-VEGF NX1838.

5

Descripción Detallada

VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) es un importante estímulo para el crecimiento de los nuevos vasos sanguíneos en el ojo. Se ha descubierto que la terapia anti-VEGF proporciona un tratamiento seguro y eficaz para enfermedades neovasculares, sobre todo cuando se combina con una terapia-secundaria que puede reducir o eliminar la neovascularización ocular, tal como, por ejemplo, la terapia fotodinámica (PDT). Se ha descubierto que la combinación de estas terapias es muy superior tratando afecciones caracterizadas por el desarrollo de neovascularización no deseada en el ojo que la mayoría de los tratamientos convencionales, incluyendo el uso de cualquiera de estas terapias solas.

15

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad neovascular ocular que implica administrar a un paciente un agente anti-VEGF y tratar al paciente con fototerapia (por ejemplo, PDT) o con otras terapias, tales como fotocoagulación, que destruye los vasos sanguíneos anormales en el ojo. Este procedimiento puede usarse para tratar diversas enfermedades oftalmológicas y trastornos marcados por el desarrollo de neovascularización ocular, incluyendo pero sin limitación, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización de la córnea, neovascularización retiniana, neovascularización coroidal, edema macular diabético, isquemia retiniana diabético, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa.

20

25

Terapia anti-VEGF

64
63

En los procedimientos de la presente invención están disponibles y pueden usarse diversas terapias anti-VEGF que inhiben la actividad o la producción de VEGF, incluyendo aptámeros y anticuerpos VEGF. Los agentes anti-VEGF preferidos son los ligandos de ácido nucleico de VEGF, tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 6.168.778 B1, 6.147.204; 6.051.698; 6.011.020; 5.958.691; 5.817.785; 5.811.533; 5.696.249; 5.683.867; 5.670.637 y 5.475.096. Un agente anti-VEGF particularmente preferido es EYE001 (previamente denominado NX1838), que es un aptámero pegilado modificado que se une con alta afinidad a la principal isoforma de VEGF humana-soluble y tiene la estructura general mostrada en la FIGURA 1 (descrita en la Patente de Estados Unidos N° 6.168.788; Journal of Biological Chemistry, Vol. 273 (32): 20556-20567 (1998); y In Vitro Cell Dev. Biol. Animal Vol. 35:533-542 (1999)).

Como alternativa, los agentes anti-VEGF pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de VEGF o fragmentos de anticuerpo, tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 6.100.071; 5.730.977; y el documento WO 98/45331. Otros agentes anti-VEGF adecuados o compuestos que pueden usarse en combinación con agentes anti-VEGF de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos específicos de receptores de VEGF (por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.955.311; 5.874.542 y 5.840.301); compuestos que inhiben, regulan y/o modulan la transducción de la señal de tirosina quinasa (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.313.138 B1); polipéptidos de VEGF (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.270.933 B1 y el documento WO 99/47677); oligonucleótidos que inhiben la expresión de VEGF en el nivel de ácidos nucleicos, por ejemplo ARN antisentido (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.710.136; 5.661.135; 5.641.756; 5.639.872 y 5.639.736); retinoides (por ejemplo, la Patente de Estados

65
GA

Unidos N°. 6.001. 885); composiciones que contienen el factor de crecimiento (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N°. 5.919.459); anticuerpos que se unen a colágenos (por ejemplo, el documento WO 00/40597); y diversos compuestos orgánicos y otros agentes con actividad inhibidora de la angiogénesis (Patente de Estados Unidos
5 N° 6.297.238 B1; 6.258.812 B1 y 6.114.320).

Administración de agentes anti-VEGF

Una vez que un paciente ha sido diagnosticado con un trastorno neovascular del ojo, al paciente se le trata mediante la administración de un agente anti-VEGF para bloquear los efectos negativos de VEGF, aliviando por lo tanto los síntomas asociados
10 con la neovascularización. Como se ha analizado anteriormente, en la técnica se conocen una amplia variedad de agentes anti-VEGF y pueden usarse en la presente invención. Los procedimientos para preparar estos agentes anti-VEGF también son bien conocidos y muchos son medicamentos disponibles en el mercado.

Los agentes anti-VEGF pueden administrarse por vía sistémica, por ejemplo, por
15 vía oral o por inyección IM o IV, en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable adaptado para la vía de administración. Pueden usarse diversos vehículos fisiológicamente aceptables para administrar los agentes anti-VEGF y sus formulaciones son conocidas para los especialistas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª edición), ed. A. Gennaro, 1990, Mack
20 Publishing Company, Easton, PA y Pollock y col.

Los agentes anti-VEGF se administran preferiblemente por vía parenteral (por ejemplo, por inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraocular, intravítrea o subcutánea, o implante). Las formulaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones o emulsiones. Pueden
25 usarse diversos vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina

b
b

y similares. Los ejemplos de otros vehículos adecuados incluyen polipropilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, gelatina, naftalenos hidrogenados y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Tales formulaciones también pueden contener sustancias auxiliares, tales como agentes conservantes, humectantes, tamponantes, emulsionantes, y/o de dispersión. Pueden usarse polímeros de lactida biodegradables, biocompatibles, copolímeros lactida/glicolida, o copolímeros polioxietilen-polioxipropileno para controlar la liberación de los ingredientes activos.

Como alternativa, los agentes anti-VEGF pueden administrarse por ingestión oral. Las composiciones pensadas para uso oral pueden prepararse en formas sólidas o líquidas, de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas. Las composiciones pueden contener, opcionalmente, un agente edulcorante, aromatizante, colorante, de perfume y conservantes para proporcionar una preparación más apetitosa.

Las formas de dosificación sólida para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. Generalmente, estas preparaciones farmacéuticas contienen ingrediente activo mezclado con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Estos pueden incluir, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, el carbonato sódico, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, celulosa, almidón, fosfato cálcico, fosfato sódico, caolín y similares. También pueden usarse agentes aglutinantes, tamponantes y/o lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio). Pueden prepararse adicionalmente comprimidos y píldoras con recubrimientos entéricos.

Las formas de dosificación líquida para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y cápsulas de gelatina blanda farmacéuticamente aceptables. Estas formas contienen diluyentes inertes usados

b7
bb

comúnmente en la técnica, tales como el agua o un medio oleoso, y también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de suspensión.

Los agentes anti-VEGF también pueden administrarse tópicamente, por ejemplo,
5 mediante un parche o mediante la aplicación directa en el ojo, o por iontoforesis.

Los agentes anti-VEGF pueden proporcionarse en composiciones de liberación sostenida, tales como las descritas en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.672.659 y 5.595.760. El uso de composiciones de liberación inmediata o sostenida depende de la naturaleza de las afecciones a tratar. Si la afección consiste en un
10 trastorno agudo o sobreagudo, se preferirá un tratamiento con una forma de liberación inmediata sobre una composición de liberación prolongada. Como alternativa, para ciertos tratamientos preventivos o a largo plazo, puede ser apropiada una composición de liberación sostenida.

El agente anti-VEGF también puede liberarse usando un implante intraocular.
15 Tales implantes pueden ser implantes biodegradables y/o biocompatibles, o pueden ser implantes no biodegradables. Los implantes pueden ser permeables o impermeables al agente activo, y pueden insertarse en una cámara del ojo, como la cámara anterior o posterior, o pueden implantarse en la esclera, espacio transcoroidal, o una región no vascularizada exterior al vítreo. En una realización preferida, el implante puede
20 colocarse sobre una región avascular, tal como en la esclera, de tal forma que se permita la difusión del fármaco a través de la esclera hasta el sitio de tratamiento deseado, por ejemplo, el espacio intraocular y la mácula del ojo. Además, el sitio de difusión a través de la esclera preferiblemente está cerca de la mácula.

Los ejemplos de implantes para la liberación de un agente anti-VEGF incluyen,
25 pero sin limitación, los dispositivos descritos en las Patentes de Estados Unidos Nos.

68 67

3.416.530; 3.838.777; 4.014.335; 4.300.557; 4.327.725; 4.853.224; 4.946.450;
4.997.652; 5.147.647; 5.164.188, 5.178.635; 5.300.114; 5.322.691; 5.403.901;
5.443.505; 5.466.466; 5.476.511; 5.516.522; 5.632.948; 5.679.666; 5.710.165;
5.725.493; 5.743.274; 5.766.242; 5.766.619; 5.770.592; 5.773.019; 5.824.072;
5 5.824.073; 5.830.173; 5.836.935; 5.869.079; 5.902.598; 5.904.144; 5.916.584;
6.001.386; 6.074.661; 6.110.485; 6.126.687; 6.146.366; 6.251.090 y 6.299.895 y en los
documentos WO 01/30323 y WO 01/28474 todas las cuales se incorporan en este
documento como referencia.

Dosificación

10 La cantidad de ingrediente activo que se combina con los materiales de vehículo
para producir una sola dosificación variará dependiendo del sujeto a tratar y del modo
particular de administración. Generalmente, el agente anti-VEGF debe administrarse en
una cantidad suficiente para reducir o eliminar un síntoma de una enfermedad
neovascular ocular.

15 Niveles de dosificación en el orden de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg de
peso corporal por administración son útiles en el tratamiento de los trastornos
neovasculares mencionados anteriormente. Cuando se administra directamente en el
ojo, el intervalo de dosificación preferido es de aproximadamente 0,3 mg a
aproximadamente 3 mg por ojo. La dosificación puede administrarse como una sola
20 dosis o dividida en múltiples dosis. En general, la dosificación deseada debe
administrarse a intervalos definidos durante un periodo prolongado, normalmente por lo
menos a lo largo de varias semanas, aunque pueden necesitarse periodos más largos de
administración de varios meses o más.

Un especialista en la técnica apreciará que las dosificaciones individuales
25 exactas pueden ajustarse en alguna medida dependiendo de una diversidad de factores

69
19
60

que incluyen el agente anti-VEGF específico a administrar, el momento de administración, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la velocidad de excreción, el trastorno particular a tratar, la gravedad del trastorno, y la edad, peso, salud y género del paciente. Se esperan amplias variaciones en la dosificación necesaria en vista de las diferentes eficacias de las diversas vías de administración. Por ejemplo, generalmente sería de esperar que la administración oral requiriera niveles de dosificación mayores que la administración por inyección intravenosa o intravítrea. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas convencionales para la optimización, las cuales son bien conocidas en la técnica. Los niveles y patrones de dosificación terapéuticamente precisos eficaces se determinan preferiblemente por el médico correspondiente en consideración de los factores anteriormente identificados.

Además, de tratar enfermedades neovasculares preexistentes, los agentes anti-VEGF pueden administrarse profilácticamente para prevenir o retardar el inicio de estos trastornos. En aplicaciones profilácticas, un agente anti-VEGF se administra a un paciente susceptible o, de otra manera, en riesgo de padecer un trastorno neovascular particular. De nuevo, las cantidades precisas que se administran dependen de varios factores tales como el estado de salud del paciente, el peso, etc.

Eficacia de la terapia Anti-VEGF

Para evaluar la eficacia de la terapia anti-VEGF para tratar la neovascularización ocular, se realizaron varios estudios, los cuales se describen en los ejemplos presentados a continuación, que implicaban la administración de un aptámero anti-VEGF con y sin terapia fotodinámica en pacientes que padecían una neovascularización coroidal subfovea secundaria a una degeneración macular relacionada con la edad. Un estudio de una sola inyección intravítrea de Fase 1A de la

20
68

terapia anti-VEGF para pacientes con neovascularización coroidal subfovea (CNV) secundaria a una degeneración macular relacionada con la edad (AMD) reveló un excelente perfil de seguridad (Ejemplo 6). La evaluación oftalmológica reveló que el 80% de los pacientes mostraba una visión estable o mejorada 3 meses después del tratamiento y que el 27% de los ojos demostró una mejora de 3 líneas o más en la visión en los diagramas de ETDRS en este período de tiempo. No se notificó ningún evento adverso relacionado significativo local o sistémicamente. Estos datos demostraron que la terapia anti-VEGF es una nueva alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades neovasculares del ojo, incluyendo la degeneración macular exudativa y la retinopatía diabética.

También se realizó un estudio de seguridad de múltiples dosis descendientes de Fase 1B de la terapia anti-VEGF usando múltiples inyecciones intravítreas del aptámero anti-VEGF con o sin terapia fotodinámica en pacientes con CNV subfovea secundaria a AMD (Ejemplo 7). El estudio de seguridad no mostró problemas de seguridad significativos relacionados con el fármaco. La evaluación oftalmológica reveló que el 87,5% de los pacientes que recibieron el aptámero anti-VEGF mostraron una visión estable o mejorada 3 meses después del tratamiento y que un 25% de los ojos demostraron una mejora de 3 líneas o más en la visión del diagrama de ETDRS en ese período de tiempo. Se detectó una ganancia de 3 líneas del 60% a 3 meses en pacientes que recibieron tanto el aptámero anti-VEGF como la terapia fotodinámica. Las múltiples inyecciones intravítreas del aptámero anti-VEGF fueron muy bien toleradas en este estudio de Fase 1B.

Los resultados de este estudio clínico de inyección intravítrea múltiple de Fase 1B de la terapia anti-VEGF (Ejemplo 7) expanden el excelente perfil de seguridad presentado por el estudio de los autores de una sola inyección de Fase 1A (Ejemplo 6).

71
2/10

Específicamente, el estudio de Fase IB muestra la seguridad intraocular y sistémica de tres inyecciones intravítreas consecutivas de aptámero anti-VEGF administradas mensualmente. No se notificó ningún evento adverso serio relacionado. Los eventos adversos encontrados parecían no estar relacionados, o los eventos menores en algunos casos probablemente se debían a la propia inyección intravítrea.

La ganancia de 3 líneas observada en 25% del grupo sólo tratado con aptámero después de 3 meses se compara favorablemente con controles históricos tales como los resultados del ensayo pivotal de PDT (2,2%) y sus controles (1,4%) a 3 meses (Arch Ophthalmol 1999, 117:1329-1345) y un grupo de control de la radiación simulada (3%) (Ophthalmology 1999, 106; 12:2239-2247) donde no más del 3% de los pacientes mostró una mejoría de ese tipo en este mismo período de tiempo.

La ganancia de 3 líneas de 25% a los 3 meses es coherente con la proporción de mejora de 26,7% detectada en el estudio de Fase 1A del aptámero. Puede ser que los efectos anti-permeabilidad del fármaco causaran una resorción del fluido subretiniano y, de esta manera, mejoraran la visión en estos casos. De manera interesante, un estudio reciente que usaba un fragmento de anticuerpo anti-VEGF de Genentech también mostró una proporción de ganancia de 3 líneas del 26% en un ensayo clínico de Fase 1. Este fragmento de anticuerpo comparte el mismo mecanismo de bloqueo del VEGF extracelular que el aptámero anti-VEGF.

La proporción de estabilización o de mejora del 87,5% observada a los 3 meses en el estudio de Fase IB también se compara favorablemente con la proporción del 50,5% para los pacientes tratados con PDT en ese ensayo pivotal (Arch Ophthalmol 1999, 117:1329-1345), la proporción del 44% en los controles PDT, y la proporción del 48% en el grupo de control de radiación simulada (Ophthalmology 1999, 106: 12: 2239-2247).

72
7/8

La ganancia de 3 líneas de 60% a los 3 meses en los pacientes que recibieron tanto el aptámero anti-VEGF como PDT también fue muy alentadora. En el ensayo pivotal de PDT de Fase 3, tan sólo el 2,2% de los pacientes mostraron tal mejoría visual (Arch Ophthalmol 1999, 117:1329-1345). Estos dos grupos de estudio incluyeron ojos
5 con CNV subfovea clásica. La mejoría en la visión observada en estos ojos se confirma con el hallazgo de que los investigadores escogieron re-tratar con PDT a los 3 meses en sólo el 40% de los casos en comparación con el 93% de proporción de retratamiento informada en el ensayo de PDT pivotal (Arch Ophthalmol, 1999, 117: 1329-1345).

Además, numerosos estudios pre-clínicos ahora demuestran que la terapia anti-
10 VEGF puede prevenir la neovascularización inducida por VEGF de la córnea, iris, retina y coroides (Arch Ophthalmol 1996, 114: 66-7; Invest Ophthalmol Vis Sci 1994, 35; 101). Los estudios pre-clínicos descritos a continuación en los Ejemplos 1 - 5 con EYE001 proporcionan evidencia que la terapia anti-VEGF puede ser útil para disminuir la permeabilidad vascular y la neovascularización ocular. El aptámero anti-VEGF
15 mostró una gran eficacia en el modelo de neovascularización retiniana ROP en donde el 80% de la neovascularización retiniana se inhibía en comparación con los controles ($p = 0,0001$). El modelo de ensayo de Miles mostró una atenuación casi completa de un derrame vascular mediada por VEGF a continuación de la adición de EYE0001 y el modelo de angiogénesis de la córnea también mostró una reducción significativa en la
20 neovascularización con EYE0001. El estudio del ensayo de Miles con conejillos de indias sugiere que los aptámeros anti-VEGF pueden disminuir significativamente la permeabilidad vascular. Esta propiedad de disminuir la permeabilidad vascular puede resultar ser clínicamente importante para disminuir el fluido y el edema en CNV y el edema macular diabético. Así, la terapia anti-VEGF puede actuar como un agente de
25 anti-permeabilidad y/o como un agente anti-angiogénico.

Terapia Fotodinámica (PDT)

Como fue discutido anteriormente, una realización del procedimiento de la invención implica la administración de un agente anti-VEGF en combinación con una terapia fotodinámica (PDT). La PDT es un proceso de dos pasos que comienza con la administración local o sistémica de un agente fotosensible que absorbe la luz tal como un derivado de porfirina, que se acumula selectivamente en los tejidos diana del paciente. Al ser irradiado con luz de una longitud de onda activante, se producen especies de oxígeno reactivo en las células que contienen el fotosensibilizador, que promueven la muerte celular. Por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades del ojo caracterizadas por neovascularización ocular, se selecciona un fotosensibilizador que se acumula en la neovascularización del ojo. El ojo del paciente entonces se expone a luz de una longitud de onda apropiada, que produce la destrucción de los vasos sanguíneos anormales, mejorando de esta manera la agudeza visual del paciente.

Fotosensibilizadores

La terapia fotodinámica de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo usando cualquiera de varios compuestos fotoactivos. Por ejemplo, el fotosensibilizador puede ser cualquier compuesto químico que se une a uno o más tipos de tejidos diana seleccionados, y cuando se expone a luz de una longitud de onda particular, absorbe la luz e induce un deterioro o destrucción de los tejidos diana. En esta invención puede usarse prácticamente cualquier compuesto químico que se dirija a una diana seleccionada y absorbe luz. Preferiblemente, el fotosensibilizador no es tóxico para el animal al que se le administra y puede formularse en una composición no tóxica. El fotosensibilizador también es preferiblemente no tóxico en su forma fotodegradada. Los fotosensibilizadores ideales se caracterizan por una falta de toxicidad para las células en ausencia del efecto fotoquímico y se eliminan fácilmente de los tejidos no diana.

74
43

Puede encontrarse una lista amplia de fotosensibilizadores, por ejemplo, en Kreimer-Birnbaum, Sem. Hematol. 26: 157-73, 1989. Los compuestos fotosensibles incluyen, pero sin limitación, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, porfirinas, purpurinas, merocianinas, feoforbidas, psoralenos, ácido aminolevulínico (ALA),
5 derivados de hematoporfirina, porfícenos, porfacianina, compuestos del tipo de la porfirina expandidos y profármacos tales como ácido δ -aminolevulínico, que puede producir fármacos tales como protoporfirina. (Véanse, por ejemplo, los fotosensibilizadores descritos en cualquiera de las Patentes de Estados Unidos N° 5.438.071; 5.405.957; 5.198.460; 5.190.966; 5.173.504; 5.171.741; 5.166.197;
10 5.095.030; 5.093.349; 5.079.262; 5.028.621; 5.002.962; 4.968.715; 4.920.143; 4.883.790; 4.866.168 y 4.649.151). Son agentes fotosensibilizadores preferidos derivados de benzoporfirina (BPD), monoaspartil clorina e6, ftalocianina de cinc, etiopurpurina de estaño, tetrahidroxi tetrafenilporfirina y porfimer de sodio (PHOTOFRIN®). Un grupo particularmente potente de fotosensibilizadores incluye
15 porfirinas verdes, que se describen en detalle en Levi y col., Patente de Estados Unidos N° 5.171.749.

Cualquiera de los fotosensibilizadores descritos anteriormente puede usarse en los procedimientos de la invención. Por supuesto, también pueden usarse mezclas de dos o más compuestos fotoactivos; sin embargo, la eficacia del tratamiento depende de
20 la absorción de luz por el fotosensibilizador, de tal forma que, si se usan mezclas, se prefieren componentes con una absorción máxima similar.

Los agentes fotosensibilizadores de la presente invención preferiblemente tienen un espectro de absorción que está dentro del intervalo de longitudes de onda entre 350 nm y 1200 nm, preferiblemente entre aproximadamente 400 y 900 nm y, más
25 preferiblemente, entre 600 y 800 nm.

73
A

El fotosensibilizador se formula de tal forma que proporcione una concentración eficaz en el tejido ocular diana. Los fotosensibilizadores pueden acoplarse a un ligando de unión específico que puede unirse a un componente superficial específico del tejido ocular diana o, si se desea, por formulación con un vehículo que libere altas concentraciones al tejido diana. La naturaleza de la formulación dependerá en parte del modo de administración y de la naturaleza del fotosensibilizador seleccionado. Puede usarse cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable, o combinación del mismo, apropiada para el compuesto fotoactivo particular. De esta manera, el fotosensibilizador puede administrarse como una composición acuosa, como una composición transmucosa o transdérmica, o en una formulación oral.

Como se ha mencionado previamente, el método de la invención es particularmente eficaz para tratar a pacientes que padecen una pérdida de la agudeza visual asociada con una neovascularización no deseada. Se ha demostrado que grandes números de receptores LDL están asociados con la neovascularización. Las porfirinas verdes, y en particular BPD - MA, interaccionan fuertemente con tales lipoproteínas. Las propias LDL pueden usarse como vehículo para las porfirinas verdes, o pueden usarse formulaciones liposomales. Se cree que las formulaciones liposomales liberan selectivamente porfirinas verdes al componente de lipoproteína de baja densidad del plasma que, a su vez, actúa como un vehículo para liberar el ingrediente activo más eficazmente en el sitio deseado. Al aumentar el reparto de la porfirina verde en la fase de lipoproteína de la sangre, las formulaciones liposomales pueden proporcionar una liberación más eficaz del fotosensibilizador en la neovascularización. En la Patente de Estados Unidos Nº 5.214.036 se describen composiciones de porfirinas verdes que implican lipocomplejos, incluyendo liposomas. BPD-MA liposomal para administración intravenosa puede obtenerse en QLT PhotoTherapeutics Inc., Vancouver, British

76
JK

Columbia.

El fotosensibilizador puede administrarse localmente o sistémicamente de cualquiera de una amplia variedad de maneras, por ejemplo, por vía oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o inyección subcutánea),
5 tópicamente a través de parches o implantes, o el compuesto puede ponerse directamente en el ojo. El agente fotosensibilizador puede administrarse en una formulación seca, tal como píldoras, cápsulas, supositorios o parches. El agente fotosensibilizador también puede administrarse en una formulación líquida, ya sea solo con agua, o con excipientes farmacológicamente aceptables, tales como los descritos en
10 Remington's Pharmaceutical Sciences, supra. La formulación líquida también puede ser una suspensión o una emulsión. Los excipientes adecuados para suspensiones o para emulsiones incluyen agua, solución salina, dextrosa, glicerol y similares. Estas composiciones pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, antioxidantes, agentes tamponantes
15 del pH, y similares.

La dosis de fotosensibilizador puede variar ampliamente dependiendo de una variedad de factores tales como el tipo de fotosensibilizador; el modo de administración; la formulación en la que se transporta, tal como en forma de liposomas; o si está acoplada a un ligando específico para una diana, tal como un anticuerpo o un fragmento
20 inmunológicamente activo. Otros factores que afectan a la dosis de agente fotosensibilizador incluyen la célula o las células diana buscadas, el peso del paciente, y los tiempos del tratamiento con luz. Aunque diversos compuestos fotoactivos requieren diferentes intervalos de dosificación, si se usan porfirinas verdes, una dosificación típica está en el intervalo de 0,1 - 50 mg/m² (de área de superficie del cuerpo), preferiblemente
25 de aproximadamente 1 - 10 mg/m² e incluso más preferiblemente aproximadamente 2-8

77
46

mg/m².

Los diversos parámetros usados para la terapia fotodinámica en la invención están interrelacionados. Por consiguiente, la dosis también debe ajustarse con respecto a otros parámetros, por ejemplo, fluidez, irradiación, duración de la luz usada en la terapia
5 fotodinámica, e intervalo de tiempo entre la administración de la dosis y la irradiación terapéutica. Todos estos parámetros deben ajustarse para producir una mejora significativa de la agudeza visual sin un daño significativo en el tejido del ojo.

Tratamiento con luz

Después de haber administrado el fotosensibilizador al paciente, el tejido ocular
10 diana se irradia con luz a una longitud de onda que es absorbida por el fotosensibilizador que se usó. Los espectros para los fotosensibilizadores descritos en este documento son conocidos en la técnica; para cualquier compuesto fotoactivo particular, es una cuestión trivial determinar el espectro. Para la porfirinas verdes, el intervalo de longitudes de onda deseado está generalmente entre aproximadamente 550
15 y 695 nm. Se prefiere especialmente una longitud de onda en este intervalo para mejorar la penetración en los tejidos corporales.

Como resultado de la exposición a la luz, el fotosensibilizador entra en un estado excitado y se cree que interacciona con otros compuestos para formar intermedios reactivos, tales como oxígeno singlete, que pueden causar la ruptura de las estructuras
20 celulares. Las posibles dianas celulares incluyen la membrana celular, mitocondrias, membranas lisosomales, y el núcleo. La evidencia de tumores y modelos neovasculares indica que la oclusión de la vasculatura es un mecanismo importante de terapia fotodinámica, que se produce por lesión en las células endoteliales, con una posterior adhesión de plaquetas, desgranulación, y formación de trombos.

25 La fluidez durante el tratamiento de irradiación puede variar ampliamente

78

dependiendo del tipo del tejido, la profundidad del tejido diana, y la cantidad de fluido o sangre subyacente, pero preferiblemente varía de aproximadamente 50 a 200 Julios/cm².

La irradiación varía típicamente de aproximadamente 150 a 900 mW/cm²,
5 siendo preferido el intervalo entre aproximadamente 150 y 600 mW/cm². Sin embargo, el uso de irradiaciones mayores puede seleccionarse como eficaz y teniendo la ventaja de acortar los tiempos de tratamiento.

El tiempo óptimo a continuación de la administración del agente fotoactivo hasta el tratamiento de luz también puede variar ampliamente dependiendo del modo de
10 administración, la forma de administración, y el tejido ocular específico diana. Los tiempos típicos después de la administración del agente fotoactivo varían desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 2 horas, preferiblemente de aproximadamente 5 a 30 minutos, y más preferiblemente de aproximadamente 10 a 25 minutos.

15 La duración de la exposición a la radiación preferiblemente está comprendida entre aproximadamente 1 y 30 minutos, dependiendo de la potencia de la fuente de radiación. La duración de la irradiación de luz también depende de la fluidez deseada. Por ejemplo, para una irradiación de 600 mW/cm², una fluidez de 50 J/cm² requiere 90 segundos de irradiación; 150 J/cm² requiere 270 segundos de irradiación.

20 La irradiación además se define por su intensidad, duración y tiempos con respecto a la dosificación con el agente fotosensible (intervalo post inyección). La intensidad debe ser suficiente para que la radiación penetre en la piel y/o alcance los tejidos diana a tratar. La duración debe ser suficiente para fotoactivar suficiente agente fotosensible para actuar en los tejidos diana. Tanto la intensidad como la duración deben
25 limitarse para evitar sobretratar al paciente. El intervalo post inyección antes de la

79
5/5

aplicación de la luz es importante, porque en general cuanto más pronto se aplique la luz después de administrar el agente fotosensible, 1) más baja será la cantidad de luz requerida y 2) más baja será la cantidad eficaz de agente fotosensible.

El examen clínico y la fotografía de fondo típicamente no revelan ningún cambio de color ineditamente después de una terapia fotodinámica, a pesar de que se produce un leve blanqueo de la retina en algunos casos después de aproximadamente 24 horas. El cierre de la neovascularización coroidal se confirma preferiblemente histológicamente por la observación del daño en las células endoteliales. Las observaciones para detectar el citoplasma vaculado y los núcleos anormales asociados con la ruptura de tejido neovascular también pueden evaluarse.

En general, pueden determinarse los efectos de la terapia fotodinámica en cuanto a la reducción de la neovascularización usando técnicas angiográficas con fluoresceína convencionales en períodos específicos después del tratamiento. La eficacia de la PDT también puede determinarse por medio de una evaluación clínica de la agudeza visual, usando medios convencionales en la técnica, tales como diagramas convencionales del ojo en los cuales la agudeza visual se evalúa por la capacidad de discernir letras de un cierto tamaño, normalmente con cinco letras en una línea de un tamaño dado.

Otras terapias para tratar enfermedades neovasculares

Además de PDT, hay otras terapias para tratar enfermedades neovasculares que pueden usarse en combinación con terapias anti-VEGF. Por ejemplo, una forma de fototerapia conocida como Fotocoagulación Térmica con Láser es un procedimiento oftálmico convencional para el tratamiento de una serie de trastornos del ojo, incluyendo problemas vasculares de la retina (por ejemplo, retinopatía diabética), problemas vasculares de coroides y lesiones maculares (por ejemplo, degeneración macular senil). Este procedimiento implica el uso de luz láser para cauterizar vasos

30 19

sanguíneos anormales en el ojo de un paciente para sellarlos y prevenir un derrame posterior. (Véase, por ejemplo, Arch. Ophthalmol. 1991, 109:1109-1114). Como alternativa, en combinación con la terapia anti-VEGF pueden usarse compuestos capaces de disminuir o prevenir el desarrollo de una neovascularización indeseada, incluyendo otros agentes anti-VEGF, agentes anti-angiogénesis, u otros agentes que inhiben el desarrollo de la neovascularización ocular.

Las características y otros detalles de la invención se describirán ahora más particularmente y se indicarán en los siguientes ejemplos que describen técnicas preferidas y resultados experimentales. Estos ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar la invención y no deben considerarse limitantes.

EJEMPLOS

En los siguientes Ejemplos, se usó el aptámero pegilado anti-VEGF EYE001. Como se ha discutido anteriormente, este aptámero es un oligonucleótido conjugado con polietilenglicol (PEG) que se une a la isoforma del VEGF humano soluble principal, VEGF₁₆₅, con una alta especificidad y afinidad. El aptámero se une e inactiva VEGF de una manera similar a la de un anticuerpo de alta afinidad dirigido hacia VEGF. Los Ejemplos 1-5 presentan los resultados pre-clínicos de estudios con el aptámero anti-VEGF en diversos modelos de neovascularización ocular. El Ejemplo 6 presenta los resultados de seguridad clínica de fase IA en humanos con AMD exudativa, y el Ejemplo 7 presenta los resultados de fase clínica IB. Generalmente, las dosificaciones y concentraciones se expresan como el peso del oligonucleótido de EYE001 (NX1838) solamente y están basadas en un coeficiente de extinción aproximado para el aptámero de 37 µg/ml/unidad de A₂₆₀.

Ejemplo 1: Ensayo de Permeabilidad Vascular Cutánea (Ensayo de Miles)

Una de las actividades biológicas de VEGF es aumentar la permeabilidad

81

vascular por medio de la unión específica a receptores presentes en las células del endotelio vascular. La interacción ocasiona la relajación de las firmes uniones endoteliales con la posterior pérdida de fluido vascular. El derrame vascular inducido por VEGF puede medirse *in-vivo* siguiendo la pérdida de colorante azul de Evans de la vasculatura de un conejillo de indias como consecuencia de una inyección intradérmica de VEGF (Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular Permeability Factor /Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis. Am J Pathol 1995, 146:1029). De forma similar, el ensayo puede usarse para medir la capacidad de un compuesto para bloquear esta actividad biológica del VEGF.

El VEGF₁₆₅ (20-30 nM) se pre-mezcló *ex-vivo* con EYE001 (30 nM a 1 μ M) y posteriormente se administró por inyección intradérmica en la piel afeitada en el dorso de conejillos de indias. Treinta minutos después de la inyección, se cuantificó la pérdida de colorante azul de Evans alrededor de los sitios de la inyección por medio del uso de un sistema de análisis morfométrico computarizado. Los datos (no mostrados) demostraron que la pérdida inducida por VEGF del colorante indicador de la vasculatura puede inhibirse casi completamente por la co-administración de EYE001 a concentraciones tan bajas como 100 nM.

Ejemplos 2: Ensayo de Angiogénesis de la Córnea

Se implantaron agregados de polímero de metacrilato que contenían VEGF₁₆₅ (3 pmol) en el estroma de la córnea de ratas para inducir el crecimiento de vasos sanguíneos en la córnea normalmente avascular. EYE001 se administró por vía intravenosa a las ratas en dosis de 1, 3 y 10 mg/kg una vez o dos veces al día durante 5 días. Al final del período de tratamiento, todas las córneas individuales fueron fotomicroografiadas. El grado hasta el cual se desarrollaron nuevos vasos sanguíneos en

22/8/17

el tejido de la córnea, y su inhibición por EYE001, se cuantificaron mediante un análisis morfométrico estandarizado de las fotomicrografías.

Los datos (no mostrados) demostraron que el tratamiento sistémico con EYE001 produce una significativa inhibición (65%) de la angiogénesis dependiente de VEGF en la córnea cuando se comparó con el tratamiento con solución salina tamponada con fosfato (PBS). El tratamiento de una sola vez al día con 10 mg/kg fue tan eficaz como el tratamiento dos veces al día. La dosis de 3 mg/kg tuvo una actividad similar a la dosis de 10mg/kg, pero no fue evidente una eficacia significativa a 1 mg/kg.

Ejemplo 3: Estudio de Retinopatía del Prematuro

10 A pesar de que la ROP es claramente distinta de la retinopatía diabética y AMD, el modelo de ratón de ROP se ha usado para demostrar un papel para VEGF en la vascularización anormal de la retina que se produce en esta enfermedad (Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, Amato DR, Sullivan R, D'AMore PA, Oxygen-induced retinopathy in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994, 35:101).

15 Estos datos proporcionaron una base lógica para el estudio de las propiedades anti-angiogénicas de EYE001 en este modelo.

Se dejaron camadas de ratones de 9, 8, 8, 7 y 7 ratones, respectivamente, al aire ambiental o se hicieron hiperóxicas y se trataron por vía intraperitoneal con PBS o EYE001 (1, 3 o 10 mg/kg/día). El punto final del ensayo, crecimiento de nuevos

20 capilares a través de la membrana limitante interna de la retina en el humor vítreo, se evaluó mediante identificación microscópica y recuento de los brotes neovasculares en 20 secciones histológicas de cada ojo de todos los ratones tratados y de control. Se observó una reducción en la neovascularización de la retina del 80% con respecto al control no tratado tanto en la dosis de 10 mg/kg como en la dosis de 3 mg/kg ($p = 0,0001$ para

25 ambas dosis).

Ejemplo 4: Xenoinjertos de Tumor Humano

La eficacia *in-vivo* de EYE001 se ensayó en xenoinjertos de tumor humano (rhabdomiosarcoma A673 y tumor de Wilms) implantados en ratones desnudos. En ambos casos, los ratones se trataron con 10 mg/kg de EYE001 administrados por vía intraperitoneal una vez al día después del desarrollo de tumores establecidos (200 mg). Los grupos de control se trataron con un aptámero de control con una secuencia desordenada (oligonucleótido).

El tratamiento de ratones con 10 mg/kg de EYE001 una vez al día inhibió el crecimiento del tumor rhabdomiosarcoma A673 en un 80% y el tumor de Wilms en un 84% con respecto al control. En el modelo del tumor de Wilms, dos semanas después de terminar la terapia, el tamaño del tumor experimentó un rebote tan vigorosamente en los animales tratados que ya no había ninguna diferencia en el tamaño del tumor comparado con los controles.

Ejemplo 5: Farmacocinética Intravítrea de EYE001 en Conejos

Los conejos se obtuvieron y se cuidaron de acuerdo con todas las pautas estatales y federales aplicables y adheridas a los "Principios de Cuidado de los Animales de Laboratorio" (publicación NIH N° 85-23, revisada en 1985). A un total de 18 conejos blancos de Nueva Zelanda del sexo masculino se les administró EYE001 por inyección intravítrea. Cada animal recibió una dosis como una inyección bilateral de 0,50 mg/ojo (1,0 mg/animal) en un volumen de 40 µl/ojo. Se recogieron muestras de EDTA-plasma y de humor vítreo a lo largo de un período de 28 días después de la administración de la dosis y se almacenaron congeladas (-70°C) hasta el ensayo. Por separado, se recogió humor vítreo de cada ojo después de sacrificar a los animales por desangramiento. Las concentraciones de EYE001 en las muestras de humor vítreo se determinaron por un procedimiento de ensayo HPLC similar al descrito previamente por Tucker y col.

- (Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys. J. Chromatogr. Biomed. Appl. 1999, 732:203-212) y por un procedimiento de ensayo de hibridación dual similar al descrito previamente por Drolet y col. (Pharmacokinetics and Safety of an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Aptamer (NX 1838) Following Injection into the Vitreous Humor of Rhesus monkeys. Pharm. Res., 2000, 17: 1503-1510). La concentración de humor vítreo se calculó promediando los resultados de los dos ensayos. Las concentraciones de EYE001 en el plasma se determinaron sólo por el ensayo de hibridación dual.
- 10 Después de una sola dosis de EYE001 como una administración bilateral de 0,50 mg/ojo (1,0 mg/animal), los niveles iniciales de humor vítreo eran aproximadamente de 350 µg/ml y disminuyeron por un aparente proceso de eliminación de primer orden hasta aproximadamente 1,7 µg/ml en el día 28. La semivida terminal estimada fue de 83 horas, similar a la vida media de 94 horas observada en los monos rhesus (Drolet y col.,
- 15 *supra*). Cuatro semanas después de la administración de EYE001, los niveles de fármaco en el humor vítreo (~190 nM) permanecían bien por encima de la K_D para VEGF (200 pM), lo que sugiere que la dosificación una vez al mes en seres humanos es apropiada, asumiendo que los parámetros farmacocinéticos son comparables en el humor vítreo de conejo y humano. En contraste con los altos niveles de EYE001
- 20 encontrados en el humor vítreo, las concentraciones en plasma fueron significativamente menores y variaban de 0,092 a 0,005 µg/ml desde el día 1 al día 21. Los niveles en plasma se redujeron por un aparente proceso de eliminación de primer orden así como también con una semivida terminal estimada de 84 horas. De esta manera, la semivida terminal en plasma imitaba la semivida en humor vítreo observada
- 25 en monos rhesus (Drolet y col., *supra*) y es indicativa de la cinética flip-flop clásica en

a5 4A

la cual la eliminación desde el ojo es la etapa que determina la velocidad para la eliminación desde el plasma. Estos datos son coherentes con un aptámero altamente estable (resistente a nucleasas) que experimenta una lenta velocidad de liberación desde el humor vítreo a la circulación sistémica.

5 **Ejemplo 6: Estudio de Ensayo Clínico de Fase 1A**

Se realizó un estudio multicentro, de etiqueta descubierta, de aumento de las dosis, de una sola inyección intravítrea de EYE001 en los pacientes con CNV subfovea secundaria a una degeneración macular relacionada con la edad y con una agudeza visual peor que 20/200 en el diagrama de ETDRS. La dosis inicial era de 0,25 mg
10 inyectados intravítreamente una vez. También se ensayaron dosificaciones de 0,5, 1, 2 y 3 mg. Se realizaron un examen oftálmico completo con fotografía de fondo y una angiografía de fluoresceína. Se trató a un total de 15 pacientes.

Criterios de Selección

Los pacientes para el estudio se seleccionaron usando los siguientes criterios de
15 inclusión y exclusión:

Criterio de inclusión: Se exigía que los pacientes fueran mayores de 50 años y en general que tuvieran buena salud, una agudeza visual bien corregida en el ojo del estudio peor que 20/200 en el diagrama de ETDRS, y 20/400 o peor en por lo menos el primer paciente de cada cohorte ($n = 3$); una agudeza visual bien corregida en el otro
20 ojo igual o mejor que 20/64; CNV subfovea (CNV clásica y/u oculta) de áreas de disco del Estudio de Fotocoagulación Macular (MPS) mayores que 3,5; medio ocular transparente y una dilatación pupilar adecuada para permitir una buena calidad de fotografía de fondo estereoscópica; y una presión intraocular de 2,9 kPa o menos.

Criterios de exclusión: Las exclusiones incluyeron significativas opacidades del
25 medio, incluyendo cataratas, que podrían interferir con la agudeza visual, la valoración

36
S

de la toxicidad, o con la fotografía de fondo; la presencia de una enfermedad ocular, incluyendo glaucoma, retinopatía diabética, oclusión vascular de la retina u otras condiciones (diferentes de CNV de AMD) que podrían afectar significativamente a la visión; presencia de otras causas de CNV, incluyendo miopía patológica (el equivalente esférico de -8 dioptrías o más), el síndrome de histoplasmosis ocular, estrías angioides, ruptura coroidal y la coroiditis multifocal; pacientes en los que podría estar indicado o considerarse un tratamiento de láser adicional para CNV; cualquier cirugía intraocular en los 3 meses previos al comienzo del estudio; sangre que ocupa más del 50% de la lesión; vitrectomía anterior; terapia anterior o concomitante con otro agente de investigación para tratar AMD a excepción de multivitaminas y oligoelementos; cualquiera de las siguientes enfermedades sistémicas subyacentes incluyendo diabetes mellitus no controlada o presencia de retinopatía diabética; enfermedad cardíaca incluyendo el infarto de miocardio en los 12 meses previos al comienzo del estudio, y/o enfermedad coronaria asociada con síntomas clínicos, y/o indicaciones de isquemia detectada en ECG; infarto (en los 12 meses previos al comienzo del estudio); trastornos de hemorragias activas; cualquier procedimiento quirúrgico mayor en el mes previo al comienzo del estudio; la enfermedad de úlceras pépticas activas hemorragia en los 6 meses previos al comienzo del estudio; y terapia sistémica concomitante con corticosteroides (por ejemplo, prednisona oral), u otro fármaco anti-angiogénico (por ejemplo, talidomida).

Medicación del Estudio

El fármaco fue una solución estéril lista para el uso compuesto de EYE001 (anteriormente NX1838) disuelto en fosfato sódico 10 mM y tampón de inyección de cloruro sódico al 0,9% y presentada en un cilindro de jeringa con cuerpo de vidrio de 1 cc estéril y sin pirógenos, con un tampón recubierto asociado a un émbolo de plástico, y

una tapa con extremo de caucho en la aguja de calibre 27 pre-asociada. El aptámero pegilado se suministró a concentraciones de fármaco activo de 1, 2,5, 5, 10, 20 ó 30 mg/ml de EYE001 (expresadas como contenido de oligonucleótido) para proporcionar un volumen de liberación de 100 µl.

5 Registro de pacientes

Antes del reclutamiento de pacientes en el estudio, se obtuvo la aprobación del protocolo por el Consejo de Revisión Institucional (IRB), un consentimiento informado y cualquier información adicional del paciente.

Resultados

- 10 Se realizó un estudio de seguridad de un solo intervalo de dosificación en 15 pacientes a dosis que variaban de 0,25 a 3,0 mg/ojo sin alcanzar la toxicidad limitante de la dosis. La viscosidad de la formulación impidió aumentar la dosis por encima de 3 mg. Los pacientes tenían edades que variaban de los 64 a los 92 años. Se incluyeron ocho varones y siete mujeres y todos eran Caucásicos. Once de los quince pacientes
- 15 experimentaron un total de diecisiete eventos adversos leves o moderados, incluyendo seis que probablemente o posiblemente estaban relacionados con la administración de EYE001: leve inflamación intraocular, escotoma, distorsión visual, picor, dolor y fatiga del ojo. Adicionalmente, hubo un evento adverso severo que no estaba relacionado con el fármaco de ensayo. Éste fue el diagnóstico de carcinoma de mama en una paciente en
- 20 la que se había detectado el bulto antes del tratamiento.

- A los 3 meses después de la inyección de EYE001, 12 de 15 (80%) ojos mostraban una visión estable o mejorada. Cuatro pacientes (26,7%) habían mejorado significativamente su visión en el mismo período de tiempo, lo cual estaba definido como un aumento de 3 líneas o más en los diagramas de visión de ETDRS. Los
- 25 pacientes con tal visión mejorada a los 3 meses notaron aumentos de +6, +4 y +3 líneas

en un diagrama de ETDRS. No se detectó ningún evento de seguridad visual inesperado. La evaluación de fotografías de color y angiogramas de fluoresceína no reveló ningún signo de toxicidad retinal o coroidal.

El estudio clínico de Fase 1A de los presentes autores demostró que podían administrarse dosis intravítreas únicas del aptámero anti-VEGF de forma segura hasta 3 mg/ojo. No se detectó ningún efecto secundario ocular o sistémico significativo.

Los médicos están de acuerdo en que es deseable un mínimo de un año de seguimiento para evaluar cualquier tratamiento potencial para AMD exudativa. Sin embargo, se dispone de datos de 3 meses de algunos estudios prospectivos y son útiles para evaluar la seguridad oftálmica y cualquier tendencia potencial de una nueva terapia.

Los controles históricos indican que sólo el 1,4% (ensayo fotodinámico pivotal) (Arch Ophthalmol 1999, 117: 1329-1345) y el 3,0% (estudio de radiación) (1999, 106; 12:2239-2247) de ojos han mostrado una mejora visual significativa definida por una ganancia de 3 o más líneas en un diagrama ETDRS a los 3 meses. Además, el grupo tratado con PDT del estudio TAP (Arch Ophthalmol 1999, 117:1329-1345) sólo detectó tal mejora de la visión en el 2,2% de los casos en 3 meses. Estos resultados confirman la impresión clínica de los presentes autores de que es raro ver una mejora visual significativa en cualquier momento de tiempo con cualquier tipo (clásica, oculta o mixta) de CNV secundaria a AMD.

En el estudio de los presentes autores, tres meses después de la administración intravítrea del aptámero anti-VEGF, el 80% de los ojos mostraba una visión estabilizada o mejorada, mostrando un 26,7% un aumento en 3 o más líneas en el diagrama de ETDRS. Estas mejoras visuales se confirman por resultados clínicos y angiográficos en algunos de los pacientes tratados con aptámero. La estabilización de la visión ha sido

siempre la meta de los estudios de AMD exudativa, así que la mejora de la agudeza visual significativa (3 líneas ETDRS) vista en el 26,7% de los pacientes a los 3 meses con sólo una dosis era inesperada. Claramente, los controles históricos no son apropiados para la comparación. Además, el corto período de seguimiento, el pequeño tamaño de la muestra, y los diferentes tipos de CNV (es decir el porcentaje de CNV clásica, oculta o mixta) anularon cualquier conclusión o comparación final. Sin embargo, parece ser que los ojos tratados con aptámero han demostrado sin duda alguna por lo menos una excelente seguridad visual a los 3 meses y justifican la realización de estudios adicionales.

10 En resumen, los resultados pre-clínicos y clínicos tempranos con una sola inyección intravítrea del aptámero anti-VEGF son muy prometedores. Se ha establecido la seguridad de inyecciones intravítreas de una sola dosis de dosificaciones de hasta 3 mg/ojo.

Ejemplo 7: Estudio de Ensayo Clínico de Fase IB

15 Se realizó un estudio de Fase IB multicentro, de etiqueta descubierta y con dosificaciones repetidas de 3 mg/ojo de EYE001 (aptámero anti-VEGF) en pacientes con CNV subfovea secundaria a AMD con una agudeza visual peor que 20/100 en el ojo de estudio y mejor o igual que 20/400 en el otro ojo. Si 3 o más pacientes experimentaban una Toxicidad Limitante de la Dosis (DLT), la dosis se reducía a 2 mg y luego a 1 mg, si fuese necesario. El número de pacientes a tratar era de 20; 10 pacientes con el aptámero anti-VEGF solo y 10 pacientes con terapia anti-VEGF y PDT. Se seleccionaron once sitios en los Estados Unidos para los estudios.

Definición de DLT

25 Si un paciente en el estudio experimentaba cualquiera de las siguientes DLT, la dosificación se reducía como se ha descrito anteriormente:

DLT oftálmica:***Evaluación fotográfica.***

Formación acelerada de cataratas: progresión de una unidad definida por el Protocolo de Graduación de la Opacidad del cristalino del Estudio de Enfermedad del Ojo Relacionada con la Edad (AREDS) como una adaptación del Sistema de Graduación de Cataratas de Wisconsin.

Examen clínico

Inflamación clínicamente significativa, que era grave (obscureciendo la visualización de la vasculatura retiniana) y amenazadora para la visión.

10 Otras anormalidades oculares no vistas normalmente en pacientes con AMD, como oclusión de la retina, arterial o venosa, desprendimiento de retina agudo, y hemorragia difusa de la retina.

Agudeza visual: doblamiento o empeoramiento del ángulo visual (una pérdida mayor o igual a 15 letras); la transición a la falta de percepción de luz (NLP) para
15 pacientes cuya puntuación de agudeza visual inicial es menor de 15 letras a menos que la pérdida de la visión se deba a una hemorragia del vítreo relacionada con el procedimiento de inyección entre los Días 2 a 7, Días 30-35, o Días 58-63.

Tonometría: incremento desde el nivel basal de la presión intraocular (IOP) en una cantidad igual o mayor a 3,3 kPa en dos exámenes separados por lo menos por un
20 día o una presión sostenida de 4,0 kPa durante más de una semana a pesar de la intervención farmacológica.

Angiograma de Fluoresceína

Anormalidades vasculares coroidales o retinales significativas no vistas inicialmente, tales como: no perfusión coroidal (que afecta a uno o más cuadrantes),
25 retraso en los tiempos de tránsito arterio-venosos (mayores que 15 segundos); oclusión

a1
qf

venosa o arterial de la retina (cualquier desviación del valor inicial); o alteración de la permeabilidad difusa de la retina que afecta a la circulación de la retina en ausencia de inflamación intraocular.

DLT sistémica:

- 5 Toxicidades de grado III (graves) o IV (amenazadoras para la vida), o cualquier toxicidad grave significativa considerada relacionada con el fármaco de estudio por el investigador.

Criterios de Selección.

- Los pacientes para el estudio se seleccionaron usando los siguientes criterios de
10 inclusión y de exclusión:

- Criterios de inclusión:** Los criterios oftálmicos incluían la mejor agudeza visual bien corregida en el ojo de estudio peor que 20/100 en el diagrama de ETDRS, la mejor agudeza visual corregida en el otro ojo igual o mejor a 20/400, neovascularización coroidal subfovea con CNV activa (clásica y/u oculta) de menos de 12 áreas totales de
15 disco en tamaño secundarias a una degeneración macular relacionada con la edad, medio ocular transparente y una dilatación pupilar adecuada para permitir una buena calidad de la fotografía de fondo estereoscópica, y una presión intraocular de 2,8 kPa o menos. Los criterios generales incluían pacientes de cualquier sexo, de 50 o más años de edad; estatus de rendimiento ≤ 2 de acuerdo con la escala del Grupo de Oncología
20 Cooperativa Oriental (ECOG)/Organización Mundial de la Salud (OMS), electrocardiograma normal (ECG) o cambios clínicamente no significativos; las mujeres debían usar usando un anticonceptivo eficaz, haber pasado la menopausia al menos 12 meses antes del comienzo del estudio o ser quirúrgicamente estériles; si no era así, debía realizarse una prueba de embarazo en suero en las 48 horas previas al tratamiento y el
25 resultado debía estar disponible antes del inicio del tratamiento, debía utilizarse una

forma anticonceptiva eficaz durante al menos los 28 días siguientes a la última dosis de EYE001; función hematológica adecuada: hemoglobina ≥ 10 g/dl; recuento de plaquetas $\geq 150 \times 10^9/l$; WBC $\geq 4 \times 10^9/l$; PTT dentro del intervalo normal de institución; función renal adecuada; creatinina de suero y BUN dentro de 2 veces el límite superior de la institución normal (ULN); una adecuada función hepática: bilirrubina en suero $\leq 1,5$ mg/dl; SGOT/ALT, SGPT/AST, y fosfatasa alcalina dentro de 2 x ULN de institución; consentimiento informado por escrito; y capacidad de volver para todas las visitas del estudio.

Criterios de exclusión: Los pacientes no eran elegibles para el estudio si:

10 cualquiera de los siguientes criterios estaba presente en el ojo de estudio o sistémicamente: pacientes programados para recibir, o que habían recibido cualquier Terapia Fotodinámica anterior con Visudyne; opacidades significativas del medio, incluyendo cataratas, que podrían interferir con la agudeza visual, valoración de la toxicidad o fotografía de fondo; presencia de otras causas de neovascularización

15 coroidal, incluyendo miopía patológica (el equivalente esférico de -8 dioptrías o más negativo), el síndrome de histoplasmosis ocular, estrías angioides, ruptura coroidal y coroiditis multifocal; pacientes en los que podría estar indicado o considerarse un tratamiento con láser adicional para la neovascularización coroidal; cualquier cirugía intraocular en los 3 meses posteriores al comienzo del estudio; virectomía anterior;

20 terapia anterior o concomitante con otro agente de investigación para tratar AMD a excepción de multivitaminas y oligoelementos; radiación previa en el otro ojo con fotones o protones; alergias conocidas al colorante fluoresceína usado en angiografía o a los componentes de la formulación de EYE001; cualquiera de las siguientes enfermedades sistémicas subyacentes, incluyendo diabetes mellitus no controlada o

25 presencia de retinopatía diabética; enfermedad cardíaca: infarto de miocardio en los 12

meses previos al inicio del estudio, y/o enfermedad coronaria asociada con síntomas clínicos, y/o indicaciones de isquemia detectadas en ECG; una función renal o hepática dañada, apoplejía (en los 12 meses posteriores al comienzo del estudio), infección activa, trastornos de hemorragia activa; cualquier procedimiento quirúrgico mayor en el mes siguiente al inicio del estudio, enfermedad de úlceras pépticas activas con hemorragia en los 6 meses posteriores al comienzo del estudio; terapia sistémica concomitante con corticosteroides (por ejemplo, prednisona oral), u otro fármaco anti-angiogénico (por ejemplo, talidomida); radiación previa en la cabeza y cuello; cualquier tratamiento con un agente de investigación en los últimos 60 días para cualquier condición; cualquier diagnóstico de cáncer en los últimos 5 años, con la excepción del carcinoma basal o de células escamosas.

Medicación del Estudio

Suministro del Fármaco

En este estudio, como terapia anti-VEGF se usó EYE001. El fármaco EYE001 es un aptámero anti-VEGF pegilado. Se formuló en solución salina tamponada con fosfato a pH 5-7. Puede añadirse hidróxido de sodio o ácido clorhídrico para el ajuste del pH.

El EYE001 se formuló a tres concentraciones diferentes: 3 mg/100 µl, 2 mg/100 µl y 1 mg/100 µl envasados en una jeringa de vidrio graduada USP de Tipo I estéril de 1 ml, provista con una aguja estéril de calibre 27. El fármaco carecía de conservantes y previsto para un único uso por inyección intravítrea solamente. El producto no se usaba si estaba turbio o si había partículas presentes.

El ingrediente activo era el fármaco EYE001, aptámero anti-VEGF (Pegilado), a concentraciones de 30 mg/ml, 20 mg/ml y 10 mg/ml, Los excipientes eran Cloruro Sódico, USP; Fosfato Sódico Monobásico, Monohidrato, USP; Fosfato Sódico

Dibásico, Heptahidrato, USP; Hidróxido Sódico, USP; Ácido Clorhídrico, USP; y agua para la inyección, USP.

Dosis y Administración

Preparación. El producto farmacéutico era una solución estéril lista para el uso proporcionada en una jeringa de vidrio de un solo uso. La jeringa se retiró del almacenamiento refrigerado por lo menos 30 minutos (pero no más de 4 horas) antes del uso para permitir que la solución alcanzara la temperatura ambiente. La administración del contenido de la jeringa implicaba la asociación de la varilla del émbolo de plástico roscada al tapón de caucho dentro del cilindro de la jeringa. La tapa con extremo de caucho después se retiró para permitir la administración del producto.

Régimen de Tratamiento y Duración. EYE001 se administró como inyecciones intravítreas de 100 µl en tres ocasiones a intervalos de 28 días. Los pacientes se registraron para recibir inyecciones de 3 mg. Si 3 o más pacientes experimentaban una Toxicidad Limitante de la Dosis (DLT), la dosis se reducía a 2 mg y además a 1 mg, si fuese necesario, cada uno en 10 pacientes adicionales.

Administración de PDT

Se administró PDT con EYE001 sólo en los casos con CNV predominantemente clásica. Los requisitos y procedimientos normales para la administración de PDT se usaron como se describe en Arch Ophthalmol 1999, 117: 1329-1345. Se requería que la PDT se administrara 5-10 días antes de la administración del aptámero anti-VEGF.

Inclusión de los pacientes

Antes del reclutamiento de pacientes para el estudio, se obtuvo una aprobación escrita del protocolo por el Consejo de Revisión Institucional (IRB), y un formulario de consentimiento informado. Las páginas de investigación del formulario de informe de casos se completaron por el personal del sitio de estudio. Los pacientes que cumplían

asa

los criterios de elegibilidad y que habían proporcionado un consentimiento informado por escrito se incluyeron en el estudio.

Programa de Seguimiento.

Los pacientes se evaluaron clínicamente por el oftalmólogo varios días después de la inyección y de nuevo un mes después justo antes de la siguiente inyección. Se realizaron mediciones de las agudezas visuales ETDRS, fotografía kodachrome y angiografía con fluoresceína mensualmente durante los primeros 4 meses.

Puntos finales

Los parámetros de seguridad dados bajo la sección DLT anterior fueron los puntos finales primarios de los estudios. Además, otros puntos finales estudiados fueron el porcentaje de pacientes con la visión estabilizada (cambio de 0 líneas o mejor) o con mejorías en la visión a los 3 meses, el porcentaje de pacientes con una mejora de 3 líneas o más a los 3 meses y la necesidad de retratamiento con PDT a los 3 meses como se determina por el investigador.

Resultados

No se detectó ningún evento adverso relacionado serio para los 21 pacientes tratados en este estudio. Dos pacientes experimentaron eventos adversos serios no relacionados. Un paciente, una mujer de 86 años de edad, con un historial de larga duración de enfermedad vascular periférica así como una hipertensión límite y diabetes mellitus de tipo II, experimentó 2 infartos de miocardio, el segundo de los cuales fue fatal. El primer evento ocurrió 11 días después de la primera inyección intraocular de aptámero anti-VEGF. El segundo evento ocurrió 16 días después de la tercera y última inyección. Los infartos de miocardio agudos se produjeron con un intervalo entre ellos de aproximadamente 2 meses. El investigador creía que estos eventos no tenían relación con la terapia con el aptámero y los niveles sistémicos del fármaco eran despreciables

basándose en los datos farmacocinéticos. Un segundo paciente, un hombre de 76 años de edad con un historial de depresión de 10 meses intentó suicidarse ingiriendo acetaminofeno 11 días después de la tercera y última dosis de aptámero anti-VEGF. El estado mental del paciente mejoró. El tratamiento del paciente ha permanecido sin cambios y el paciente sigue actualmente en el estudio.

Las tablas 1A-C muestran los eventos no relacionados o no severos informados en estos grupos. En pacientes tratados con el aptámero anti-VEGF solamente, los eventos oculares adversos probablemente asociados con la administración del aptámero anti-VEGF incluían flotadores vítreos (4 Eventos), leve inflamación de la cámara anterior (3 Eventos), irritación ocular (2 Eventos), aumento de la presión intraocular (1 Evento), aire intraocular (1 Evento), niebla vítrea (1 Evento), hemorragia de la subconjuntiva (1 Evento), dolor de ojo (1 Evento), edema/eritema del párpado (1 Evento), ojo seco (1 Evento) e inyección en la conjuntiva (1 Evento). Los eventos posiblemente relacionados con la administración del aptámero anti-VEGF incluían hialosis asteroide (1 Evento), visión anormal (1 Evento) y fatiga (1 Evento). Los eventos denominados no relacionados con la administración de aptámero anti-VEGF incluyeron dolor de cabeza (1 Evento) y debilidad (1 Evento). En pacientes tratados con el aptámero anti-VEGF y PDT, los eventos adversos probablemente asociados con esta combinación de terapia incluyeron ptosis (5 Eventos), leve inflamación de la cámara anterior (4 Eventos), abrasión de la córnea (3 eventos), dolor del ojo (3 Eventos), sensación de cuerpos extraños (2 Eventos), quemosis (1 Evento), hemorragia de la subconjuntiva (1 evento) y prolapso vítreo (1 Evento). Los eventos posiblemente relacionados con la terapia de combinación incluyeron fatiga (2 Eventos). Los eventos no relacionados con la terapia de combinación incluían desprendimiento del epitelio pigmentario (1 Evento), dolor de articulaciones (1 evento), infección de las vías

97/46

respiratorias superiores (1 Evento) e infección de la vejiga (1 Evento). El aumento en la ptosis y la abrasión de la córnea vistas en la escena de la terapia de combinación pueden relacionarse al uso de lentes de contacto en asociación con PDT. Cabe notar que todos los casos de inflamación de la cámara anterior o de niebla vítrea fueron leves y de naturaleza transitoria.

Tabla 1A. Eventos adversos asociados con la administración del aptámero anti-VEGF solo o en combinación con PDT.

Evento adverso	Aptámero Anti-VEGF N (%) 10 pacientes		Aptámero Anti-VEGF y PDT N (%) 11 pacientes	
Ptosis	0		5 (45,4)	
Edema/eritema del párpado	1 (10)		2 (18,2)	
Inyección conjuntival	1 (10)		0	
Quemosis	0		1 (9,1)	
Hemorragia de la subconjuntiva	1 (10)		1 (9,1)	
Ojo seco	1 (10)		0	
Abrasión de la córnea	0		3 (27,3)	
Inflamación de la cámara anterior	3 (30)	1 + células	4 (36,4)	Células traza
		Células traza		1 + KP; Células traza
		Células traza		Células traza
				Células traza

a8 QX

Aumento de IOP	1 (10)	0
Anormalidades pupilares	0	0
Rubeosis	0	1 (9,1)
Catarata	0	0
Neblina vítrea	1 (10)	2 (18,2)
Prolapso vítreo	0	1 (9,1)
Flotadores vítreos	4 (40)	0
Hialos asteroide	1 (10)	0
Aire intraocular	1 (10)	0
Hemorragia peripapilar	0	1 (9,1)
Desprendimiento del pigmento epitelial	0	1 (9,1)
Visión anormal	1 (10)	0
Fotopsia	1 (10)	0
Sensación de cuerpo extraño	1 (10)	2 (18,2)
Dolor de ojo	1 (10)	3 (27,3)
Blefaroespasmó	0	1 (9,1)
Irritación Ocular	2 (20)	1 (9,1)
Delicadeza Ocular	0	1 (9,1)
Pruritis Ocular	1 (10)	0
Lagrimo	1 (10)	0
Dolor de cabeza	1 (10)	0
Rinorrea	0	1 (9,1)

99
98

Fatiga	1 (10)	2 (18,2)
Debilidad	1 (10)	0
Dolor en las articulaciones	0	1 (9,1)
Infección en el tracto respiratorio superior	0	1 (9,1)
Infección de vejiga	0	1 (9,1)

TABLA 1B. Eventos adversos asociados con la administración del aptámero anti-VEGF solo.

Relación de Evento Adverso	Aptámero Anti-VEGF N 10 pacientes
Probablemente:	
Flotadores vítreos	4
Inflamación de la cámara anterior	3
Irritación ocular	2
Niebla vítrea	1
Aumento de la presión intraocular	1
Aire intraocular	1
Hemorragia de la subconjuntiva	1
Inyección conjuntival	1
Dolor de ojo	1
Edema /eritema del párpado	1
Ojo seco	1
Posiblemente:	
Hialosis Asteroide	1
Visión Anormal	1

100 99

Fatiga	1
No relacionado:	
Dolor de cabeza	1
Debilidad	1

Tabla 1C. Eventos adversos asociados con la administración del aptámero anti-VEGF y PDT.

Relación de evento adverso	Aptámero Anti-VEGF y PDT N (%) 11 pacientes
Probablemente:	
Ptosis	5
Inflamación de la Cámara Anterior	4
Abrasión de la córnea	3
Dolor de ojo	3
Sensación de cuerpos extraños	2
Quemosis	1
Hemorragia de la subconjuntiva	1
Prolapso vítreo	1
Posiblemente:	
Fatiga	2
No relacionado:	
Desprendimiento del pigmento epitelial	1
Dolor en las articulaciones	1
Infección en el tracto respiratorio superior	1
Infección de vejiga	1

101
1009

Dos pacientes eligieron terminar prematuramente su participación en el estudio. Un paciente creyó que su visión no estaba mejorando y no quiso más inyecciones. El otro paciente tenía depresión y problemas de transporte. Ambos pacientes retiraron su consentimiento antes de la tercera y última inyección del aptámero. La agudeza visual en ambos pacientes se mantuvo estable a lo largo de su participación en el estudio. Un tercer paciente murió antes de la última visita.

No se requirió ninguna disminución de la dosis para ningún paciente del estudio. La revisión de las fotografías de color y angiogramas de fluoresceína de estos pacientes no reveló signos de toxicidad retiniana vascular o coroidal.

De estos pacientes (N=8) que completaron el régimen de tratamiento de 3 meses del aptámero anti-VEGF solo, el 87,5% estabilizó o mejoró la visión y el 25,0% tuvo una mejora de visión de 3 líneas en el diagrama ETDRS a los 3 meses (Véase Tabla 2).

Tabla 2. Datos visuales de los pacientes con CNV subfovea tratados con el aptámero anti-VEGF solo.

Paciente Nº	Línea basal	Día 8	Día 29	Día 57	Día 85	± Nº de Líneas en el día 85
03-001	20 / 50	20 / 40	20 / 40	20 / 32	20 / 32	+2
04-001	20 / 125	20 / 64	20 / 80	20 / 80	20 / 80	+2
06-001	20 / 160	20 / 125	20 / 100	20 / 125	FUERA	+1
07-001	20 / 100	20 / 100	20 / 64	20 / 80	20 / 80	+1
07-002	20 / 320	20 / 80	20 / 64	20 / 64	20 / 50	+8
08-001	20 / 125	20 / 125	20 / 100	20 / 100	20 / 160	-1
09-001	20 / 500	20 / 200	20 / 400	20 / 320 (día 36)	FUERA	+2

102
10/1

10-001	20 / 500	20 / 640	20 / 500	20 / 400	20 / 500	0
10-002	20 / 200	20 / 125	20 / 160	20 / 160	20 / 160	+1
10-003	20 / 400	20 / 160	20 / 160	20 / 160	20 / 126	+5

CAMBIO EN LA VISIÓN A LOS 3 MESES

	Estabilizada o mejorada	mejoría ≥3 líneas
EYE001 Tratado-(N=8) que representa todos los ojos que completaron el protocolo	87,5 %	25,0%

Se trataron once pacientes tanto con el aptámero anti-VEGF como con PDT. En este grupo de pacientes (N=10) que completó el régimen de tratamiento de 3 meses, el 90% estabilizó o mejoró la visión y el 60% mostró una mejoría de 3 líneas de visión en el diagrama ETDRS a los 3 meses (Tabla 3). Estas mejorías de 3 líneas incluyeron aumentos de +3, +5, +4, +4, +6 y +3 líneas de visión ETDRS.

Tabla 3. Datos visuales de pacientes con CNV subfovea tratados con aptámero anti-VEGF combinado con PDT.

Paciente N°	Línea basal	Día 8	Día 29	Día 57	Día 85	PDT repetida	± N° de líneas en el último período de tiempo
06-011	20 / 400	20 / 320	20 / 100	20 / 640	20 / 200	NO	+3
06-012	20 / 250	20 / 160	20 / 125	20 / 125	20 / 80	NO	+5
08-011	20 / 40	20 / 32	20 / 20	20 / 20	20 / 26	SI	+2

103
102

10-011	20 / 160	20 / 160	20 / 160	20 / 160	FUERA	NO	0
05-011	20 / 100	20 / 64	20 / 64	20 / 64	20 / 40	NO	+4
12-011	20 / 160	20 / 100	20 / 250	20 / 200	20 / 200	NO	-1
06-013	20 / 800	20 / 640	20 / 800	20 / 800	20 / 320	SI	+4
02-011	20 / 500	20 / 200	20 / 160	20 / 80	20 / 126	SI	+6
06-014	20 / 100	20 / 80	20 / 80	20 / 80	20 / 100	NO	0
06-015	20 / 125	20 / 40	20 / 64	20 / 50	20 / 80	NO	+2
06-012	20 / 500	20 / 500	20 / 125	20 / 320	20 / 250	SI	+3

CAMBIO EN LA VISIÓN A LOS 3 MESES

	Estabilizada o mejorada	Mejoría ≥3 líneas
EYE001 Tratado-(N=10) que representa todos los ojos que completaron el protocolo	90 %	60%

De los pacientes restantes que no mostraron una ganancia de 3 líneas, sólo uno mostró una pérdida de visión a los 3 meses y este paciente perdió sólo una línea de visión a este período de tiempo. Ningún paciente en este grupo perdió más de una línea de visión a los 3 meses.

El tratamiento de PDT repetido a los 3 meses (cuya necesidad sólo se determinó por el investigador) se realizó en 4 de 10 ojos (40%) que participaron en la duración completa del estudio.

10

Otras Configuraciones

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a configuraciones preferidas, un especialista en la técnica puede determinar fácilmente sus características

104
AD3

preferidas y, sin alejarse del espíritu y alcance de la misma, puede realizar diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y afecciones. Los especialistas en la técnica reconocerán o podrán determinar usando no más que la experimentación habitual, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la

5 invención descritas en este documento. Se pretende que tales equivalentes estén incluidos en el alcance de la presente invención.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en este documento como referencia.

103
104**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para tratar una enfermedad neovascular ocular, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - 5 (a) administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un aptámero anti-VEGF; y
 - (b) proporcionar a dicho paciente fototerapia.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicha fototerapia comprende la terapia fotodinámica (PDT).
10
3. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicha fototerapia comprende la fotocoagulación térmica con láser.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicha enfermedad neovascular
15 se selecciona entre el grupo compuesto por retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización de la córnea, neovascularización retiniana, neovascularización coroidal, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa.
20
5. El procedimiento de la reivindicación 4, donde dicha enfermedad neovascular es la degeneración macular relacionada con la edad.
6. El procedimiento de la reivindicación 4, donde dicha enfermedad neovascular es
25 retinopatía diabética proliferativa.

106
105

7. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicho aptámero anti-VEGF comprende un ligando de ácido nucleico para el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

5

8. El procedimiento de la reivindicación 7, donde dicho ligando de ácido nucleico VEGF comprende ácido ribonucleico.

9. El procedimiento de la reivindicación 7, donde dicho ligando de ácido nucleico VEGF comprende ácido desoxirribonucleico.

10. El procedimiento de la reivindicación 7, donde dicho ligando de ácido nucleico VEGF comprende nucleótidos modificados.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, donde dicho ligando de ácido nucleico VEGF comprende nucleótidos 2'-modificados.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, donde dicho ligando de ácido nucleico VEGF comprende un polialquilenglicol.

20

13. El procedimiento de la reivindicación 12, donde dicho polialquilenglicol es polietilenglicol (PEG).

14. El procedimiento de la reivindicación 7, donde dicho ligando de ácido nucleico VEGF comprende ácido ribonucleico y ácido desoxirribonucleico.

10x
10x

15. El procedimiento de la reivindicación 10, donde dicho ligando de ácido nucleico VEGF comprende nucleótidos 2'-O-metilo modificados (2'-OMe).

5 16. El procedimiento de la reivindicación 10, donde dicho ligando de ácido nucleico VEGF está modificado con un resto que disminuye la actividad de endonucleasas o exonucleasas en el ligando de ácido nucleico relativo al ligando de ácido nucleico no modificado, sin afectar de forma adversa la afinidad de unión de dicho ligando.

10 17. El procedimiento de la reivindicación 16, donde dicho resto comprende un fosforotioato.

18. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicho aptámero anti-VEGF se administra por inyección.

15

19. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicha etapa de administración comprende introducir un dispositivo en el ojo de dicho paciente, comprendiendo dicho dispositivo dicho aptámero anti-VEGF.

20 20. El procedimiento de la reivindicación 19, donde dicho dispositivo suministra dicho aptámero anti-VEGF al ojo por difusión transcleral.

21. El procedimiento de la reivindicación 19, donde dicho dispositivo suministra dicho aptámero anti-VEGF en el humor vítreo del ojo.

25

22. El procedimiento de la reivindicación 2, donde dicha terapia fotodinámica (PDT) comprende las etapas de:

(i) suministrar un fotosensibilizador al tejido del ojo de dicho paciente; y

(ii) exponer el fotosensibilizador a la luz que tiene una longitud de onda absorbida por

5 dicho fotosensibilizador durante un período de tiempo y a una intensidad suficiente para inhibir la neovascularización en dicho tejido ocular.

23. El procedimiento de la reivindicación 22, donde dicho fotosensibilizador se selecciona entre el grupo compuesto por derivados de benzoporfirina (BPD),
10 monoaspartil clorina e6, ftalocianina de cinc, etiopurpurina de estaño, tetrahidroxi tetrafenilporfirina y porfimer de sodio (PHOTOFRIN[®]), y porfirinas verdes.

24. El procedimiento de la reivindicación 22, donde dicho fotosensibilizador es un derivado de la benzoporfirina.

15

25. Un procedimiento para tratar una enfermedad neovascular ocular en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho paciente:

(a) una cantidad eficaz de un aptámero anti-VEGF; y

(b) un segundo compuesto capaz de disminuir o prevenir el desarrollo de

20 neovascularización no deseada.

26. El procedimiento de la reivindicación 25, donde dicha enfermedad neovascular se selecciona entre el grupo compuesto por retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización de la
25 córnea, neovascularización retiniana, neovascularización coroidal, edema macular

109 400

diabético, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético y retinopatía diabética proliferativa.

27. El procedimiento de la reivindicación 26, donde dicha enfermedad neovascular
5 es degeneración macular relacionada con la edad.

28. El procedimiento de la reivindicación 27, donde dicha enfermedad neovascular
es retinopatía diabética proliferativa.

10 29. El procedimiento de la reivindicación 25, donde dicho aptámero anti-VEGF
comprende un ligando de ácido nucleico para el factor de crecimiento del endotelio
vascular (VEGF).

30. El procedimiento de la reivindicación 29, donde dicho ligando de ácido nucleico
15 VEGF comprende ácido ribonucleico.

31. El procedimiento de la reivindicación 29, donde dicho ligando de ácido nucleico
VEGF comprende ácido desoxirribonucleico.

20 32. El procedimiento de la reivindicación 29, donde dicho ligando de ácido nucleico
VEGF comprende nucleótidos modificados.

33. El procedimiento de la reivindicación 32, donde dicho ligando de ácido nucleico
VEGF comprende nucleótidos 2'F-modificados.

25

34. El procedimiento de la reivindicación 33, donde dicho ligando de ácido nucleico VEGF comprende un polialquilenglicol.
35. El procedimiento de la reivindicación 34, donde dicho polialquilenglicol es polietilenglicol (PEG).
36. El procedimiento de la reivindicación 25, donde dicho segundo compuesto comprende un anticuerpo VEGF.
37. El procedimiento de la reivindicación 32, donde dicho ligando de ácido nucleico VEGF comprende nucleótidos 2'-O-metilo modificados (2'-OMe).
38. El procedimiento de la reivindicación 32, donde dicho ligando de ácido nucleico VEGF está modificado con un resto que disminuye la actividad de endonucleasas o exonucleasas en el ligando de ácido nucleico relativo al ligando de ácido nucleico no modificado, sin afectar de forma adversa a la afinidad de unión de dicho ligando.
39. El procedimiento de la reivindicación 38, donde dicho resto comprende un fosforotioato.
40. El procedimiento de la reivindicación 25, donde dicho aptámero anti-VEGF se administra por inyección.
41. El procedimiento de la reivindicación 25, donde dicha etapa de administración comprende introducir un dispositivo en el ojo de dicho paciente, comprendiendo dicho

111 110

dispositivo dicho aptámero anti-VEGF.

42. El procedimiento de la reivindicación 41, donde dicho dispositivo suministra dicho aptámero anti-VEGF en el ojo por una difusión transcleral.

5

43. El procedimiento de la reivindicación 41, donde dicho dispositivo suministra dicho aptámero anti-VEGF directamente en el humor vítreo del ojo.

44. Un procedimiento para tratar una enfermedad neovascular ocular en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

10

(a) administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un aptámero anti-VEGF que inhibe el desarrollo de la neovascularización ocular; y

(b) proporcionar a dicho paciente una terapia que destruya los vasos sanguíneos anormales en el ojo.

15

45. El procedimiento de la reivindicación 44, donde dicho aptámero inhibe un factor de crecimiento.

46. El procedimiento de la reivindicación 45, donde dicho factor de crecimiento es VEGF.

20

47. El procedimiento de la reivindicación 46, donde dicho aptámero es un ligando de ácido nucleico para VEGF.

25 48. El procedimiento de la reivindicación 47, donde dicha terapia es la terapia

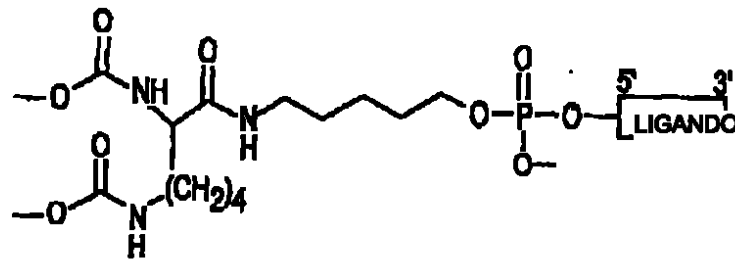
112
PA

fotodinámica (PDT).

49. Un procedimiento para tratar una enfermedad neovascular ocular en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento la administración a un ojo de dicho paciente entre
- 5 aproximadamente de 0,3 mg a aproximadamente 3 mg de un ligando de ácido nucleico modificados para VEGF.

113/12

FIG. 1



NX31838

40 K m PEG

5

Componente del ligando =

fCmGmGrArAfUfCmAmGfUmGmAmAfUmGfCfUfUmAfUmAfCmAfUfCfCmG-
3'3'-dT

(ligando VEGF)

PATENT COOPERATION TREATY

JDD
RECEIVEDFrom the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

SEP 26 2003

To:

PAUL T. CLARK
CLARK & ELBING LLP
101 FEDERAL STREET
BOSTON, MASSACHUSETTS 02110CLARK & ELBING LLP
NOTIFICATION OF RECEIPT
OF DEMAND BY COMPETENT INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY(PCT Rules 59.3(e) and 61.1(b), first sentence
and Administrative Instructions, Section 601(a))Date of mailing
(day/month/year)

24 SEP 2003

Applicant's or agent's file reference

50208/022WO2

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US02/35886

International filing date (day/month/year)

08 Nov 2002

Priority date (day/month/year)

09 Nov 2001

Applicant

EYETECH PHARMACEUTICALS

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority considers the following date as the date of receipt of the demand for international preliminary examination of the international application:

09 May 2003

2. That date of receipt is:



the actual date of receipt of the demand by this Authority (Rule 61.1(b)).



the actual date of receipt of the demand on behalf of this Authority (Rule 59.3(e)).



the date on which this Authority has, in response to the invitation to correct defects in the demand (Form PCT/IPEA/404), received the required corrections.

3. ☐ ATTENTION: That date of receipt is AFTER the expiration of 19 months from the priority date. Consequently, the election(s) made in the demand does (do) not have the effect of postponing the entry into the national phase until 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)). Therefore, the acts for entry into the national phase must be performed within 20 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 22). For details, see the PCT Applicant's Guide, Volume II.



(If applicable) This notification confirms the information given by telephone, facsimile transmission or in person on:

4. Only where paragraph 3 applies, a copy of this notification has been sent to the International Bureau.

Name and mailing address of the IPEA/

Mail Stop PCT, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Authorized officer

Valerie Jackson

Facsimile No. 703-305-3230

Telephone No. 703-305-3756

Form PCT/IPEA/402 (July 1998)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 May 2003 (15.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/039404 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 31/70, C12N 5/10, C07H 21/00, C12Q 1/68 (74) Agent: KERNER, Anne-Louise; Hale and Dorr, LLP, 60 State Street, Boston, MA 02109 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US2002/035986 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 8 November 2002 (08.11.2002) (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Date: 60/332,304 9 November 2001 (09.11.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/332,304 (CIP) Filed on 9 November 2001 (09.11.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): EYE-TRICH PHARMACEUTICALS [US/US]; 500 Seventh Avenue, 18th Floor, New York, NY 10018 (US).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): GUYER, David, R. [US/US]; 530 East 76th Street, Apt. 17G, New York, NY 10021 (US).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 12 February 2004
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2003/039404 A3

(54) Title: METHODS FOR TREATING OCULAR NEOVASCULAR DISEASES

(57) Abstract: Disclosed herein are methods for treating ocular neovascular disease using anti-VEGF therapy in combination with a second therapy that inhibits the development of ocular neovascularization or destroys abnormal blood vessels in the eye, such as photodynamic therapy.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/35986

HIS
116

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 31/70; C12N 5/10; C07H 21/00; C12Q 1/68 US CL : 514/44, 435/375, 435/6, 536/24.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/44, 435/375, 435/6, 536/24.5 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,814,620 A (ROBINSON et al) 29 September 1998 (29.09.1998) column 5, lines 24-28.	1-49
Y	US 6,123,923 A (UNGER et al) 26 September 2000 (26.09.2000), column 1, lines 45-62.	1-49
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" Later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 26 July 2003 (26.07.2003)		Date of mailing of the international search report 19 SEP 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Janet L. Eppel-Ford, Ph.D. Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/35986

1/26
1/2

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

CAPINS, Medline, Biosis, USPATFULL, EPO, JPO, Derwent

search terms:

vegf, vascular endothelial growth factor, antisense, aptamer, triplex, ribozyme, phototherapy, radiation, light, irradiate

147
118

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADIADOR
PATENTE DE INVENCION		
Indicacion de que se solicita la concesion de una patente.	(X)	()
Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	(X)	()
Descripcion de la invencion.	(X)	()
Dibujos de ser estos pertinentes.	(X)	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	(X)	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicacion de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representacion grafica o fotografica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicacion de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
Representacion grafica del esquema de trazado	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicaion : 04042441 00000000
Fecha (FNU): 2004-05-07 17:09:49
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACL 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
CARLOS R. OLARTE
Apoderado(a)
EYETECH PHARMACEUTICALS

REFERENCIA:	Radicación N°	04-042441
	Solicitud internacional	PCT/US02/35986
	Fecha Inicio fase nacional	09/06/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio N°	755
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486, de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la oficina de comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la Decisión 486.

Cúmplase
Dado en Bogotá D C, **31 MAYO 2004**


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe División de Nuevas Creaciones.

202044