

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 364**

51 Int. Cl.:
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07105047 .0**
96 Fecha de presentación: **17.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1803468**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **AGENTES PARA EL TRATAMIENTO DE LA RETINOPATÍA GLAUCOMATOSA Y DE LA NEUROPATÍA ÓPTICA.**

30 Prioridad:
22.12.2003 US 531770

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.12.2011

73 Titular/es:
Novartis AG
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:
Landers, Robert y
Pang, lok-Hou

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireya**

ES 2 371 364 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agentes para el tratamiento de la retinopatía glaucomatosa y de la neuropatía óptica.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los agentes profilácticos y a la terapéutica de la retinopatía y la neuropatía óptica relacionadas con el glaucoma.

10 Antecedentes de la invención

El glaucoma es un grupo heterogéneo de enfermedades que presentan una serie similar de características clínicas que incluyen la lesión del nervio óptico y la muerte apoptósica selectiva de las células ganglionares retinianas (RGC), que conduce a una pérdida progresiva del campo visual y a la ceguera. Un aumento anormal en la presión intraocular (IOP) está asociado a la mayoría de las formas de glaucoma. El único tratamiento disponible consiste en reducir la IOP mediante medicación o cirugía. La reducción de IOP es eficaz para ralentizar el desarrollo de determinados tipos de glaucoma y retardar sus efectos dañinos. No obstante, la pérdida de campo visual en los pacientes con glaucoma no siempre se correlaciona con la IOP, y disminuyendo la IOP solo no se interrumpe completamente el proceso patológico. Esto implica que la presión puede no ser la única causa de la retinopatía glaucomatosa y de la neuropatía óptica. Unos mecanismos adicionales contribuyen probablemente a los procesos patológicos. La retinopatía glaucomatosa se entiende generalmente como trastornos funcionales o cambios patológicos en la retina, especialmente la muerte de las RGC, que se encuentran en pacientes o animales con glaucoma. La neuropatía glaucomatosa óptica se refiere a trastornos funcionales o a cambios patológicos en el nervio óptico, a través de los cuales pasan los axones de las RGC.

Una sección transversal a través de la retina humana del adulto presenta las siguientes capas de células enumeradas en la dirección desde la zona proximal a la más interna (lado del vítreo) hasta la zona distal o más externa (lado de la coroides):

- 30 membrana limitante interna,
- capa de fibra óptica,
- capa de células ganglionares,
- capa interna entrelazada,
- capa nuclear interna,
- 35 capa externa entrelazada,
- capa nuclear externa,
- membrana limitante externa,
- segmentos internos de bastones y conos,
- segmentos externos de bastones y conos,
- 40 epitelio del pigmento retiniano, y
- capilares de la coroides.

El epitelio del pigmento retiniano y los capilares de la coroides se encuentran en el dorso de la retina más próximo a la membrana de la coroides, mientras que la membrana limitante interna está más próxima al cuerpo vítreo. La capa de células ganglionares recoge la entrada fotorreceptora y envía la entrada por los axones mielinados a través del nervio óptico al cerebro. Las células ganglionares son las células en situación de riesgo en el glaucoma.

Los mecanismos moleculares propuestos para contribuir a la muerte de las RGC incluyen la toxicidad del glutamato, la privación de factores neurótrofos, la anomalía vascular (isquemia), la gliosis reactiva y la toxicidad producida por el óxido nítrico. Sin embargo, ninguno de estos mecanismos propuestos está universalmente aceptado por los investigadores en este campo.

La solicitud de patente PCT nº PCT/US02/40457 concedida a Gao, X., *et al.*, publicada como WO 03/051313, proporciona supuestamente una producción de una enzima de desintoxicación en fase II por sulforafano en las células epiteliales del pigmento retiniano. La publicación de la patente US nº 2002/0091087, concedida a Zhang Y., *et al.*, proporciona supuestamente el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa por un compuesto, sulforafano, que eleva el glutatión o una enzima de desintoxicación en fase II en el tejido de la médula espinal, la enfermedad de Alzheimer, y en la esclerosis lateral amiotrófica. Las células epiteliales del pigmento retiniano se diferencian de las células ganglionares retinianas en que las células ganglionares son neuronas y las células epiteliales del pigmento retiniano no son neuronas. Además, las respuestas biológicas de los tejidos oculares tales como la retina a determinados agentes terapéuticos no pueden preverse a partir de las respuestas biológicas de los tejidos de la médula espinal y de los tejidos del cerebro. Las aplicaciones citadas no estudian la protección o el tratamiento de la pérdida de células ganglionares retinianas (RGC) y la neuropatía óptica en el glaucoma.

65 No está generalmente aceptado el método terapéutico contra el glaucoma para tratar la retinopatía glaucomatosa y la neuropatía óptica. En vista del impacto del glaucoma sobre la salud, y las incompetencias de los procedimientos

anteriores de tratamiento, sería deseable disponer de un procedimiento mejorado de tratamiento dirigido a la retinopatía glaucomatosa y a la neuropatía óptica.

Sumario de la invención

5 Según la presente invención, un agente que presenta actividad estimulante para la transposición nuclear de la proteína Nrf2 y el aumento subsiguiente de productos génicos que desintoxican y eliminan metabolitos citotóxicos proporciona un efecto protector o terapéutico para retardar o prevenir la pérdida de las células ganglionares retinianas y la lesión glaucomatosa al nervio óptico. Tal como se utiliza en la presente memoria "actividad
10 estimulante para la transposición nuclear de la proteína Nrf2" significa un agente que potencia la disponibilidad o el transporte de Nrf2 al núcleo. La transposición de la proteína Nrf2 al núcleo permite un aumento posterior en la expresión de los productos génicos que desintoxican y eliminan los metabolitos citotóxicos. Los procedimientos de la presente invención proporcionan un procedimiento de tratamiento para la retinopatía glaucomatosa y la neuropatía
15 óptica en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de una composición que comprende un agente que presenta actividad estimulante para la transposición nuclear de la proteína Nrf2, y un portador aceptable. El paciente puede estar en situación de riesgo de desarrollar retinopatía glaucomatosa o neuropatía óptica o puede presentar síntomas de retinopatía glaucomatosa o neuropatía óptica.

20 El agente que estimula la transposición nuclear de la proteína Nrf2 y los aumentos posteriores de los productos génicos que desintoxican y eliminan los metabolitos citotóxicos de la presente invención puede comprender un aceptor de adición de Michael, difenol, tiocarbamato, quinona, 1,2-ditio-3-tiona, hidroxianisol butilado, flavonoides, un isotiocianato, 3,5-di-terc-butil-4-hidroxitolueno, etoxiquina, 3-hidroxicumarina, combinaciones de los mismos o un derivado farmacológicamente activo o análogos de los mismos. En una forma de realización, el agente comprende
25 un isotiocianato tal como sulforafano, o un derivado farmacológicamente activo del mismo. En otra forma de realización, el agente comprende una 1,2-ditio-3-tiona tal como oltipraz, o un derivado farmacológicamente activo de la misma.

30 La administración del agente que estimula la transposición nuclear de la proteína Nrf2 y los aumentos posteriores de productos génicos que desintoxican y eliminan los metabolitos citotóxicos puede ser por inyección intraocular, implantación de un dispositivo de suministro de liberación lenta, o por administración tópica, oral e intranasal, inyección generalizada u otras administraciones generalizadas.

35 En otra forma de realización adicional del presente método de la invención, el paciente está diagnosticado de retinopatía glaucomatosa o de neuropatía óptica y, en otra forma de realización de la invención, el paciente presenta síntomas de retinopatía glaucomatosa o de neuropatía óptica.

Breve descripción del dibujo

40 El dibujo demuestra el efecto del sulforafano sobre la toxicidad producida por glutamato en las células ganglionares retinianas cultivadas de rata adulta. Se trataron las células durante 3 días con los compuestos indicados. Se analizó la supervivencia mediante recuento de células sanas positivas a Thy-1. El asterisco * representa una diferencia significativa de los valores de referencia mediante análisis de varianza ANOVA de una vía entre grupos, a continuación la prueba de Dunnett.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se refiere a la utilización de agentes que estimulan la transposición nuclear de la proteína Nrf2 y a los aumentos posteriores de productos génicos que desintoxican y eliminan metabolitos citotóxicos como un procedimiento para el tratamiento de la retinopatía glaucomatosa y de la neuropatía óptica.

50 La expresión "tratamiento de la retinopatía glaucomatosa y de la neuropatía óptica", tal como se utiliza en la presente memoria, significa el retraso o la prevención del desarrollo de, la inhibición de la evolución, o el alivio de la retinopatía glaucomatosa o de la neuropatía óptica, o de los síntomas de las mismas. La estimulación de la transposición nuclear de la proteína Nrf2 y los aumentos posteriores de los productos génicos que desintoxican y
55 eliminan los metabolitos citotóxicos se proporciona para la protección de las células ganglionares retinianas y para la protección del nervio óptico.

60 La transposición nuclear de Nrf2 se produce en las células expuestas a determinados electrófilos y oxidantes. Los genes producidos debido a la transposición nuclear de Nrf2 producen enzimas de desintoxicación que potencian la protección contra electrófilos y favorece la restauración o degradación de las proteínas dañadas. La producción de estas enzimas está regulada a nivel de transcripción y está mediada por un potenciador específico, el elemento de respuesta antioxidante o ARE, descubierto en el activador del gen que codifica la enzima. El contexto de la secuencia del ARE, la naturaleza de los inductores químicos y el tipo de célula afectan la actividad del potenciador
65 en un gen específico.

El factor de transcripción Nrf2 es un miembro de la familia de factores de transcripción NF-E2 y es responsable de regular por incremento la expresión génica mediada por el elemento de la respuesta antioxidante (ARE). Nrf2 produce la expresión génica uniendo la zona de ARE (elemento de respuesta antioxidante) del activador para activar constitutivamente la transcripción génica o en respuesta a una señal de agresión oxidativa. En condiciones normales, se cree que Nrf2 está presente en el citoplasma unido mediante una proteína represora Keap1, una proteína citoplasmática anclada al citoesqueleto de actina. Sin pretender resultar limitados por la teoría, los inventores creen que los agentes que presentan actividad estimulante de transposición nuclear de la proteína Nrf2 pueden competir con la zona que interviene rica en cisteína o con un factor citosólico Keap1 para la interacción con Nrf2 (Dinkova-Kostova, A. T., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 99:11908-11913 (2002)). La descomposición del complejo Nrf2-Keap1 por determinados compuestos tal como el sulforafano puede liberar Nrf2 para trasladarla en el núcleo donde puede heterodimerizarse con otros factores de transcripción (es decir, Maf, c-Jun, etc.) en las zonas de ARE de los genes que conducen a la producción de la expresión génica regulada por ARE.

Las enzimas y proteínas expresadas por esta serie de reacciones de Nrf2/ARE poseen propiedades citoprotectoras químicamente versátiles y son una defensa contra los metabolitos tóxicos y los xenobióticos. Las enzimas y proteínas conocidas por expresarse a través de la serie de reacciones de Nrf2/ARE incluyen las glutatión-S-transferasas, UDP-glucuronosiltransferasas, NADP(H) quinona oxidoreductasa, γ -glutamylcisteína sintetasa, proteínas de la respuesta a la agresión por chaperona y proteínas de ubiquitina/proteasoma.

Los agentes que presentan actividad estimulante para la transposición nuclear de la proteína Nrf2 incluyen, por ejemplo:

Aceptores de adición de Michael (p. ej., compuestos de carbonilo α,β insaturados), tal como maleato de dietilo o fumarato de dimetilo;
 difenoles tales como resveratrol,
 hidroxianisoles butilados tal como 2(3)-terc-butil-4-hidroxianisol,
 tiocarbamato tal como pirrolidineditiocarbamato,
 quinonas tales como terc-butil-hidroquinona,
 isotiocianatos tal como sulforafano, su precursor glucosinolato, glucorafanina o isotiocianato de fenetilo (PEITC),
 1,2-ditioil-3-tionas tal como oltipraz,
 3,5-di-terc-butil-4-hidroxitolueno,
 etoxiquina,
 cumarinas tal como 3-hidroxycumarina,
 flavonoides tal como quercetina o curcumina,
 sulfuro de dialilo,
 indol-3-carbinol,
 gallato de epigallo-3-catequina,
 ácido ellágico,
 combinaciones de los mismos, o un derivado o análogo farmacológicamente activo de los mismos.

Un receptor de Michael es una molécula que presenta un alqueno adyacente a un grupo que capta electrones. El grupo que capta electrones es normalmente un carbonilo, pero puede ser asimismo un grupo nitrilo o nitro. Aunque químicamente variados, estos compuestos son electrófilos y tienen capacidad para reaccionar con grupos sulfhidrilo nucleófilos. Un "derivado farmacológicamente activo de los mismos", es un agente estructuralmente relacionado con cualquiera de los compuestos anteriores que presenta actividad estimulante para la transposición nuclear de la proteína Nrf2 y procedente de ella y puede ser un éster, una amida, o una sal de los mismos, por ejemplo. Un "análogo farmacológicamente activo de los mismos", es un agente que presenta una estructura similar a cualquiera de los compuestos anteriores con actividad estimulante para la transposición nuclear de la proteína Nrf2 pero que se diferencia ligeramente en la composición, tal como por ejemplo en la sustitución de un átomo por un átomo de un elemento diferente o en presencia de un grupo funcional específico. En una forma de realización, la presente invención proporciona sulforafano, oltipraz, un análogo farmacológicamente activo de los mismos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos en un procedimiento de tratamiento para la neuropatía óptica glaucomatosa o la neuropatía glaucomatosa.

El sulforafano (producto nº S6317, Sigma-Aldrich) es conocido por producir, por ejemplo, quinona reductasa, glutatión-S-transferasa y glutatión reductasa. La producción de enzimas se ha observado en varias estirpes celulares incluyendo las células epiteliales del pigmento retiniano del ser humano adulto (Zhang, Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 89:2399-2403 (1992)). Los análogos de sulforafano incluyen, por ejemplo, 6-(isotiocianato-2-hexanona), exo-2-acetil-6-isotiocianatonorborno, exo-2-(isotiocianato-6-metilsulfonil-norborno), 6-isotiocianato-2-hexanol, 1-(isotiocianato-4-dimetilfosfonilbutano, exo-2-(1-hidroxi-etil)-5-isotiocianatonorborno, exo-2-acetil-5-isotiocianatonorborno, 1-(isotio-cianato-5-metil-sulfonil)pentano, cis-3-(metilsulfonil)(ciclohexilmetilisotiocianato) y trans-3-(metilsulfonil)-(ciclohexilmetilisotiocianato).

Modo de administración: Los agentes de la presente invención pueden suministrarse directamente al ojo (por ejemplo: colirios tópicos o pomadas; dispositivos de liberación lenta en el fondo del saco o implantados junto a la esclerótica o dentro del ojo; inyecciones perioculares, conjuntivas, bajo la cápsula de Tenon, dentro de la cámara,

dentro del vítreo o intracanales) o por vía generalizada (por ejemplo: inyecciones por vía oral, intravenosa, subcutánea o intramuscular; administración parenteral, dérmica o nasal) utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Se contempla además que los agentes de la invención puedan formularse en inserción intraocular o dispositivos de implante.

5 *Sujeto:* Un sujeto tratado de retinopatía glaucomatosa o neuropatía óptica como el descrito en la presente memoria puede ser un ser humano u otro animal en situación de riesgo de desarrollar retinopatía glaucomatosa o neuropatía óptica o que presenta síntomas de retinopatía glaucomatosa o neuropatía óptica.

10 *Formulaciones y dosis:* Los agentes de la presente invención pueden administrarse como soluciones, suspensiones o emulsiones (dispersiones) en un portador oftálmicamente adecuado. Los siguientes son ejemplos de posibles formulaciones incorporadas a la presente invención.

	Cantidad en peso, %
Agente estimulante de transposición nuclear de la proteína Nrf2	0,01-5; 0,01- 2,0; 0,5-2,0
Hidroxipropilmetilcelulosa	0,5
Cloruro sódico	0,8
Cloruro de benzalconio	0,01
EDTA	0,01
NaOH/HCl	c.s.p. pH 7,4
Agua purificada	c.s.p. 100%

	Cantidad en peso, %
Agente estimulante de la transposición nuclear de la proteína Nrf2	0,00005-0,5; 0,0003-0,3; 0,0005-0,03; 0,001
Solución salina tamponada con fosfato	1,0
Cloruro de benzalconio	0,01
Polisorbato 80	0,5
Agua purificada	c.s. para 100%

15

	Cantidad en peso, %
Agente estimulante de la transposición nuclear de la proteína Nrf2	0,001
Fosfato sódico monobásico	0,05
Fosfato sódico dibásico (anhidro)	0,15
Cloruro sódico	0,75
EDTA disódico	0,05
Cremophor EL	0,1
Cloruro de benzalconio	0,01
HCl y/o NaOH	pH 7,3-7,4
Agua purificada	c.s. para 100%

	Cantidad en peso, %
Agente estimulante de la transposición nuclear de la proteína Nrf2	0,0005
Solución salina tamponada con fosfato	1,0
Hidroxipropil-β-ciclodextrina	4,0
Agua purificada	c.s. para 100%

20 En otra forma de realización, se formulan composiciones oftálmicas para proporcionar una concentración intraocular de aproximadamente 0,1 a 100 nanomolar (nM) o, en otra forma de realización, 1 a 10 nM. Pueden conseguirse concentraciones pico en el plasma de hasta 20 micromolar por administración generalizada. Las composiciones tóxicas se suministran a la superficie del ojo una a cuatro veces al día según el criterio de rutina de un médico experto. El pH de la formulación debería ser entre 4 y 9 ó 4,5 y 7,4. Las formulaciones generalizadas pueden contener aproximadamente 10 mg a 1.000 mg, aproximadamente 10 mg a 500 mg, aproximadamente 10 mg a 100 mg o a 125 mg, por ejemplo, del agente que estimula la transposición nuclear de la proteína Nrf2 y el aumento posterior en los productos génicos que desintoxican y eliminan los metabolitos citotóxicos.

25 Una "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de agente que es capaz de estimular la transposición nuclear de la proteína Nrf2 y los aumentos posteriores en los productos génicos que desintoxican y eliminan los metabolitos citotóxicos. Dicha producción de la expresión génica proporciona una defensa contra la toxicidad de electrófilos reactivos así como de otros metabolitos tóxicos. Por consiguiente, se proporciona un agente que estimula la transposición nuclear de la proteína Nrf2 y los aumentos posteriores de los productos génicos que desintoxican y eliminan los metabolitos citotóxicos para la protección contra la citotoxicidad. Dicha protección retarda o impide el comienzo de los síntomas en un paciente en situación de riesgo de desarrollar neuropatía óptica glaucomatosa o retinopatía glaucomatosa. La cantidad eficaz de una formulación puede depender de factores tales como la edad,

raza y sexo del paciente, o la gravedad de la neuropatía óptica, por ejemplo. En una forma de realización, el agente se suministra al ojo por vía tópica y alcanza las células ganglionares retinianas a una dosis terapéutica mejorando de este modo los procesos patológicos de retinopatía y neuropatía óptica.

- 5 Aunque el régimen exacto se deja a criterio del médico, la solución o soluciones resultantes se administran preferentemente colocando una gota de cada solución o soluciones en cada ojo una a cuatro veces al día, o según la indicación del médico.

10 *Portadores aceptables:* Un portador oftálmicamente aceptable se refiere a los portadores que producen la mayoría, poca a ninguna irritación ocular, que proporcionan protección adecuada si se necesita, y suministran uno o más agentes que estimulan la transposición nuclear de la proteína Nrf2 y los aumentos posteriores en los productos génicos que desintoxican y eliminan los metabolitos citotóxicos de la presente invención en una dosis homogénea. Para el suministro oftálmico, un agente que estimula la transposición nuclear de la proteína Nrf2 y los aumentos posteriores en los productos génicos que desintoxican y eliminan los metabolitos citotóxicos pueden combinarse con conservantes, codisolventes, tensioactivos, potenciadores de viscosidad, potenciadores de penetración, tampones oftalmológicamente aceptables, cloruro sódico, o agua para formar una suspensión, solución acuosa oftálmicamente estériles o geles viscosos o semiviscosos u otros tipos de composición sólida o semisólida tal como una pomada. Las formulaciones de solución oftálmica pueden prepararse disolviendo el agente en un tampón acuoso isotónico fisiológicamente aceptable. Además, la solución oftálmica puede incluir un tensioactivo oftalmológicamente aceptable que ayude a disolver el agente. Los compuestos que aumentan la viscosidad, tal como hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, o similares, pueden añadirse a las composiciones de la presente invención para mejorar la retención del compuesto.

25 Con el fin de preparar una formulación de pomada oftálmica esterilizada, el agente que estimula la transposición nuclear de la proteína Nrf2 y los aumentos posteriores en los productos génicos que desintoxican y eliminan los metabolitos citotóxicos se combina con un conservante en un vehículo apropiado, tal como un aceite mineral, lanolina líquida o vaselina blanca. Las formulaciones con gel oftálmico esterilizado pueden prepararse poniendo en suspensión el agente en una base hidrófila preparada a partir de la combinación, por ejemplo, de CARBOPOL®-940 (BF Goodrich, Charlotte, NC), o similares, según los procedimientos conocidos en la materia para otras formulaciones oftálmicas. Puede utilizarse VISCOAT® (Alcon Laboratorios, Inc., Fort Worth, TX) para la inyección intraocular, por ejemplo. Otras composiciones de la presente invención pueden contener materiales para potenciar la penetración tales como CREMOPHOR® (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) y TWEEN® 80 (monolaurato de polioxitileno sorbitan, Sigma Aldrich), en caso de que los agentes de la presente invención sean menos penetrantes en el ojo.

35 **Ejemplo 1**

Agentes que presentan actividad estimulante para la transposición nuclear de la proteína Nrf2

40 Las células endoteliales vasculares, tales como las células endoteliales aórticas bovinas (BAEC, VEC Technologies, Rensselaer, NY), se utilizan para determinar los agentes que presentan actividad estimulante para la transposición nuclear de la proteína Nrf2. Por ejemplo, se exponen monocapas confluentes de células endoteliales aórticas bovinas a agentes experimentales en medio de Eagle modificado por Dulbecco con suero de bovino fetal al 1% hasta 24 horas. Se preparan lisados celulares, extractos citosólicos y extractos nucleares, y se realiza la inmunotransferencia y se cuantifica tal como se describe en Buckley, B. J., *et al.* (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307:973-979 (2003)). En los agentes que aumentan la cantidad de Nrf2 detectados en la fracción nuclear en comparación con las células de referencia sin agente se determina la actividad en un ensayo de toxicidad de las células ganglionares retinianas como se indica en el Ejemplo 2.

50 **Ejemplo 2**

Protección de las células ganglionares retinianas de rata por un agente con actividad estimulante para la transposición nuclear de la proteína Nrf2

55 Células nerviosas de la retina de rata cultivadas se combinan con un agente que estimula la transposición nuclear de la proteína Nrf2 durante 1 a 24 horas, a continuación la combinación se expone a peróxido. La supervivencia de las células nerviosas de la retina en comparación con un cultivo de referencia sin peróxido indica que el agente proporciona protección del oxidante.

60 Células nerviosas de la retina de rata recién nacida se aíslan y se cultivan como se describe en Pang, I-H., *et al.*, (*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40:1170-1176 (1999)). "Retiniana neural" se refiere a la retina sin epitelio del pigmento retiniano. Por lo tanto, el cultivo contiene una población mixta de tipos de células retinianas. En resumen, se anestesian ratas Sprague-Dawley recién nacidas de 2 a 5 días y se practica una abertura de 2 mm en la línea media en el cuero cabelludo justamente caudal al seno transversal. Las células ganglionares retinianas se marcan por contraste selectivamente con un colorante fluorescente, Di-I, (perclorato de 1,1'-diocetadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina), trazador lipófilo que marca uniformemente las neuronas (Molecular Probes, Eugene, OR). La punta de la aguja de inyección (30 ga) se inserta 6 mm bajo la parte superior del cráneo, y se inyectan 5 µl

de solución Di-I en los tubérculos cuadrigéminos superiores. La solución Di-I contiene 3 mg/ml de Di-I en 90% de etanol y 10% de sulfóxido de dimetilo. La herida se cubre con una gota de colodión flexible.

5 Dos a 4 días después de la inyección de Di-I, se anestesian las ratas y se sacrifican por decapitación. Se extraen las órbitas de los ojos y se colocan en medio Eagle modificado por Dulbecco: mezcla nutriente F12 (1:1; DMEM/F12, Gibco, Gaithersburg, MD). La retina de cada ojo se desprende y aísla. Se disocian las células retinianas mediante una solución que contiene 10 mg de papaína (34 unidades/ml), 2 mg de DL-cisteína (3,3 mM) y 2 mg de albúmina de suero bovino (0,4 mg/ml) en 5 ml de DMEM/F12, durante 25 min a 37°C, y se lavan a continuación 3 veces con 5 ml de medio RGC (DMEM, enriquecido con 10% de suero bovino fetal, glutamina 4 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina). Las piezas retinianas se trituran pasándolas a través de una pipeta disponible varias veces hasta que las células se dispersan. Las suspensiones celulares (aproximadamente 3×10^6 células/ml) se colocan en placas de cultivo con fondo de vidrio recubiertas con poli-D-lisina. Las células se cultivan con 95% de aire/5% de CO₂ a 37°C.

15 Se determinan los efectos protectores de un agente que presenta actividad estimulante para la transposición nuclear de la proteína Nrf2 tratando los cultivos con el agente experimental durante 1 a 24 horas, añadiéndose a continuación 300 µM de H₂O₂. Las RGC cultivadas se identifican por fluorescencia con Di-I. Se evalúa la supervivencia de RGC realizando el recuento del número de células restantes con fluorescencia de Di-I. Se proporcionan los agentes que mejoran la supervivencia de las células ganglionares retinianas en comparación con una referencia para proteger las RGC de la agresión citotóxica y sirven para el tratamiento de la neuropatía óptica glaucomatosa.

Ejemplo 3

25 **Protección de las células ganglionares retinianas de la toxicidad producida por glutamato mediante sulforafano**

Se practicó la eutanasia por asfixia con CO₂ a ratas Sprague-Dawley adultas. Se extrajeron las órbitas de los ojos y se colocaron en medio NEUROBASAL™ (Gibco, Gaithersburg, MD). Se desprendió la retina de cada ojo y se aisló. 30 Las células de la retina se disociaron combinándolas hasta 20 retinas con 5 ml de solución de papaína que contenía 10 mg de papaína, 2 mg de DL-cisteína y 2 mg de albúmina de suero bovino en 5 ml de medio NEUROBASAL™ durante 25 min a 37°C, se lavaron a continuación 3 veces con 5 ml de medio RGC (NEUROBASAL™) medio enriquecido como se expone en el Ejemplo 2 y con 1% de suero de ternero fetal. Las piezas de retina se trituraron pasándolas a través de una pipeta disponible pulida a la llama varias veces hasta la dispersión de las células. La suspensión celular se colocó en un portaobjetos de cámara de cultivo de 8 pocillos recubierto con poli-D-lisina y laminina. Se añadieron glutamato y glutamato con sulforafano para asignar los pocillos. Se cultivaron a continuación las células en 95% de aire/5% de CO₂ a 37°C durante tres días.

40 Al final del periodo de incubación, se fijaron las células y se marcaron con Thy-1, marcador de RGC, por inmunocitoquímica. Se cuantificó la supervivencia celular manualmente realizando el recuento de las células sanas positivas a Thy-1 en cada pocillo. Los datos resultantes se presentan en el dibujo y demuestran que el tratamiento de las RGC con glutamato (100 µM) durante 3 días produjo una reducción del 40 al 60% de las células sobrevivientes. Tratando las células con sulforafano (0,5 µM) se evitó dicha toxicidad. Estos resultados demuestran que el sulforafano protege contra las agresiones a las células ganglionares retinianas.

45 Las referencias citadas en la presente memoria, en la medida en que proporcionan procedimientos a título de ejemplo u otros detalles complementarios a los indicados en la presente memoria, se incorporan específicamente como referencia.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria y a menos que se indique de otra manera, los términos “un” y “una” se considera que significan “un/una”, “por lo menos un/una” o “un/a o más”.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para el tratamiento de la retinopatía glaucomatosa o de la neuropatía óptica en un sujeto en la que la composición proporciona una concentración intraocular de aproximadamente 0,1 a 100 nM de un agente que estimula la transposición nuclear de la proteína Nrf2 junto con un portador oftálmicamente aceptable.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición proporciona una concentración intraocular de aproximadamente 1 a 10 nM de un agente que estimula la transposición nuclear de la proteína Nrf2 junto con un portador oftálmicamente aceptable.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que el portador oftálmicamente aceptable comprende conservantes oftálmicamente aceptables; codisolventes; tensioactivos; potenciadores de viscosidad; potenciadores de penetración; tampones; cloruro sódico; agua; tampón acuoso isotónico; un tensioactivo; o compuestos que aumentan la viscosidad, tal como hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, o polivinilpirrolidona; o una base hidrófila.
- 20 4. Composición según la reivindicación 3, en la que el conservante está provisto de un vehículo seleccionado de entre aceite mineral, lanolina líquida y vaselina blanca.
- 25 5. Composición según la reivindicación 3 ó 4, en la que la base hidrófila es seleccionada de entre CARBOPOL-940 o VISCOAT.
- 30 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende además unos materiales potenciadores de la penetración seleccionados de entre CREMOPHOR y TWEEN 80.
- 35 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el pH está comprendido en el intervalo de 4 a 9, preferentemente comprendido en el intervalo de 4,5 a 7,4.
- 40 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agente es seleccionado de entre el grupo constituido por aceptor de adición de Michael, difenol, tiocarbamato, quinina, 1,2-ditiol-3-tiona, hidroxianisol butilado, flavonoides, un isotiocianato, 3,5-di-terc-butil-4-hidroxitolueno, etoxiquina, una cumarina, combinaciones de los mismos o un derivado farmacológicamente activo o análogo de los mismos.
- 45 9. Composición según la reivindicación 8, en la que el isotiocianato comprende sulforafano, o un derivado farmacológicamente activo o análogo del mismo.
10. Composición según la reivindicación 8, en la que la 1,2-ditiol-3-tiona comprende oltipraz, o un derivado farmacológicamente activo o análogo del mismo.
11. Composición según la reivindicación 8, en la que el flavonoide comprende quercetina o un derivado farmacológicamente activo o análogo de la misma.
12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es preparada para la inyección intraocular, o para la implantación de un dispositivo de suministro de liberación lenta o para la administración tópica, u oral, o intranasal o intraocular.

