

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 376**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/549** (2006.01)  
**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04719486 .5**  
96 Fecha de presentación: **11.03.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1601362**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.12.2005**

54 Título: **Utilización del diazóxido en el tratamiento de la isquemia retiniana**

30 Prioridad:  
**11.03.2003 FR 0303011**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.06.2012**

73 Titular/es:  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS)  
3, RUE MICHEL-ANGE  
75794 PARIS CEDEX 16, FR  
UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS**

72 Inventor/es:  
**LAZDUNSKI, Michel y  
ETTAICHE, Mohamed**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 382 376 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

Utilización del diazóxido en el tratamiento de la isquemia retiniana

La presente invención se refiere a la utilización del diazóxido (7-cloro-3-metil-2H-1,2,4-benzotiadiazina-1,1-dióxido) en el tratamiento de la isquemia retiniana. La invención se refiere, más particularmente, a la utilización de una composición que contiene diazóxido para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de una isquemia retiniana y de enfermedades asociadas a una isquemia retiniana.

Los fenómenos que llevan a la muerte celular de la retina, y como consecuencia a la pérdida de la función visual, son fenómenos que sobrevienen de procesos tan variados como las isquemias y las radiaciones luminosas. El desarrollo crónico del estado de isquemia en patologías como la retinopatía diabética, la retinopatía generada por las radiaciones y los daños provocados por una oclusión venosa, lleva a una perturbación de la despolarización de la membrana celular lo que, a largo plazo, produce una destrucción irreversible de la retina.

Así, la isquemia retiniana se observa en la clínica en situaciones agudas tales como las oclusiones arteriales o venosas de la retina, las contusiones oculares y también en patologías crónicas tales como la degeneración macular ligada a la edad (DMLA), el glaucoma, la retinopatía diabética, la retinopatía del prematuro, las enfermedades inflamatorias y las hemopatías que llevan a un daño retiniano que culmina igualmente, en numerosos casos, en una degeneración total de la retina. El glaucoma y la degeneración macular ligada a la edad han llegado a ser las principales causas de las deficiencias visuales en los países occidentales, ligadas al aumento de la esperanza de vida y constituyen por tanto un verdadero problema de salud pública.

Debido a la frecuencia y la gravedad de estas afecciones oculares, existe una necesidad real de un tratamiento eficaz destinado a tratar y/o a prevenir las enfermedades asociadas a una isquemia retiniana.

Con el fin de contrarrestar los daños provocados por una isquemia-reperfusión retiniana, se han utilizado varios métodos farmacológicos en el terreno experimental. Para el tratamiento de la isquemia retiniana, han sido propuestos como agentes terapéuticos los atrapadores de los radicales libres (Celeci *et al.*, 2002; Szabo *et al.*, 2001), los antagonistas de los receptores del glutamato (Lagreze *et al.*, 2001) y de los receptores adrenérgicos (Donello *et al.*, 2001; Chao *et al.*, 2001) pero igualmente de los factores neurotróficos (Fontaine *et al.*, 2002; Seigel *et al.*, 2000; Cuevas *et al.*, 1998), de los bloqueantes de los canales de calcio (Osborne *et al.*, 2002) y de los inhibidores de la liberación sináptica del glutamato (Ettaiche *et al.*, 1999). La utilización de un liberador del glutamato y más particularmente del riluzol en el tratamiento de la isquemia retiniana son el objeto de la solicitud de patente internacional WO 99/42103 publicada el 26 de agosto de 1999.

La isquemia inducida por el aumento de la presión ocular es el modelo utilizado más frecuentemente para estudiar a la vez los mecanismos y las terapias potenciales de la isquemia retiniana. El grado de lesión de la retina es dependiente de la especie animal, de la duración y de la intensidad de la presión ocular impuesta. Contrariamente al modelo experimental de isquemia retiniana por ligadura del nervio óptico, esta técnica permite, por una parte, evitar una hemorragia intraocular provocada al principio de la reperfusión y, por otra parte, ofrece la ventaja de conservar las estructuras extraoculares intactas permitiendo así realizar aplicaciones locales de sustancias farmacológicas.

Los diferentes métodos farmacológicos, validados sobre modelos animales experimentales, se enfrentan a dos dificultades que son, por una parte, el aspecto protector pero no terapéutico de estas moléculas (con la excepción del riluzol), por otra parte, su utilización clínica que necesita una administración desprovista de todo efecto secundario sobre los otros órganos. Las diferentes vías de administración utilizadas son la inyección intravítrea y las vías oral, sistémica y local. La inyección intravítrea utilizada para los factores de crecimiento puede agravar la reacción inflamatoria provocada por una isquemia pero igualmente puede inducir, en el lugar de la inyección, una proliferación celular. La vía oral se enfrenta al problema de la biodisponibilidad del principio activo a nivel del sitio de acción, la inyección sistémica puede inducir efectos secundarios sobre otros órganos y finalmente la aplicación local puede inducir igualmente efectos nefastos sobre los otros tejidos oculares en particular la pérdida de la sensibilidad corneal y una midriasis. Los estudios realizados por los autores de esta invención han permitido demostrar que estos efectos no se observan después de la instilación del diazóxido.

Los estudios de los autores de esta invención han demostrado que la retina es rica en una clase de canales de potasio (Ettaiche *et al.*, 2001) que une las propiedades eléctricas de las células excitables con el metabolismo y más particularmente con la relación ATP/ADP (Bernardi *et al.*, 1992). Estos son los canales de potasio ATP dependientes o canales KATP. Por otro lado, la activación de los canales KATP por abridores específicos protege al hipocampo en el sistema nervioso central contra la isquemia (Heurteaux *et al.*; 1993). Teniendo esto en cuenta, se ha ensayado el diazóxido (7-cloro-3-metil-2H-1,2,4-benzotiadiazina-1,1-dióxido), un abridor de los canales potásicos ATP dependientes (Ashcroft *et al.*, 2000), sobre un modelo experimental de isquemia-reperfusión de la retina.

El diazóxido es una sustancia farmacéutica desarrollada en su origen para el tratamiento de la hipertensión. El diazóxido es igualmente conocido por causar una hiperglucemia transitoria debida a una disminución de la secreción

de insulina y a una disminución de la utilización periférica de la glucosa (Henquin *et al.*, 1982, Diabetes 31: 776-783). La solicitud de patente internacional WO 94/25033 publicada el 10 de noviembre de 1994 describe un método para tratar un defecto en el metabolismo de la glucosa que consiste en administrar el diazóxido.

5 Además, el diazóxido es una sustancia liposoluble y de bajo peso molecular susceptible por tanto de atravesar la barrera corneal animal o humana. Su formulación y su acondicionamiento en colirio son fáciles de realizar, lo que constituye una gran ventaja desde un punto de vista terapéutico y económico en el tratamiento y/o en la prevención de las enfermedades asociadas a una isquemia retiniana.

10 Los trabajos de los autores de la invención han permitido identificar un método para prevenir los efectos nocivos sufridos por la retina neurosensorial después de una isquemia inducida experimentalmente por la elevación de la presión intraocular. El tratamiento terapéutico consiste en la instilación local, en el saco conjuntival, de una gota de una solución oftálmica cuyo principio activo es el diazóxido. Este tratamiento impide la pérdida de la función visual reduciendo los efectos nocivos inducidos por la isquemia-reperfusión, en las capas ganglionar, plexiforme interna y nuclear interna.

15 La isquemia retiniana inducida experimentalmente por aumento de la presión intraocular es el modelo utilizado más habitualmente para el cribado de moléculas y el estudio de los mecanismos implicados en la isquemia. Este modelo aplicado a la rata, en la que la vascularización de la retina es idéntica a la del hombre, engendra lesiones localizadas, en una primera fase, a nivel de las capas de las células ganglionares y de la plexiforme interna. Estas lesiones se traducen por la muerte de las células ganglionares y por una reducción importante del espesor de la capa plexiforme interna. La segunda fase se caracteriza por una reducción del espesor tanto de la capa nuclear interna como de la capa de las células fotorreceptoras. La aplicación tópica del diazóxido, después del fin de la isquemia o más tarde (24 horas después del principio de la perfusión), bloquea de forma espectacular las lesiones generadas por la isquemia-reperfusión. Este efecto se traduce a nivel de la función visual por una mejor recuperación de la amplitud de las ondas A y B, consecuencia de una buena conservación de la citoarquitectura de la retina. Estos resultados descritos aquí (efecto terapéutico por aplicación local) señalan al diazóxido como una molécula con un alto potencial terapéutico contra la isquemia retiniana y las enfermedades asociadas a una isquemia retiniana.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a la utilización de una composición farmacéutica que comprende diazóxido (7-cloro-3-metil-2H-1,2,4-benzotiadiazina-1,1-dióxido) para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de una enfermedad asociada a la isquemia retiniana.

30 De forma ventajosa, la composición farmacéutica utilizada en el marco de la presente invención comprende de 0,001 % a 0,1 % de diazóxido. En esta composición, el diazóxido se encuentra en un vehículo farmacéuticamente aplicable. En el marco de una aplicación ocular de esta composición, los especialistas en la técnica conocen los vehículos farmacéuticamente aceptables tales como, a título de ejemplo y de forma no exhaustiva, el suero fisiológico estéril.

35 Las retinopatías diabéticas o las inducidas por radiaciones y los daños retinianos provocados por una isquemia (fenómeno multifactorial) resultan de mecanismos complejos. Por consiguiente, la asociación de varias moléculas que tienen objetivos diferentes, y por tanto virtudes terapéuticas diferentes, debería permitir una mejor recuperación de la función retiniana.

40 Teniendo esto en cuenta, el riluzol (2-amino-6-trifluorometoxibenzotiazol) cuya propiedad principal es inhibir la liberación presináptica del glutamato (Ettaiche *et al.*, 1999), mediante la activación de otros tipos de canales potásicos; los canales TREK y TRAAK (Duprat *et al.*, 2000), y cuyos efectos terapéuticos por aplicación local se han demostrado experimentalmente, sería una molécula de elección para asociar con el diazóxido en las patologías inducidas por las isquemias retinianas.

45 Por consiguiente, la presente invención se refiere a la utilización de una composición farmacéutica que comprende, además del diazóxido, riluzol o un derivado de éste, activo en neuroprotección o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de una enfermedad asociada a la isquemia retiniana.

50 Se entienden por «derivado del riluzol activo en neuroprotección» y por «una sal farmacéuticamente aceptable del riluzol», las moléculas descritas en la solicitud de patente internacional WO 99/42103 publicada el 26 de agosto de 1999. Los especialistas en la técnica tienen también que elegir llegado el caso la forma más adaptada a la nueva aplicación según la invención. Como sales farmacéuticamente aceptables, se pueden citar especialmente las sales de adición con ácidos minerales tales como hidrocloreto, sulfato, nitrato, fosfato o con ácidos orgánicos tales como acetato, propionato, succinato, oxalato, benzoato, fumarato, maleato, metanosulfonato, isetonato, etc..., o los derivados de sustitución de estos.

Las composiciones farmacéuticas según la invención están constituidas al menos por el diazóxido en forma libre o en forma de una sal de adición con un ácido farmacéuticamente aceptable, en estado puro o en forma de una composición en la que este principio activo está asociado a cualquier otro producto farmacéuticamente compatible. Los medicamentos según la invención se pueden utilizar por vía oral, parenteral, rectal o tópica.

- 5 Como composiciones sólidas para administración oral, se pueden utilizar comprimidos, píldoras, polvos, etc... en los que el diazóxido se mezcla con uno o varios diluyentes inertes utilizados clásicamente, y eventualmente con otras sustancias, tales como por ejemplo un lubricante, un colorante, un material de recubrimiento etc....

- 10 Como composiciones líquidas para administración oral u ocular, se pueden utilizar suspensiones, soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes utilizados clásicamente, y eventualmente otras sustancias como productos humectantes, edulcorantes, espesantes, etc.

Las composiciones estériles para administración parenteral pueden ser soluciones acuosas o no, suspensiones o emulsiones. Como disolvente o vehículo, se puede emplear el agua, el propilenglicol, aceites vegetales u otros disolventes orgánicos adecuados. Estas composiciones pueden contener igualmente adyuvantes, tales como agentes humectantes, isotonzantes, emulsionantes, etc....

- 15 Las composiciones para la administración tópica pueden ser por ejemplo cremas, lociones, colutorios, gotas nasales u oculares o un aerosol.

- 20 Como aparece en los experimentos descritos aquí más adelante, una forma de aplicación preferida de la composición farmacéutica utilizada en el marco de la presente invención es una aplicación local en el ojo, del medicamento objeto de la invención. Esta aplicación en el ojo es, de forma ventajosa, una instilación local en el saco conjuntival. Lo mismo que la aplicación local en el ojo, constituye un modo de utilización ventajosa del diazóxido en la aplicación según la invención. Así, se considera muy particularmente una composición farmacéutica que se presenta bajo la forma de un colirio.

- 25 La invención se refiere también al procedimiento de preparación de los medicamentos según la invención que consiste en mezclar el diazóxido eventualmente con el riluzol, un derivado de éste activo en neuroprotección, una sal farmacéuticamente aceptable de éste, con uno o varios diluyentes y/o adyuvantes compatibles y farmacéuticamente aceptables.

La presente invención se refiere igualmente a un método de tratamiento y/o de prevención de una enfermedad asociada a una isquemia retiniana que consiste en administrar al paciente que sufre o es susceptible de sufrir dicha enfermedad, una cantidad suficiente de una composición farmacéutica tal como la descrita anteriormente.

- 30 En el marco de la presente invención, se entiende por « enfermedad asociada a una isquemia retiniana », una enfermedad elegida en el grupo constituido por las oclusiones arteriales o venosas de la retina, las contusiones oculares y también en las patologías crónicas tales como la degeneración macular ligada a la edad (DMLA), el glaucoma, la retinopatía diabética, la retinopatía del prematuro, las enfermedades inflamatorias y las hemopatías.

- 35 Otras ventajas y características de la invención aparecerán después de la lectura de los ejemplos que siguen en relación al estudio de los efectos de un tratamiento con diazóxido sobre ratas con isquemia. Ellos hacen referencia a las figuras adjuntas en las que:

- 40 - la figura 1 se refiere a los perfiles representativos de los electroretinogramas registrados en los diferentes grupos ensayados (A a D) 7 días después del fin de la isquemia retiniana. La figura 1A corresponde al grupo control (ratas testigos sin isquemia y no tratadas), la figura 1B al grupo de ratas que han sufrido una isquemia de 40 min pero no tratadas, la figura 1C al grupo de ratas tratadas con diazóxido aplicado 30 min después del fin de la isquemia y la figura 1D al grupo de ratas tratadas con diazóxido aplicado 24 horas después del fin de la isquemia.

- la figura 2 representa la amplitud de las ondas A (figura 2A) y B (figura 2B) del electroretinograma a las 24, 48, 72 y 168 horas para los diferentes grupos ensayados. Los diferentes grupos ensayados son:

- 45 i) el grupo control de ratas testigos sin isquemia y no tratadas  
 ii) el grupo de ratas que han sufrido una isquemia de 40 min pero no tratadas,  
 iii) el grupo de ratas tratadas con diazóxido aplicado 30 min después del fin de la isquemia y  
 iv) el grupo de ratas tratadas con diazóxido aplicado 24 horas después del fin de la isquemia.

Los valores se expresan en porcentaje del valor basal  $\pm$  la desviación típica (n = 7 para cada histograma). \* indica una diferencia significativa entre el grupo isquémico no tratado o isquémico tratado con diazóxido y el grupo control.

\*\* indica una diferencia significativa entre el grupo isquémico no tratado o los grupos isquémicos tratados con diazóxido.

5 - la figura 3 representa fotomicrografías representativas de la citoarquitectura de la retina a los 7 días después del fin de la isquemia en los diferentes grupos ensayados (A a D). La figura 3A corresponde al grupo control (ratas testigos sin isquemia y no tratadas), la figura 3B al grupo de ratas que han sufrido una isquemia de 40 min pero no tratadas, la figura 3C al grupo de ratas tratadas con diazóxido aplicado 30 min después del fin de la isquemia y la figura 3D al grupo de ratas tratadas con diazóxido aplicado 24 horas después del fin de la isquemia. Las abreviaturas utilizadas son:

- CCG para la capa de las células ganglionares,
- 10 - CPI para la capa plexiforme interna,
- CNI para la capa nuclear interna,
- CPE para la capa plexiforme externa,
- CNE para la capa nuclear externa,
- SI para los segmentos internos,
- 15 - SE para los segmentos externos,
- EPR para epitelios pigmentarios retinianos.

## I. Materiales y métodos.

### I.1. Animales.

20 Se reciben ratas Brown Norway procedentes del criadero científico IFFA CREDO de peso comprendido entre 200 y 250 g y se ponen en jaulas individuales en una sala climatizada (temperatura comprendida entre 18 y 20 °C) con un ciclo luz-oscuridad (12h/12h). Durante el estudio, los animales tienen libre acceso a los alimentos y al agua.

### I.2. Administración local.

Se disuelve el diazóxido en una solución pura de dimetil-sulfóxido (DMSO). La solución así obtenida, se diluye en suero fisiológico estéril para obtener una solución oftálmica final al 0,01 % en principio activo y al 0,4 % en DMSO.

25 La administración local se realiza por instilación de 10 µl de la solución oftálmica en el fondo de saco conjuntival del ojo derecho, 30 minutos después del fin de la isquemia para el primer grupo y 24 horas después del principio de la reperfusión para el segundo grupo, y después cada día durante 4 días.

### I.3. Inducción de la isquemia retiniana.

30 Después de anestesia general de las ratas, por inyección intra-peritoneal de pentobarbital sódico (60 mg/kg), se dilata la pupila por instilación de una gota de Mydriaticum®. La cámara anterior del ojo derecho, previamente anestesiado por instilación de una gota de oxibuprocaina, se canula con una aguja 30G conectada a un reservorio que contiene una solución salina equilibrada de Hank (Hank's Balanced Salt Solution). La isquemia retiniana, de una duración de 40 min, es inducida por elevación del reservorio que contiene la solución salina a una altura de 185 cm que permite producir una presión intraocular de 130 mm de Hg. La isquemia se caracteriza por la desaparición del flujo sanguíneo en los vasos retinianos, determinada por oftalmoscopia directa del fondo de ojo. Se sacrifican las ratas después de un período de reperfusión de 7 días. Todas las ratas que han desarrollado una catarata o una hemorragia han sido descartadas del estudio.

## II. Modos de evaluación.

### II.1. Análisis electrofisiológico.

40 La electrorretinografía permite la evaluación de la función retiniana por la medida de la actividad eléctrica de la retina y constituye un instrumento de elección para el cribado rápido de moléculas potenciales, que permite revelar las sustancias más prometedoras en el dominio terapéutico.

45 La electrorretinografía se realiza con anestesia general de las ratas y después dilatación de la pupila por instilación de una gota de Mydriaticum®. El animal se adapta previamente durante 12 horas a la oscuridad, después se coloca sobre el flanco en una jaula de Faraday. El electrodo de medida, constituido por un anillo de cloruro de plata

(Ag/AgCl) se coloca sobre la córnea del ojo derecho. El electrodo de referencia constituido por una aguja de cloruro de plata se inserta en la oreja del animal. Todas estas operaciones se realizan bajo luz roja.

Los estímulos luminosos se producen por un estroboscopio situado a 25 cm del ojo, en el eje visual. El flash de luz blanca de una duración de 10  $\mu$ s y de una intensidad de  $2,5 \cdot 10^3$  cd.s.m<sup>-2</sup> permite una respuesta máxima de la retina. La recuperación de la señal eléctrica, su amplificación, su transmisión y su visualización sobre un micro-ordenador son administradas por un sistema compacto. Un programa integrado permite la adquisición de los datos así como la determinación de las amplitudes y de los tiempos de latencia de las diferentes ondas del electroretinograma (ERG). El ERG en la rata se compone de dos ondas; una onda córneo-negativa u onda A, que refleja la actividad de los fotorreceptores seguida de una onda de polaridad positiva u onda B, que refleja la actividad de las células de Müller.

- 5
- 10 Para el conjunto de los grupos, los ERG se registrarán al tiempo  $t = 0$  antes de la inducción de la isquemia y después a los tiempos 1, 2, 3, y 7 días después del principio de la reperfusión.

## II.2. Análisis histológico.

En el séptimo día de reperfusión, se sacrifican los animales por inyección intracardiaca de una sobredosis de pentobarbital sódico. Se enuclean los ojos, se fijan durante 2 horas en una solución de paraformaldehído al 4 %, y después se transfieren a una solución de sacarosa al 20 % durante una noche con agitación. A continuación se incluyen los ojos en Tissue-Tek, se congelan en isopentano enfriado en nitrógeno líquido, y después se conservan a -80 °C. Se realizan cortes de 7  $\mu$ m con el criostato (Leica), se montan sobre láminas polilisinadas y coloreadas con azul de toluidina para un análisis de las modificaciones morfológicas de la retina.

- 15

## II.3. Análisis estadístico.

Las amplitudes pre-isquémicas de las ondas A y B del ERG son muy variables de un grupo a otro pero también dentro de un mismo grupo. La recuperación se expresa en porcentaje del valor inicial y se analiza la diferencia de eficacia entre cada tratamiento, con ayuda de la prueba U de Mann Whitney. El umbral de significancia es de 0,02.

- 20

## III. Resultados.

### III.1. Perfiles de los electroretinogramas.

La Figura 1 compara los perfiles de los electroretinogramas registrados a los 7 días después del fin de la isquemia en las ratas testigos, isquémicas y no tratadas e isquémicas tratadas. Comparativamente, en el ERG normal del grupo control (Fig. 1A), se observa una reducción importante de la onda B pero igualmente de la onda A en el grupo isquémico no tratado (Fig. 1B). Esta reducción de la actividad eléctrica de la retina es mucho menos drástica en los grupos tratados con diazóxido (Fig. 1C-1D).

- 25

### II.2. Variaciones de la amplitud de las ondas A y B de los electroretinogramas.

La Figura 2 muestra las variaciones de la amplitud de las ondas A y B registrada a los tiempos de 24, 48, 72 y 168 horas. En las ratas testigos no isquémicas, la amplitud de las ondas A y B no cambia a lo largo del tiempo. En los otros grupos de ratas isquémicas, se observan variaciones de la amplitud de las ondas A y B a los diferentes tiempos del estudio.

- 30

Estas variaciones se caracterizan, en el grupo isquémico no tratado, por una alteración grave de la actividad eléctrica de la retina. Siete días después del principio de la reperfusión, la recuperación de la amplitud de las ondas A y B es respectivamente igual a  $40,55 \pm 13,50$  y  $31,88 \pm 18$  % de los valores basales.

- 35

A la inversa, en el grupo tratado con diazóxido al 0.01 %, 30 minutos después del principio de la reperfusión y todos los días durante 4 días, la recuperación es prácticamente total 3 días después del principio de la reperfusión. La amplitud de las ondas A y B es respectivamente igual a  $97,01 \pm 13$  y  $96,36 \pm 11$  % de los valores iniciales. Esta recuperación, se reduce ligeramente para esperar a los 7 días después del fin de la isquemia los valores respectivos de  $88,10 \pm 14$  y  $75 \pm 14$  % de los valores iniciales.

- 40

La aplicación del diazóxido, 24 horas después del principio de la reperfusión, no permite una recuperación total de la función visual de la retina a los 3 días. Sin embargo, permite una mejor recuperación de la actividad eléctrica de la retina en comparación con el grupo isquémico y no tratado. Los valores de la amplitud de las ondas A y B son respectivamente iguales a  $84,26 \pm 10$  y  $88,17 \pm 14$  % a los 3 días y a  $87,59 \pm 16$  % y  $70,59 \pm 16$  % a los 7 días.

- 45

Finalmente, en comparación con el grupo isquémico no tratado, el análisis estadístico demuestra que el diazóxido instilado 30 min o 24 horas después del fin de la isquemia tiene un efecto altamente significativo sobre la recuperación de la función retiniana.

- 50

### III.3. Citoarquitectura de la retina.

La Figura 3 muestra la citoarquitectura de la retina en los diferentes grupos. En comparación con el grupo «control» (Fig. 3A), la retina del grupo isquémico no tratado presenta una afección severa de la capa de las células ganglionares, asociada con la muerte celular y una reducción prácticamente total del espesor de la capa plexiforme interna. La capa nuclear interna, muy gravemente afectada, se caracteriza por la presencia de células dispersas en estado picnótico. En paralelo la capa de los fotorreceptores se caracteriza por una disminución del número de hileras de núcleos de las células fotorreceptoras y por una reducción del espesor de los segmentos internos y externos (Fig. 3B).

Las retinas de los grupos tratados con diazóxido (Fig. 3C y 3D) presentan una reducción menos severa del espesor de las capas plexiforme y nuclear internas, pero igualmente una mejor conservación de las capas de las células ganglionares y de las células fotorreceptoras.

#### Referencias

Ashcroft FM, Gribble FM. New windows on the mechanism of action of K(ATP) channel openers Trends Pharmacol Sci. 2000 Nov;21(11):439-45. Review.

Bernardi H, Fosset M, Lazdunski M. ATP/ADP binding sites are present in the sulfonylurea binding protein associated with brain ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Biochemistry. 1992 Jul 14;31(27):6328-32.

Celebi S, Dilsiz N, Yilmaz T, Kukner AS. Effects of melatonin, vitamin E and octreotide on lipid peroxidation during ischemia-reperfusion in the guinea pig retina. Eur J Ophthalmol. 2002 Mar-Apr;12(2):77-83

Chao HM, Osborne NN. Topically applied clonidine protects the rat retina from ischaemia/reperfusion by stimulating alpha(2)-adrenoceptors and not by an action on imidazoline receptors. Brain Res. 2001 Jun 15;904(1):126-36.

Cuevas P, Carceller F, Redondo-Horcajo M, Lozano RM, Gimenez-Gallego G. Systemic administration of acidic fibroblast growth factor ameliorates the ischemic injury of the retina in rats. Neurosci Lett. 1998 Oct 9;255(1):1-4.

Donello JE, Padillo EU, Webster ML, Wheeler LA, Gil DW. alpha(2)-Adrenoceptor agonists inhibit vitreal glutamate and aspartate accumulation and preserve retinal function after transient ischemia. J Pharmacol Exp Ther. 2001 Jan;296(1):216-23.

Duprat F, Lesage F, Patel AJ, Fink M, Romey G, Lazdunski M. The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K<sup>(+)</sup> channels TREK-1 and TRAAK. Mol Pharmacol. 2000 May;57(5):906-12.

Ettaiche M, Fillacier K, Widmann C, Heurteaux C, Lazdunski M. Riluzol improves functional recovery after ischemia in the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999 Mar;40(3):729-36.

Ettaiche M, Heurteaux C, Blondaau N, Borsotto M, Tinel N, Lazdunski M. ATP-sensitive potassium channels (K(ATP)) in retina: a key role for delayed ischemic tolerance. Brain Res. 2001 Jan 26;890(1): 118-29.

Fontaine V, Mohand-Said S, Hanoteau N, Fuchs C, Pfizenmaier K, Eisel U. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. J Neurosci. 2002 Apr 1;22(7).

Heurteaux C, Bertaina V, Widmann C, Lazdunski M K<sup>+</sup> channel openers prevent global ischemia-induced expression of c-fos, c-jun, heat shock protein, and amyloid beta-protein precursor genes and neuronal death in rat hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Oct 15;90(20):9431-5.

Osborne NN, Wood JP, Cupido A, Melena J, Chidlow G. Topical flunarizine reduces IOP and protects the retina against ischemia-excitotoxicity. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002 May;43(5):1456-641.

Seigel GM, Chiu L, Paxhia A. Inhibition of neuroretinal cell death by insulin-like growth factor-1 and its analogs. Mol Vis. 2000 Aug 31;6:157-63.

Szabo ME, Haines D, Garay E, Chiavaroli C, Farine JC, Hannaert P, Berta A, Garay RPL. Antioxidant properties of calcium dobesilate in ischemic/reperfused diabetic rat retina. Eur J Pharmacol. 2001 Oct 5;428(2):277-86.

Lagreze WA, Muller-Velten R, Feuerstein T.J. The neuroprotective properties of gabapentin-lactam. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2001 Nov;239 (11):845-9.

**REIVINDICACIONES**

1. La utilización del diazóxido (7-cloro-3-metil-2H-1,2,4-benzotiadiazina-1,1-dióxido) para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de la isquemia retiniana y/o de las lesiones generadas por la isquemia retiniana.
- 5 2. La utilización según la reivindicación 1, en la que dicho medicamento comprende de 0,001 % a 0,1 % de diazóxido.
3. La utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho medicamento comprende, además, riluzol o un derivado de éste activo en neuroprotección o una sal farmacéuticamente aceptable de éste.
- 10 4. La utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho medicamento es un medicamento para aplicación local en el ojo.
5. La utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho medicamento se presenta bajo la forma de un colirio.
- 15 6. La utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la isquemia retiniana está asociada con una enfermedad elegida en el grupo constituido por las oclusiones arteriales o venosas de la retina, las contusiones oculares y también en las patologías crónicas tales como la degeneración macular ligada a la edad (DMLA), el glaucoma, la retinopatía diabética, la retinopatía del prematuro, las enfermedades inflamatorias y las hemopatías.



Figura 1

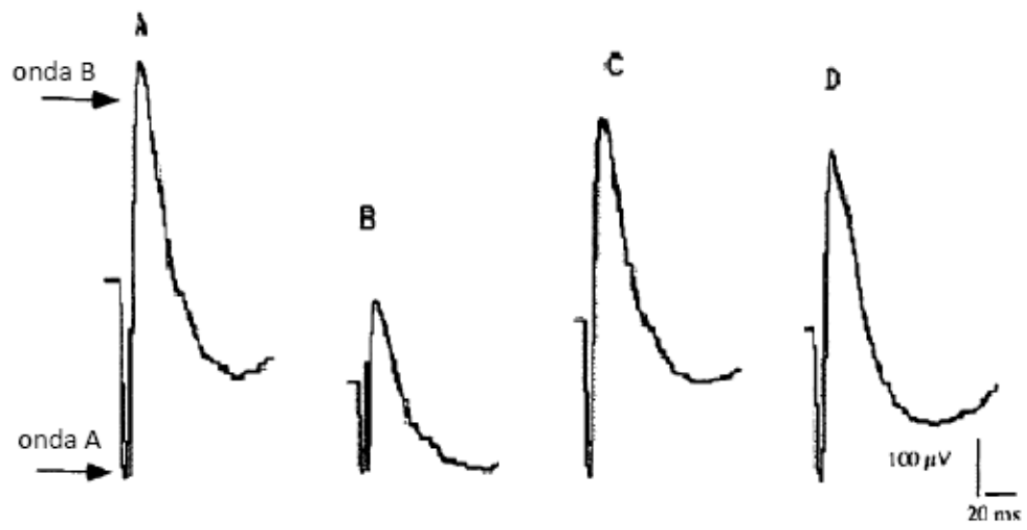
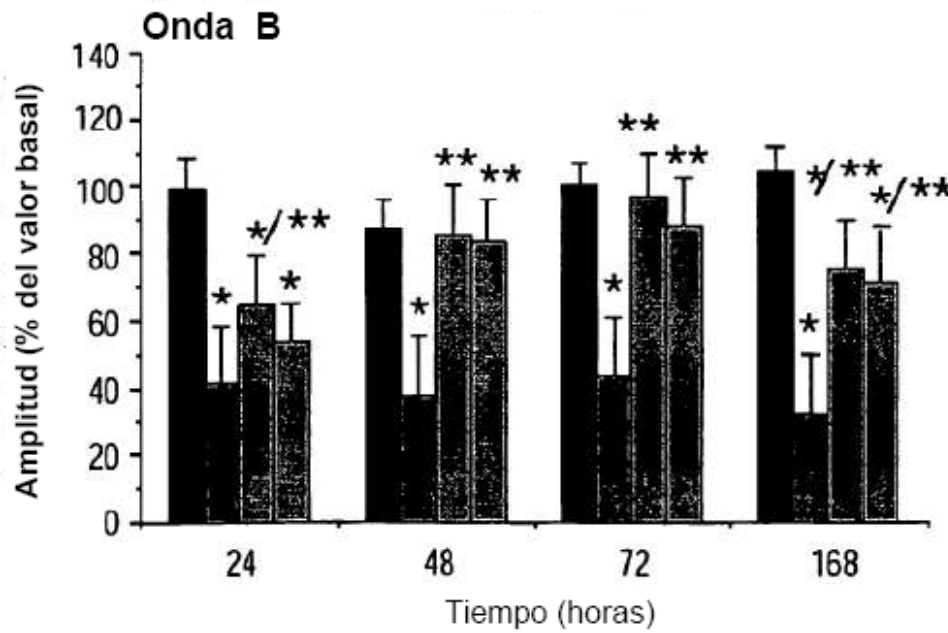
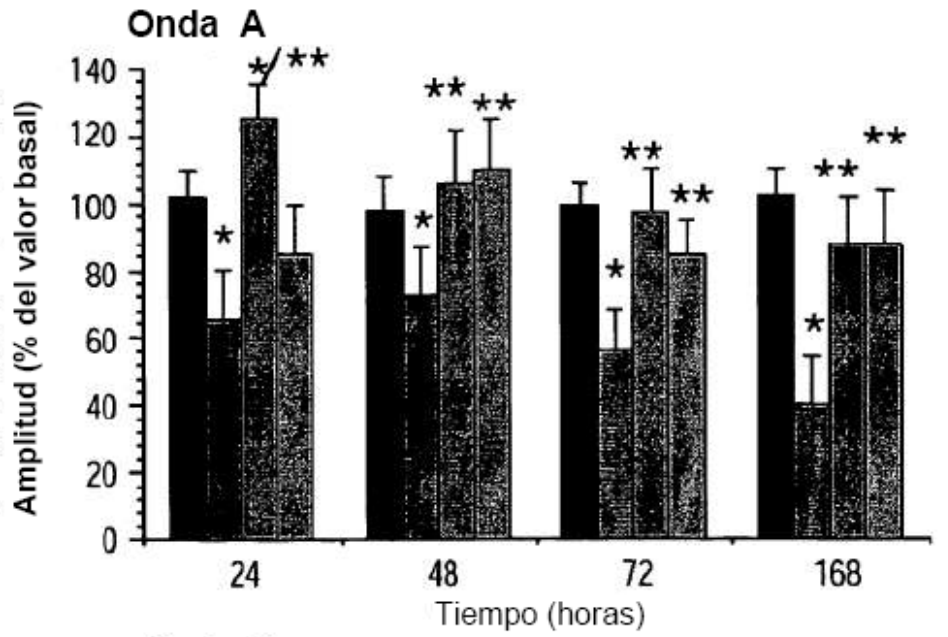


Figura 2



- Control
- Isquemia 40 min
- Diazóxido aplicado 30 min después del fin de la isquemia
- Diazóxido aplicado 24 h después del fin de la isquemia

Figura 3

