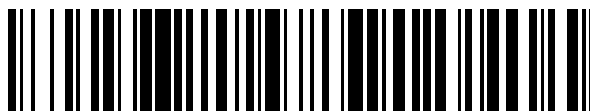


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 031**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/64 (2006.01)
A61K 31/403 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2010 PCT/EP2010/064040**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2011 WO11036202**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2010 E 10757595 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2480227**

54 Título: **Neuroprotección retiniana por inhibidores de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR**

30 Prioridad:

24.09.2009 EP 09305892

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

28.12.2018

73 Titular/es:

**ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS
(100.0%)
3 Avenue Victoria
75004 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**POLAK, MICHEL;
BERDUGO POLAK, MARIANNE;
BEHAR-COHEN, FRANCINE y
CRISANTI LASSIAZ, PATRICIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 695 031 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

Neuroprotección retiniana por inhibidores de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR

La presente invención se refiere al campo de la medicina y más particularmente al tratamiento de patologías retinianas.

5 Antecedentes tecnológicos de la invención

La retina es una membrana de aproximadamente 0,5 mm de espesor que tapiza la cara interna del ojo. Percibe una señal luminosa y la transforma en señal eléctrica gracias a la fototransducción que tiene lugar en los fotorreceptores retinianos. Esta señal eléctrica será transmitida a continuación al cerebro por medio de las células bipolares y ganglionares retinianas y luego por medio del nervio óptico. La retina es, desde un punto de vista embriológico e histológico, una prolongación del sistema nervioso central, ya que se forma durante la embriogénesis a partir de deformaciones laterales de la ampolla neural que forman las vesículas ópticas que más tarde darán lugar a las retinas. Por tanto, el ojo, y más particularmente la retina, está conectado directamente al cerebro por el nervio óptico. Este está formado por los axones de las células ganglionares retinianas que transmiten la información recogida por la retina, a lo largo de las vías ópticas, a la corteza occipital en la que se integra esta información.

15 Clínicamente, la retina es la localización de numerosas patologías, incluidas las asociadas a la isquemia retiniana, que da como resultado una degeneración celular responsable de la alteración de la función visual. Estos trastornos isquémicos se pueden observar en diversas retinopatías y neuropatías ópticas agudas, tales como oclusiones arteriales o venosas de la retina u contusiones oculares o crónicas, tales como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), glaucoma, retinopatía diabética o incluso retinopatía del prematuro. El glaucoma y la DMAE son las dos causas principales de ceguera en los países industrializados y constituyen un importante problema de salud pública.

20 Numerosos estudios han demostrado que los fenómenos de excitotoxicidad eran en parte responsables de las neuropatías retinianas isquémicas, particularmente en el caso del glaucoma (Franzco, 2006). En efecto, los trastornos isquémicos provocan una estimulación excesiva de los receptores del glutamato, un neurotransmisor excitador. Esta activación induce una sobrecarga de calcio responsable de lesiones y muerte celulares. La implicación de los receptores ionotrópicos del glutamato en la toxicidad de la isquemia ha sido confirmada por el efecto neuroprotector de sus antagonistas (Lam et al., 1997; Yoon et al., 1989; Osborne et al., 1996; Tsukahara et al., 1992). La excitotoxicidad puede ser igualmente responsable de la degeneración de las células retinianas en patologías tales como el desprendimiento de retina (Sherry and Townes-Anderson, 2000), en trastornos retinianos relacionados con patologías asociadas a un déficit vascular, tales como la retinopatía drepanocítica, o incluso en el caso de un tratamiento quirúrgico de la retina con láser (fotocoagulación).

25 Hasta la fecha, se han ensayado numerosas moléculas para tratar o prevenir las patologías asociadas a la isquemia retiniana o la excitotoxicidad retiniana, como por ejemplo los antagonistas competitivos y no competitivos de los receptores del glutamato (Lam et al., 1997; Yoon et al., 1989; Vorwerck et al., 1996); capturadores de radicales libres (Celeci et al., 2002; Szabo et al., 2001); antagonistas de los receptores adrenérgicos (Donello et al., 2001; Chao et al., 2001); factores neurotróficos (Fontaine et al., 2002) o incluso inhibidores de la liberación presináptica del glutamato.

30 Sin embargo, es susceptible que el modo de administración de algunas de estas moléculas, así como su actividad en los otros órganos generen efectos secundarios indeseables. Además, su eficacia a dosis utilizables clínicamente sigue siendo, hasta la fecha, muy insuficiente. Sigue habiendo por tanto una necesidad real de encontrar nuevos compuestos que permitan tratar y/o prevenir estas patologías.

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar nuevos compuestos que se puedan usar en el tratamiento y/o la prevención de patologías asociadas a la isquemia retiniana y/o a la excitotoxicidad retiniana.

45 El objeto de la presente invención está definido por las reivindicaciones.

La presente invención se refiere en primer lugar a un inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad receptora de sulfonilureas (abreviadamente SUR por su expresión en inglés *SulfonylUrea Receptor*) para uso en el tratamiento y/o la prevención de una patología asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana.

50 El inhibidor se selecciona del grupo constituido por glibenclamida, acetohexamida, carbutamida, glibornurida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glipizida, gliquidona, gliclopiramida, glisoxepida y glimepirida. Preferiblemente, el inhibidor es glibenclamida.

Según un modo particular de realización, el inhibidor se administra en combinación con otra sustancia activa, simultánea o secuencialmente.

55 Según un modo de realización, la patología asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana se selecciona del grupo constituido por glaucoma, neuropatías ópticas glaucomatosas sin hipertensión, degeneración macular asociada a la edad, inflamaciones intraoculares agudas o crónicas (uveítis, uveo-retinitis, coroiditis), neuropatías ópticas isquémicas o tóxicas, endoftalmitis, retinitis infecciosa, retinopatía diabética, retinopatía del

- 5 prematuro, retinopatía isquémica proliferante, retinitis pigmentarias, retinopatías asociadas a una hemoglobinopatía, foto-degeneración, desprendimiento de retina, patologías vasculares retinianas y coroideas (estenosis, trombosis y oclusiones vasculares), hemorragias retinianas y/o coroidianas y degeneraciones retinianas hereditarias o adquiridas. Preferiblemente, la patología asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana se selecciona del grupo constituido por glaucoma, degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, retinopatía isquémica proliferante y retinitis pigmentaria.
- Según un modo particular de realización, el sujeto a tratar es un ser humano, en particular un lactante, un niño o un adulto. Según otro modo de realización, el sujeto a tratar es un animal seleccionado del grupo constituido por un perro, un gato, un caballo, una vaca, una oveja, un cerdo y un primate no humano.
- 10 Según otro modo particular de realización, el inhibidor se administra por vía intravítrea, por vía subconjuntival, por vía oral, por instilación tópica, por vía periocular e intraocular o por vía parenteral. Preferiblemente, el inhibidor se administra por vía intravítrea, por vía subconjuntival, por vía oral o por instilación tópica.
- En un segundo aspecto, la presente memoria describe el uso de un inhibidor de canales iónicos regulados por la subunidad SUR para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una patología ocular asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana.
- 15 En otro aspecto, la presente memoria describe un método para tratar y/o prevenir una patología ocular asociada a una isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración a dicho sujeto de una dosis terapéuticamente eficaz de un inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR.
- 20 **Breve descripción de los dibujos**
- Figura 1:** Control negativo efectuado sin la enzima para el marcaje de final de corte de dUTP-biotina de desoxinucleotidil-transferasa terminal (abreviadamente TUNEL, por sus siglas en inglés) sobre una lámina de retina de control. (A) Marcaje de la lámina de retina con 4,6-diamidino-2-fenilindol (abreviadamente DAPI, por sus siglas en inglés). (B) Marcaje de la lámina de retina por TUNEL. (C) Fotos A y B fusionadas.
- 25 **Figura 2:** Control positivo efectuado por observación del epitelio superficial de la córnea de las retinas estudiadas, que comprende habitualmente células apoptóticas. (A) Marcaje con DAPI. (B) Marcaje TUNEL. (C) Fotos A y B fusionadas.
- Figura 3:** Degeneración de las células de la retina inducida por D-aspartato de N-metilo (abreviadamente NMDA, por sus siglas en inglés): capas de células bipolares y ganglionares. (A) Marcaje con DAPI. (B) Marcaje TUNEL. (C) Fotos A y B fusionadas.
- 30 **Figura 4:** Efecto del dimetilsulfóxido (DMSO) sobre las células de la retina con o sin inyección de NMDA. (A) Marcaje de las células después de la inyección de DMSO, con DAPI y por TUNEL. (B) Control negativo efectuado sin enzima para TUNEL. (C) Marcaje con DAPI y por TUNEL de las células de retina después de la inyección de DMSO con NMDA. (D) Marcaje con DAPI y por TUNEL de las células de retina, únicamente después de inyección de NMDA.
- 35 **Figura 5:** Histograma de los números medios de células apoptóticas por campo para cada grupo de ratas. DMSO: inyección de DMSO solo (grupo 5); NMDA + DMSO: co-inyección de NMDA y DMSO (grupo 6); NMDA: inyección de NMDA solo (grupo 4); GLI 100 ng: co-inyección de NMDA y 100 ng de glibenclamida (grupo 3); GLI 10 ng: co-inyección de NMDA y 10 ng de glibenclamida (grupo 2); GLI 1 ng: co-inyección de NMDA y 1 ng de glibenclamida (grupo 1).
- 40 **Figura 6:** Gráfico que representa el número de células apoptóticas por campo de observación del corte de retina después de inyección intravítrea de 1 ng de glibenclamida (GLI 1 ng IVT), 0,01 ng de glibenclamida (GLI 0,01 ng IVT) y de una solución de DMSO (DMSO IVT). Ensayo no paramétrico de Mann-Whitney (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).
- 45 **Figura 7:** Estructura de las capas retinianas observadas por el marcaje con DAPI. (A) Después de la co-inyección de NMDA y DMSO; (B) después de la co-inyección de NMDA y 1 ng de glibenclamida; (C) después de la co-inyección de NMDA y 0,01 ng de glibenclamida.
- Figura 8:** Gráfico que representa el número de células apoptóticas por campo de observación del corte de retina después de administración por vía oral de 10 mg/kg de glibenclamida (GLI 10 mg/kg VO) o de una solución de DMSO (DMSO VO) e inyección intravítrea de NMDA el mismo día. Ensayo no paramétrico de Mann-Whitney (* p = 0,012).
- 50 **Figura 9:** Gráfico que representa el número de células apoptóticas por campo de observación del corte de retina después de administración por vía subconjuntival de 1 ng de glibenclamida (GLI 1 ng SCJ) o de una solución de DMSO (DMSO SCJ) e inyección intravítrea de NMDA el mismo día. Ensayo no paramétrico de Mann-Whitney (** p = 0,0002).
- 55 **Figura 10:** Gráfico que representa el número de células apoptóticas por campo de observación del corte de retina después de administración por vía intravítrea de 100 µg (GLI 100 microgramos D-5) o 100 ng (GLI 100 ng D-5) de

glibenclamida o de una solución de BSS (BSS D-5) 5 días antes de la inyección intravítrea de NMDA. Ensayo no paramétrico de Mann-Whitney (***) $p < 0,0001$.

Descripción detallada de la invención

5 Los canales de potasio dependientes de ATP (K(ATP)) son hetero-octómeros formados por 4 subunidades de canales de K^+ de rectificación interna (abreviadamente Kir6.x, por su expresión en inglés *Inwardly rectifying K⁺ channel*) que delimitan el propio canal iónico y 4 subunidades reguladoras SUR (receptor de sulfonilureas). Estos canales están presentes en numerosos tipos de células, especialmente en las células pancreáticas y las células neuronales en forma Kir6.x/SUR1.

10 En las células pancreáticas, los canales Kir6.2/SUR1 están implicados en la regulación glicémica. La hiperglicemia en la sangre provoca un aumento de la utilización de glucosa por las células beta pancreáticas, lo que ocasiona un aumento de la producción de ATP y una disminución de la relación ADP/ATP en la célula. La disminución de esta relación induce el cierre del canal K(ATP) Kir6.2/SUR1 que conduce a una despolarización celular. Esta induce la apertura del canal de Ca^{2+} dependiente del voltaje, el aumento del Ca^{2+} intracelular y, finalmente, la liberación de insulina.

15 Las sulfonilureas y las meglitinidas son agentes hipoglicemiantes utilizados en el tratamiento de la diabetes. Se unen a la subunidad SUR de los canales Kir6.2/SUR1 y bloquean su apertura lo que provoca un aumento de la liberación de insulina.

20 Los canales Kir6.x/SUR1 están igualmente presentes en el cerebro (Liss et al., 2001) donde contribuyen a la protección del sistema nervioso central (SNC) contra la isquemia. En efecto, la activación de estos canales se induce durante un estado metabólico que genera un agotamiento del ATP, tal como hipoxia, y permite disminuir el consumo de energía. Sin embargo, se ha demostrado igualmente la participación de estos canales en el edema cerebral consecuencia de una isquemia y el uso de sulfonilureas ha permitido observar el efecto neuroprotector de estos compuestos en un modelo de isquemia cerebral *in vitro* (Nistico et al., 2007).

25 Se ha demostrado igualmente que la subunidad reguladora SUR1 estaba sobreexpresada durante las lesiones del SNC, principalmente en el curso de ciertas isquemias cerebrales. Esta sobreexpresión está correlacionada con la expresión del canal del catión calcio no selectivo dependiente de ATP (NC_{Ca-ATP}) del cual SUR1 constituye igualmente la subunidad reguladora. En cambio, no parece correlacionada con la expresión del canal Kir6.2/SUR1 (Simard et al., 2006). El canal NC_{Ca-ATP} no se expresa de manera constitutiva en el SNC, sino únicamente durante lesiones neuronales o episodios isquémicos. La administración de sulfonilureas durante una isquemia cerebral permite, por su unión con SUR1, reducir a la mitad la tasa de mortalidad de los pacientes, pero igualmente reducir la extensión de las lesiones (Simard et al., 2008; WO 2008/089103).

En cambio, la acción neuroprotectora de las sulfonilureas como inhibidores de los canales iónicos, nunca se ha demostrado en otros tejidos distintos al sistema nervioso central.

35 En la presente solicitud, los inventores han demostrado que la administración de un inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR permitió tratar o prevenir patologías retinianas asociadas a la isquemia o a fenómenos de excitotoxicidad retiniana o miopía. Igualmente demostraron, en un modelo *in vivo* de degeneración retiniana, que estos inhibidores presentaban un efecto neuroprotector retiniano y que su uso permitía disminuir las lesiones retinianas provocadas por la administración de una excitotoxina, tal como el D-aspartato de N-metilo (NMDA). Los inventores han demostrado además que estos inhibidores podían ser administrados eficazmente por diferentes vías, principalmente por vía intravítrea, oral o subconjuntival, y que estaban totalmente desprovistos de toxicidad para las células de la retina, y eso, incluso administrados en altas dosis.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR para utilización en el tratamiento y/o prevención de una patología ocular asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana.

45 En la presente memoria, el término «inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR» se refiere a un compuesto capaz de bloquear la apertura de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR y, por tanto, capaz de bloquear el flujo de iones a través de la membrana celular, uniéndose a una subunidad de dichos canales. Los canales iónicos regulados por la subunidad SUR comprenden, por ejemplo, los canales de potasio Kir6.2/SUR1, los canales de catión calcio no selectivos dependientes de ATP (NC_{Ca-ATP}) y cualquier canal que permita la conductancia iónica, acoplado a la subunidad SUR1 o SUR2 (A o B).

50 Según un aspecto descrito en la presente memoria, el inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR es un ligando de la subunidad SUR. Preferiblemente, la subunidad SUR se selecciona del grupo que consiste en SUR1 (GeneID: 6833), SUR2A y SUR2B (GeneID: 10060, ambos codificados por el gen ABCC9 (casete de unión a ATP, subfamilia C (CFTR/MRP), miembro 9, también denominado ABC37, CMD10, FLJ36852, SUR2) y procedente de un empalme alternativo). De una manera particularmente preferida, la subunidad SUR es la subunidad SUR1.

Según un aspecto descrito en la presente memoria, el inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR se selecciona de un grupo constituido por sulfonilureas y meglitinidas (o glinidas), y una cualquiera de sus combinaciones.

Las sulfonilureas que pueden ser utilizadas según la presente descripción comprenden, como ejemplo y de manera no limitativa, glibenclamida (o gliburida), acetohexamida, carbutamida, glibornurida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glipizida, gliclazida, gliquidona, gliciclopiramida, glisoxepida o glimepirida.

5 Las meglitinidas que pueden ser utilizadas según la presente descripción comprenden, como ejemplo y de forma no limitativa, repaglinida, nateglinida o mitiglinida.

El inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR es una sulfonilurea seleccionada del grupo constituido por glibenclamida, acetohexamida, carbutamida, glibornurida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glipizida, gliquidona, gliciclopiramida, glisoxepida o glimepirida. De manera particularmente preferida, el inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR es glibenclamida.

10 El inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR se puede usar solo o en combinación con uno u otros varios inhibidores de dichos canales.

El inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR puede ser utilizado igualmente en combinación con una u otras varias sustancias activas. El inhibidor y dicha o dichas sustancias activas se pueden administrar simultánea o secuencialmente. Estas sustancias se pueden elegir principalmente de forma que supriman o limiten la hipoglicemia provocada por la administración sistémica de agentes hipoglicemiantes, tales como sulfonilureas o meglitinidas, como por ejemplo glucosa o glucagón. Se pueden seleccionar igualmente con el fin de que aumenten el efecto neuroprotector de la composición administrada. En este caso, estas sustancias se pueden elegir entre las diferentes sustancias conocidas por su actividad de neuroprotección, tales como por ejemplo, dizocilpina, memantina, riluzol, amantadina, dextrometorfano, dextrorfano, lacosamida, aptiganel, brimonidina y otros agonistas α 2-adrenérgicos, diltiazem, sirtuinas y sus activadores, tales como resverastrol, rapamicina y sus análogos, agentes dopaminérgicos, anti-inflamatorios esteroideos y no esteroideos, en particular el ácido acetilsalicílico, los factores de crecimiento denominados *insulin-like*, en particular insulina, IGF-1, IGF-2, hormona del crecimiento y sus análogos, estrógeno y progesterona y sus análogos, estatinas, factores neurotróficos, en particular NGF, PEDF, GDNF, CNTF, VEGF, sus análogos y sus activadores, agentes antioxidantes captadores de radicales libres o incluso células madre y células estromales de médula ósea. Alternativamente, estas sustancias se pueden elegir entre las diferentes sustancias que se sabe que tienen propiedades anti-isquémicas o anti-excitotóxicas, tales como por ejemplo, dizocilpina (MK 801), magnesio, dextrometorfano, flupirtina, memantina, ketamina, SOD/catalasa, lazaralde, dimetilourea, diosmina/hesperidina, melatonina, vitamina E, ácido lipoico, deferoxamina, ibuprofeno, L-NMMA, L-NNA, aminoguanidina, L-NAME, flunarizina, gangliósido, betaxolol, genisteína e ifenprodil.

30 El inhibidor según la invención se puede administrar igualmente en combinación con una o varias sustancias seleccionadas del grupo constituido por bloqueadores beta (por ejemplo, timolol), agonistas alfa-2 adrenérgicos (por ejemplo, brimonidina), análogos de la prostaglandina F2 alfa (por ejemplo, latanoprost), prostamidas (por ejemplo, bimatoprost), inhibidores de la anhidrasa carbónica por vía local y/o general (por ejemplo, dorzolamina o acetazolamida), adrenalina y compuestos adrenalínicos, antimetabolitos, tales como mitomicina C, 5-fluorouracilo o 5-clorouracilo, talidomida, inhibidores de los factores de crecimiento FGF, VEGF, PGF o sus receptores, inhibidores de IGF (*insulin-like growth factor*), de IRS-1 o de IRS-2, inhibidores de metaloproteinasas, corticosteroides o derivados, anti-inflamatorios no esteroideos, inhibidores de integrinas α β 3 y α β 5, inhibidores de la angiopoyetina, estatinas (por ejemplo, endostatina, angiostatina, octreótido), carboxiamidotriazol, estradiol y sus derivados, trombospondinas, agentes parasimpaticolíticos, agentes simpatomiméticos, sulfadiazina, pirimetamina, ácido fólico, agentes anti-infecciosos o agentes antiparasitarios (por ejemplo, hidroxinaftoquinonas), vancomicina, amikacina, ceftazidima, gentamicina, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (por ejemplo, candesartán) o inhibidores o activadores de las proteínas quinasas C, carbógeno y activador tisular del plasminógeno.

45 El inhibidor según la invención se puede administrar igualmente en combinación con una o varias sustancias usadas para tratar la hipertensión ocular, tales como bloqueadores beta (por ejemplo, timolol), agonistas alfa-2 adrenérgicos (por ejemplo, brimonidina), análogos de las prostaglandinas F2 alfa (por ejemplo, latanoprost), prostamidas (por ejemplo, bimatoprost), inhibidores de la anhidrasa carbónica por vía local y/o general (por ejemplo, dorzolamina o acetazolamida), adrenalina y compuestos adrenalínicos. El inhibidor según la invención se puede administrar igualmente a pacientes tratados por hipertensión ocular por medios quirúrgicos, tales como trabeculectomía o esclerectomía profunda, trabeculoplastia con láser, tratamiento con ultrasonidos o criocirugía. El inhibidor según la invención se puede administrar igualmente en combinación con antimetabolitos, tales como mitomicina C, 5-fluorouracilo o 5-clorouracilo.

55 El inhibidor según la invención se puede administrar igualmente en combinación con una o varias sustancias usadas para tratar o inhibir la neovascularización, tales como talidomida, inhibidores de los factores de crecimiento FGF, VEGF, PGF o de sus receptores, inhibidores de IGF (*insulin-like growth factor*), de IRS-1 o de IRS-2, inhibidores de metaloproteinasas, corticosteroides o derivados, anti-inflamatorios no esteroideos, inhibidores de integrina α β 3 y α β 5, inhibidores de angiopoyetina, estatinas (por ejemplo, endostatina, angiostatina, octreótido), carboxiamidotriazol, estradiol y sus derivados, y trombospondinas. El inhibidor según la invención se puede administrar igualmente a pacientes sometidos a un tratamiento quirúrgico para inhibir la neovascularización, tal como tratamiento con láser, fototerapia dinámica, cirugía, radioterapia o termoterapia transpupilar.

60

El inhibidor según la invención se puede utilizar igualmente en el tratamiento de la uveítis en combinación con una o varias sustancias utilizadas para tratar la uveítis. En particular, se puede utilizar en combinación con corticoides, agentes anti-inflamatorios no esteroideos, agentes parasimpaticolíticos o agentes simpatomiméticos.

5 El inhibidor según la invención se puede utilizar igualmente en el tratamiento de las retinocoroiditis en combinación con una o varias sustancias utilizadas para tratar estas patologías, tales como corticoides, sulfadiazina, pirimetamina, ácido fólico, agentes anti-infecciosos o agentes antiparasitarios (por ejemplo, hidroxinaftoquinonas).

El inhibidor según la invención se puede utilizar igualmente en el tratamiento de la endoftalmítis en combinación con una o varias sustancias utilizadas para tratar esta patología, tales como vancomicina, amikacina, ceftazidima, gentamicina o corticoides. Se puede administrar igualmente a pacientes sometidos a una vitrectomía.

10 El inhibidor según la invención se puede administrar igualmente a pacientes sometidos a un tratamiento quirúrgico para tratar la retinopatía diabética, tal como un tratamiento de neovascularizaciones, fotocoagulación con láser del edema macular diabético, vitrectomía o colocación de implantes intravítreos de corticoides. Se puede utilizar igualmente en combinación con una o varias sustancias utilizadas para tratar la retinopatía diabética, tales como, por ejemplo, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (por ejemplo, candesartán) o inhibidores o activadores de las proteínas quinasas C.

El inhibidor según la invención se puede administrar igualmente a pacientes sometidos a un tratamiento quirúrgico para tratar la retinopatía del prematuro, tal como tratamiento con láser, crioterapia, vitrectomía o plegamiento escleral. Se puede utilizar igualmente en combinación con una o varias sustancias utilizadas para tratar la retinopatía del prematuro, tales como por ejemplo agentes anti-inflamatorios no esteroideos.

20 El inhibidor según la invención se puede administrar igualmente a pacientes sometidos a un tratamiento quirúrgico para tratar estenosis, oclusiones y trombosis retinianas, tales como punción de la cámara anterior, endarterectomía carotídea o un tratamiento de las neovascularizaciones. Se puede utilizar igualmente en combinación con una o varias sustancias utilizadas para tratar estenosis, oclusiones y trombosis, tales como corticoides o carbógeno.

25 El inhibidor según la invención se puede administrar igualmente a pacientes sometidos a un tratamiento quirúrgico para tratar hemorragias retino-coroideas, tal como inyección de gas de tamponamiento (por ejemplo, perfluorocarbono). Se puede utilizar igualmente en combinación con una o varias sustancias utilizadas para tratar hemorragias retino-coroideas, tales como el activador tisular del plasminógeno (tPA).

El inhibidor según la invención se puede utilizar igualmente en combinación con una terapia génica de las retinitis pigmentarias.

30 Cuando el inhibidor según la invención se administra a pacientes sometidos a un tratamiento quirúrgico, se puede administrar antes, durante o después del tratamiento quirúrgico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término «tratamiento» se refiere a cualquier acto que permita disminuir, suprimir o retardar los síntomas asociados a una patología. El término «prevención» se refiere a cualquier acción para prevenir la aparición de síntomas asociados a una patología. Más particularmente, el término «tratamiento de una patología ocular asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana» se refiere a cualquier acto que permita disminuir, suprimir o retardar la degeneración de las células retinianas. El término «prevención de una patología ocular asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana» se refiere a cualquier acción destinada a prevenir la aparición del fenómeno de degeneración de las células retinianas.

40 El término «patología ocular asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana», tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier estado patológico que implique una lesión retiniana generada por un fenómeno de isquemia y/o de excitotoxicidad. Estas patologías comprenden, como ejemplo y sin limitación, glaucoma, neuropatías ópticas glaucomatosas sin hipertensión (tales como glaucoma a presión normal), degeneración macular asociada a la edad, inflamaciones intraoculares agudas o crónicas (uveítis, uveo-retinitis, coroiditis), neuropatías ópticas isquémicas o tóxicas, endoftalmítis, retinitis infecciosas, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, retinopatía isquémica proliferante, retinitis pigmentarias, retinopatías asociadas a una hemoglobinopatía, tal como drepanocitosis o talasemia, una fotodegeneración o incluso desprendimiento de retina, patologías vasculares retinianas y coroideas (estenosis, trombosis y oclusiones), hemorragias retinianas y/o coroideas, miopía o incluso degeneraciones retinianas hereditarias o adquiridas.

50 Estas patologías oculares pueden provenir igualmente de los efectos secundarios de ciertos tratamientos oftálmicos, principalmente cirugías oculares, fotocoagulación, fototerapia dinámica, termoterapia transpupilar, inyección intraocular de gas, de la administración de ciertos medicamentos, tales como, por ejemplo, interferones, corticosteroides, antiangiogénicos, agentes vasoconstrictores o de las quimioterapias o incluso de tratamientos radioterapéuticos. Con el fin de prevenir estas patologías, el inhibidor según la invención se puede administrar previa y/o simultáneamente y/o posteriormente al tratamiento terapéutico susceptible de provocar una lesión retiniana.

55 Ciertas patologías oculares que implican una degeneración de las células retinianas provocada por un fenómeno de isquemia o excitotoxicidad pueden igualmente tener su origen en patologías arteriales, venosas o microvasculares, en anomalías hematológicas o en hemorragias o infartos.

Según un modo particular de realización, la patología asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana se selecciona del grupo constituido por glaucoma, neuropatías ópticas glaucomatosas sin hipertensión, degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, retinopatía isquémica proliferante y una retinitis pigmentaria.

5 Según otro modo particular de realización, la patología asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana se selecciona del grupo constituido por neuropatías ópticas glaucomatosas sin hipertensión, inflamaciones intraoculares agudas o crónicas (uveítis, uveo-retinitis, coroiditis), neuropatías ópticas isquémicas o tóxicas, endoftalmitis, retinitis infecciosas, retinopatía del prematuro, retinitis pigmentarias, retinopatías asociadas a una hemoglobinopatía, tal como drepanocitosis o talasemia, una fotodegeneración o incluso desprendimiento de retina, patologías vasculares retinianas y coroideas (estenosis, trombosis y oclusiones), hemorragias retinianas y/o coroideas, o incluso degeneraciones retinianas hereditarias o adquiridas.

10 Según otro modo particular de realización, la patología asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana se selecciona del grupo constituido por glaucoma a presión normal, uveítis, uveo-retinitis, coroiditis, retinitis infecciosas, retinopatía del prematuro, retinitis pigmentarias, retinopatías asociadas a la drepanocitosis o talasemia, y hemorragias retinianas y/o coroideas.

15 Según otro modo de realización particular, la patología asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana es la miopía.

Según un modo de realización preferido, la patología asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana es el glaucoma o la retinopatía diabética. Según un modo de realización particularmente preferido, la patología asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana es el glaucoma.

20 Según un aspecto descrito en la presente memoria, la patología asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana es la retinopatía diabética y el inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR se selecciona del grupo constituido por glibenclamida, acetohexamida, carbutamida, glibornurida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glipizida, gliquidona, glicopiramide, glisoxepida, glimepirida, repaglinida, nateglinida y mitiglinida, y una cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente, el inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR es glibenclamida.

25 El sujeto a tratar, o paciente, es un animal, preferiblemente un mamífero. Según un modo de realización, el sujeto a tratar es un animal seleccionado del grupo constituido por un perro, un gato, un caballo, una vaca, una oveja, un cerdo y un primate no humano. Según un modo de realización preferido, el sujeto a tratar es un ser humano seleccionado del grupo constituido por un lactante, un niño y un adulto.

30 El inhibidor utilizado según la invención se administra al paciente en forma de una composición farmacéutica que comprende al menos un inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados son bien conocidos por los expertos en la técnica (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). La composición farmacéutica que comprende el inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, polímeros, nanopartículas, microesferas, supositorios, enemas, geles, pastas, ungüentos, cremas, emplastos, pociones, inyectables, implantes, pulverizaciones o aerosoles.

35 El inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR utilizado según la presente invención se puede administrar por vía oral, sublingual, cutánea, subcutánea, intramuscular, intravenosa, parenteral, tópica, local, intratraqueal, intranasal, transdérmica, rectal, intravítrea, intracamerular, subretiniana, supracoroidea, intraocular, periocular, subconjuntival o intraauricular. Preferiblemente, el inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR se administra por vía intravítrea, subconjuntival u oral o por instilación tópica. El compuesto se puede utilizar igualmente como agente de irrigación durante la cirugía vitreoretiniana o como adyuvante de una cirugía intraocular. Eventualmente, se puede administrar conjuntamente con un agente de tamponamiento interno degradable o no degradable.

40 El inhibidor según la invención se administra al paciente a una dosis terapéuticamente eficaz. El término «dosis terapéuticamente eficaz», tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la cantidad de inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR necesaria para observar una actividad terapéutica o preventiva en una patología ocular asociada a una isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana. La cantidad de inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR que debe administrarse, así como la duración del tratamiento, son evaluados por los expertos en la técnica según el estado fisiológico del sujeto a tratar, la patología a tratar o prevenir, el inhibidor elegido y la vía de administración utilizada. El inhibidor según la invención se puede administrar en forma de una dosis única o de dosis múltiples.

45 Según un modo de realización de la invención, el inhibidor se administra al paciente por vía intravítrea en forma de una composición farmacéutica que comprende entre 0,01 pg y 100 µg de inhibidor por unidad de dosis,

preferiblemente entre 0,01 ng y 1000 ng de inhibidor, y de manera particularmente preferida entre 0,01 ng y 100 ng de inhibidor.

5 Según otro modo de realización, el inhibidor se administra al paciente por vía oral en forma de una composición farmacéutica que comprende entre 0,001 mg y 150 mg de inhibidor por kilogramo de peso corporal por unidad de dosis, preferiblemente entre 0,01 mg y 150 mg de inhibidor por kilogramo de peso corporal, y de manera particularmente preferida entre 5 y 15 mg de inhibidor por kilogramo de peso corporal. Incluso según otro modo de realización, el inhibidor se administra al paciente por vía subconjuntival en forma de una composición farmacéutica que comprende entre 0,1 pg y 1000 ng de inhibidor por unidad de dosis, preferiblemente entre 0,1 ng y 100 ng de inhibidor, y de manera particularmente preferida entre 1 ng y 100 ng de inhibidor.

10 Según un modo de realización particular, el inhibidor se administra al paciente por vía intravítrea en forma de una composición farmacéutica que comprende entre 0,1 pg y 1 pg de inhibidor por unidad de dosis, de una a 4 veces al mes. Preferiblemente, el compuesto se formula en un sistema de liberación prolongada que permite su inyección cada 4 a 8 semanas. De manera particularmente preferida, el compuesto se formula en un sistema de liberación prolongada que permite su inyección de dos a cuatro veces al año.

15 La presente memoria describe igualmente la utilización de un inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de una patología ocular asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana.

20 La presente memoria describe además un método de tratamiento y/o prevención de una patología ocular asociada a una isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR de dicho sujeto. Según un aspecto, el sujeto a tratar es un animal seleccionado del grupo constituido por un perro, un gato, un caballo, una vaca, una oveja, un cerdo y un primate no humano. Según un aspecto preferido, el sujeto a tratar es un ser humano.

25 Otras características y ventajas de la invención aparecerán mejor con la lectura de los ejemplos siguientes dados a título ilustrativo y no limitativo.

Ejemplos

Material y métodos

Modelo de degeneración retiniana inducida por el NMDA en la rata

30 Para inducir una neurodegeneración retiniana, los inventores inyectaron en el cuerpo vítreo de ratas D-aspartato de N-metilo (NMDA), modelo conocido de excitotoxicidad retiniana durante el cual el NMDA, análogo sintético del glutamato, contribuye a la muerte celular (Crisanti et al., 2006). Presente en cantidad demasiado grande, el NMDA hiperactiva los receptores excitadores neuronales (receptores de NMDA) que se vuelven permeables al calcio. La inyección de NMDA provoca un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} . El calcio intracelular activa enzimas (fosfolipasas C, endonucleasas, proteasas) que degradan las estructuras celulares y conducen a la apoptosis.

Animales

Se utilizaron ratas Wistar machos de 8 semanas que pesaban 320 a 350 g. Las ratas se mantuvieron en un animalario estándar con un ciclo de luz de 12 horas día/12 horas noche, a una temperatura de 21°C +/- 1°C y una humedad de 55 +/- 5%.

Anestésias

Las ratas se anestesiaron con una inyección intramuscular de pentobarbital sódico (30 mg/kg, CEVA Santé Animale). Se obtuvo una anestesia local de los ojos por instilación de Tétracaïne© (colirio, 1X, unidosis de 0,4 mL, laboratorio TVM, Lempdes, Francia).

Cortes en congelación

45 Se colocaron ojos enucleados de ratas en moldes «cúbicos» rellenos con un gel de recubrimiento (Tissue Teck© OCT - *Optimal Cutting Temperature*) que permite congelar los ojos a -80°C cuando el conjunto del dispositivo se sumerge en nitrógeno líquido. Estos moldes permiten obtener bloques de forma cúbica con el fin de obtener luego cortes netos evitando movimientos involuntarios de los globos oculares que podrían alterar la disposición de los tejidos que forman el ojo.

50 Los cortes se realizaron a -20°C y medían 10 µm de espesor. Estos cortes se colocaron sobre láminas previamente gelatinizadas para permitir su adherencia.

Método TUNEL

(Tunel = *TdT mediated dUTP-biotin Nick End Labeling*; TdT = *Terminal deoxynucleotidyl Transferase*)

Esta técnica se utiliza para detectar las células apoptóticas. Se basa en el hecho de que la apoptosis está acompañada por una fragmentación del ADN. La enzima TdT permite añadir un nucleótido marcado a los extremos 3'-OH resultantes de la fragmentación del ADN. La señal es luego amplificada por una peroxidasa.

5 Los cortes de retinas fueron permeabilizados por incubación en una solución de Triton X100 (0,3%) durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego se incubaron a 37°C durante 1 hora con 50 µL por lámina de mezcla de reacción TUNEL (mezcla obtenido con 40 µL de enzima de TUNEL y 360 µL de marcador TUNEL, conteniendo la solución nucleótidos acoplados a FITC).

10 Los cortes se lavaron cinco veces con PBS 1X y una vez con agua destilada, se montaron sobre láminas y se observaron con un microscopio de fluorescencia (para TUNEL-FITC: excitación a 488 nm y emisión a 520 nm; para DAPI: excitación a 372 nm y emisión a 456 nm).

15 La cantidad de muerte celular por apoptosis y el tipo de células involucradas se evaluaron por el número y la localización intra-retiniana de los núcleos positivos en el método TUNEL. Para cada ojo, se utilizaron para recuento de las células apoptóticas, cuatro cortes completos de retina, tomados en los mismos sectores del ojo. El número total de células apoptóticas por retina se relacionó con el número de campos contados (por tanto, con la longitud retiniana que varía de un lugar a otro de la retina). La media de estos números por campo se calculó para un corte completo de retina (formado por 7 a 14 campos); y estas medias, calculadas para los diferentes grupos de tratamiento, se compararon entre sí utilizando el ensayo no paramétrico de Mann Whitney. Las diferencias en las que p es $<0,05$ son consideradas significativas.

Ejemplo 1: efecto de la glibenclamida sobre la degeneración retiniana inducida por NMDA

20 *Protocolo experimental*

La utilización de dimetilsulfóxido (DMSO) es necesaria en la solubilización de glibenclamida. Con el fin de reducir el número de inyecciones intravítreas, el NMDA y la glibenclamida (5 g, MPBIO® Europe, Illkirch, Francia) previamente disueltos en DMSO, se inyectaron conjuntamente en una misma solución, después de haber verificado la ausencia de precipitación de la mezcla en las concentraciones utilizadas. Se utilizó DMSO a la concentración mínima necesaria para la disolución de la glibenclamida (260 mM).

25 Se prepararon tres soluciones de glibenclamida que comprendían 1, 10 o 100 ng de glibenclamida por 3 µL de solución. Para ello, se diluyó una solución madre que comprendía 9 mg de glibenclamida en polvo disuelta en 900 µL de DMSO (concentración de 10 µg/µL de glibenclamida) en PBS 1X con el fin de obtener las concentraciones deseadas.

30 Según el protocolo experimental presentado a continuación, en los grupos de ensayo, se inyectaron conjuntamente glibenclamida y NMDA mezclando 3 µL de solución de glibenclamida (que comprendía 1, 10 o 100 ng de glibenclamida) y 3 µL de solución de NMDA 90 nM (es decir, una concentración final en la solución inyectada de NMDA de 45 nM).

El protocolo experimental comprendía seis grupos de ratas, tales como se definen a continuación

35 Grupo 1: (n = 2, 4 ojos), inyección de una solución de 6 µL que contenía NMDA 45 nM, 1 ng de glibenclamida y DMSO 260 mM.

Grupo 2: (n = 2, 4 ojos), inyección de una solución de 6 µL que contenía NMDA 45 nM, 10 ng de glibenclamida y DMSO 260 mM.

40 Grupo 3: (n = 2, 4 ojos), inyección de una solución de 6 µL que contenía NMDA 45 nM, 100 ng de glibenclamida y DMSO 260 mM.

Grupo 4: (n = 2, 4 ojos), inyección de una solución de 6 µL que contenía únicamente NMDA 45 nM en tampón de PBS 1X (grupo de control).

Grupo 5: (n = 2, 4 ojos), inyección de una solución de 6 µL que contenía únicamente DMSO 260 mM en un tampón de PBS 1X (grupo de control).

45 Grupo 6: (n = 2, 4 ojos), inyección de una solución de 6 µL que contenía NMDA 45 nM y DMSO 260 mM (grupo de control).

50 24 horas después de las inyecciones intravítreas, las ratas se sacrificaron por inhalación de CO₂ (1 minuto). Los ojos se enuclearon inmediatamente y se limpiaron brevemente con PBS 1X antes de ser perforados con una aguja 20G para hacer que penetre el paraformaldehído. La fijación del ojo se realizó durante 1 noche a 4°C en paraformaldehído al 4% diluido en PBS 1X. Después de la fijación, los ojos se sumergieron a continuación en una solución que contenía 20% de sacarosa diluida en PBS 1X, hasta flotación (es decir, aproximadamente 2 horas). Esta etapa tiene por objeto prevenir las alteraciones de los tejidos provocadas por la congelación brusca.

55 A continuación, se sometieron los ojos a una etapa de inclusión en OCT, una etapa de corte en congelación en un criostato (10 µm de espesor) y una etapa de marcaje de los cortes por el método TUNEL para revelar la muerte celular por apoptosis.

*Validación de los métodos***Control negativo y control positivo de los experimentos**

5 El control negativo fue proporcionado por una lámina de retina procedente de una rata del grupo de control «NMDA + DMSO» (grupo 6), sobre la que no se había depositado enzima de TUNEL durante la preparación de las láminas en el método TUNEL (sino solo la solución de marcaje TUNEL). La ausencia de núcleos (marcados con DAPI), TUNEL positivo, y por tanto apoptóticos, valida los experimentos (Fig. 1).

10 El control positivo permite verificar que el método TUNEL ha funcionado bien. Las células superficiales del epitelio corneal de cada corte, entre las cuales están siempre presentes células apoptóticas (células descamantes), se utilizaron como control positivo. El marcaje TUNEL positivo (Fig. 2B) está bien correlacionado con los núcleos del epitelio corneal (Fig. 2A), se trata por tanto de núcleos de células apoptóticas marcados. El método TUNEL está así validado.

Degeneración de células retinianas inducida por NMDA

15 24 horas después de la inyección intravítrea de NMDA (ratas del grupo 4), son visibles numerosas células TUNEL positivo en la capa nuclear interna (Figura 3B y C). El NMDA deteriora la retina desde la superficie hasta la profundidad, lo que demuestra el estado avanzado de la degeneración de la retina inducida por el NMDA.

Efecto del DMSO sobre las células retinianas (sanas o en degeneración)

20 El marcaje TUNEL efectuado después del tratamiento con DMSO solo (ratas del grupo 5) es similar al marcaje de los controles negativos, demostrando la ausencia de toxicidad del DMSO sobre las células sanas de retinas a la concentración del experimento (Figura 4A y B).

Los marcajes TUNEL efectuados después del tratamiento con DMSO y NMDA (ratas del grupo 6) y después del tratamiento con NMDA solo (ratas del grupo 4) muestran una cantidad equivalente de células apoptóticas (Figura 4C y D).

Estos resultados demuestran la ausencia de efecto tóxico o beneficioso del DMSO sobre la neurodegeneración inducida por NMDA.

Resultados

25 Los cortes de retina obtenidos de los 6 grupos de ratas y marcados con DAPI y por TUNEL se observaron con un microscopio y se determinó el número medio de células apoptóticas (es decir, TUNEL positivo) por campo para cada grupo. Este resultado se muestra en el histograma de la Figura 5.

30 Estos resultados ilustran ante todo la ausencia de efecto tóxico o beneficio del DMSO y la degeneración efectiva de las células retinianas inducida por NMDA.

Las cantidades de células apoptóticas observadas en los grupos que se han beneficiado de una inyección simultánea de glibenclamida y NMDA disminuyen de 82 a 86% con relación a la cantidad de células apoptóticas observadas en los grupos sometidos a una inyección de NMDA en presencia de DMSO.

35 Estos resultados demuestran por tanto que la inyección de glibenclamida permite disminuir significativamente la degeneración de las células retinianas inducida por el NMDA.

Ejemplo 2: efecto de la glibenclamida sobre la degeneración retiniana según las diferentes vías de administración*Protocolo experimental*

40 Se utilizaron 8 grupos de 2 ratas. Se administró un tratamiento idéntico a los dos ojos de cada animal. Se ensayaron tres vías de administración de glibenclamida, la vía intravítrea (inyección de 1 ng o 0,01 ng en cada ojo), la vía oral (10 mg/kg de peso corporal de glibenclamida) y la vía subconjuntival (inyección de 1 ng de glibenclamida en cada ojo).

45 La solución madre de glibenclamida para inyecciones intravítreas y subconjuntivales se obtuvo diluyendo 4,5 mg de glibenclamida en 300 μ L de DMSO puro. Esta solución se congeló a continuación. Las soluciones de glibenclamida a diferentes concentraciones para las inyecciones intravítreas y subconjuntivales se obtuvieron por diluciones extemporáneas en un tampón BSS® (Alcon Laboratories).

Las soluciones de glibenclamida para administración oral (10 mg/kg) se obtuvieron disolviendo 8 mg de glibenclamida en 300 μ L de DMSO y 1030 μ L de agua para obtener una solución que contenía 6 mg/mL de glibenclamida. La administración se realizó por medio de una jeringa.

50 El NMDA se diluyó en agua y se tamponó con TRIS pH 7.

El protocolo experimental comprendía ocho grupos de ratas, como se define a continuación

Grupo 1: (n = 2, 4 ojos), inyección intravítrea de 6 μ L de una solución que comprendía NMDA 45 nM y 1 ng de glibenclamida.

Grupo 2: (n = 2, 4 ojos), inyección intravítrea de 6 µL de una solución que comprendía NMDA 45 nM y 0,01 ng de glibenclamida.

Grupo 3: (n = 2, 4 ojos), inyección intravítrea de 6 µL de una solución que comprendía NMDA 45 nM y DMSO 260 mM.

5 Grupo 4: (n = 2, 4 ojos), administración por vía oral de 10 mg/kg de peso corporal de glibenclamida e inyección simultánea intravítrea de 6 µL de una solución de NMDA 45 nM. Una solución de glucosa al 7% se deja disponible a voluntad para evitar una eventual hipoglicemia.

Grupo 5: (n = 2, 4 ojos), administración por vía oral de una solución de DMSO 260 mM e inyección simultánea intravítrea de 6 µL de una solución de NMDA 45 nM. Una solución de glucosa al 7% se deja disponible a voluntad.

10 Grupo 6: (n = 2, 4 ojos), inyección subconjuntival de 50 µL de una solución que comprendía 1 ng de glibenclamida e inyección simultánea intravítrea de 6 µL de una solución de NMDA 45 nM.

Grupo 7: (n = 2, 4 ojos), inyección subconjuntival de 50 µL de una solución de DMSO 260 mM e inyección simultánea intravítrea de 6 µL de una solución de NMDA 45 nM.

Grupo 8: (n = 2, 4 ojos), sin tratamiento.

15 18 horas después de la administración de NMDA y glibenclamida, se sacrificaron las ratas y se extrajeron inmediatamente los ojos. La fijación de los ojos se realizó durante 4 horas en una solución de paraformaldehído al 4% y sacarosa al 10%. Después de fijación, los ojos se sumergieron a continuación durante una noche a 4°C en una solución de sacarosa al 15% en tampón de fosfato.

20 A continuación, se sometieron los ojos a una etapa de inclusión en OCT, una etapa de corte en congelación en un criostato (10 µm de espesor) y una etapa de marcaje de los cortes por el método TUNEL para revelar la muerte celular por apoptosis.

Resultados

Los métodos utilizados en este ejemplo habían sido validados previamente según el protocolo descrito en el Ejemplo 1 (véase Validación de los métodos).

25 **Administración intravítrea de glibenclamida.**

La inyección intravítrea de 1 ng (ratas del grupo 1) o de 0,01 ng de glibenclamida (ratas del grupo 2) permite disminuir significativamente el número de células apoptóticas en las retinas cuya degeneración es inducida por NMDA (Figura 6). Gracias a los marcajes de estas retinas, se ha observado igualmente que la inyección de 1 o 0,01 ng de glibenclamida permitía mantener una perfecta organización de las capas retinianas (Figura 7B y C) 30 contrariamente a lo que se había observado en las retinas degeneradas (Figura 7A).

Estos resultados demuestran que la glibenclamida reduce significativamente la degeneración y la desestructuración de las capas retinianas inducidas por el NMDA, incluso a dosis muy bajas.

Administración oral de glibenclamida.

35 La administración de glibenclamida por vía oral y la inyección intravítrea de NMDA se realizaron el mismo día (grupo 4). Los resultados obtenidos para los grupos de ratas 4 y 5 se muestran en la Figura 8.

Estos resultados demuestran que la administración de glibenclamida por vía oral reduce significativamente la degeneración de las células retinianas inducida por el NMDA.

Administración subconjuntival de glibenclamida.

40 La administración de glibenclamida por vía subconjuntival e la inyección intravítrea de NMDA se realizaron el mismo día (grupo 6). Los resultados obtenidos para los grupos de ratas 6 y 7 se muestran en la figura 9.

Estos resultados demuestran que la administración de glibenclamida por vía subconjuntival permite disminuir significativamente la degeneración de las células retinianas inducida por el NMDA.

Ejemplo 3: efecto preventivo de la glibenclamida sobre la degeneración retiniana inducida por NMDA

Protocolo experimental

45 Se utilizaron 3 grupos de 2 ratas. Se administró un tratamiento idéntico a los dos ojos de cada animal.

El efecto preventivo de la glibenclamida se ensayó inyectando en el cuerpo vítreo de cada ojo 100 ng o 100 µg de glibenclamida diluida en tampón de BSS®, 5 días antes de la inyección intravítrea de NMDA. La glibenclamida se diluyó en tampón de BSS y no en DMSO con el fin de obtener una suspensión con efecto retardado, consecuencia de la mala solubilidad de la glibenclamida.

50 La administración de 100 µg de glibenclamida permitió ensayar la eventual toxicidad con altas dosis de glibenclamida.

La solución madre de glibenclamida para inyecciones intravítreas se obtuvo diluyendo 4,5 mg de glibenclamida en 300 μ L de DMSO puro. Esta solución se congeló a continuación. Las soluciones de glibenclamida a diferentes concentraciones para las inyecciones intravítreas se obtuvieron por diluciones extemporáneas en un tampón de BSS® (Alcon Laboratories).

5 El NMDA se diluyó en agua y se tamponó con TRIS pH 7 para obtener una concentración de 90 nM.

El protocolo experimental comprendía tres grupos de ratas, tales como se definen a continuación

Grupo 1: (n = 2, 4 ojos), D-5: inyección intravítrea de 3 μ L de una solución que comprendía 100 μ g de glibenclamida en tampón de BSS®; D0: inyección intravítrea de 3 μ L de una solución de NMDA 90 nM.

10 Grupo 2: (n = 2, 4 ojos), D-5: inyección intravítrea de 3 μ L de una solución que comprendía 100 ng de glibenclamida en tampón de BSS®; D0: inyección intravítrea de 3 μ L de una solución de NMDA 90 nM.

Grupo 3: (n = 2, 4 ojos), D-5: inyección intravítrea de 3 μ L de una solución tampón de BSS®; D0: inyección intravítrea de 3 μ L de una solución de NMDA 90 nM.

15 18 horas después de la administración de NMDA y glibenclamida, se sacrificaron las ratas y se extrajeron los ojos inmediatamente. La fijación de los ojos se realizó durante 4 horas en una solución de paraformaldehído al 4% y sacarosa al 10%. Después de la fijación, los ojos se sumergieron a continuación durante una noche a 4°C en una solución de sacarosa al 15% en tampón de fosfato.

A continuación, se sometieron los ojos a una etapa de inclusión en OCT, a una etapa de corte en congelación en un criostato (10 μ m de espesor) y a una etapa de marcaje de los cortes por el método TUNEL para revelar la muerte celular por apoptosis.

20 **Resultados**

Los métodos utilizados en este ejemplo habían sido validados previamente según el protocolo descrito en el ejemplo 1 (véase Validación de los métodos).

25 La inyección intravítrea de 100 μ g (grupo 1) o 100 ng (grupo 2) de glibenclamida 5 días antes de una inyección intravítrea de NMDA permite proteger significativamente las células retinianas de una degeneración inducida por el NMDA (Figura 10).

Además, el efecto protector de la glibenclamida administrada en dosis altas (100 μ g) demuestra la ausencia total de toxicidad de esta molécula para las células de la retina.

Conclusión

30 La inyección de NMDA induce la neurodegeneración de las células de la retina 18 y 24 horas después de la inyección. El NMDA actúa en primer lugar sobre la capa ganglionar, que es la más superficial y en contacto con el cuerpo vítreo, y luego sobre las capas más profundas antes de llegar a los fotorreceptores. Tanto 18 horas como 24 horas después de la inyección, el NMDA ya ha actuado sobre las células de la capa ganglionar e inducido la apoptosis de las células de la capa nuclear interna.

35 Los inventores han demostrado a través de estos diversos ejemplos que la administración de glibenclamida por vía intravítrea, oral o subconjuntival permitía disminuir significativamente la apoptosis retiniana inducida por el NMDA.

Han mostrado igualmente que la administración preventiva de glibenclamida varios días antes de la inyección de NMDA permitía prevenir eficazmente la degeneración de las células retinianas.

Referencias bibliográficas

40 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 15 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.

Crisanti P, Laplace O, Lecain E, Jonet L, Jeanny JC, Omri B. The role of PKC ζ in NMDA-induced retinal ganglion cell death: Prevention by aspirin. Apoptosis 2006; 11:983-991.

45 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.

50 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).

Lam TT, Siew E, Chu R, Tso MOM. Ameliorative effect of MK801 on retinal ischemia. J Ocular Pharmacol Ther 1997; 13:129-37.

- Liss B, Roeper J. Molecular physiology of neuronal K-ATP channels. *Mol. Membr. Biol* 2001; 18:117-127.
- Nistico R, Piccirilli S, Sebastianelli L, Nistico G, Bernardi G, Mercuri NB. The blockade of K (+)-ATP channels has neuroprotective effects in an in vitro model of brain ischemia. *Int Rev Neurobiol* 2007; 82:383-95.
- 5 Osborne NN, Schwarz M, Pergande G. Protection of rabbit retina from ischemic injury by flupirtine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 274-80.
- Pitlik S, Manor RS, Lipshitz I, Perry G, Rosenfeld J. Transient retinal ischaemia induced by nifedipine. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983 Dec 17; 287(6408):1845-6.
- Sherry DM, Townes-Anderson E. Rapid glutamatergic alterations in the neural retina induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Aug; 41(9):2779-90.
- 10 Simard JM, Chen M, Tarasov KV, Bhatta S, Ivanova S, Melnitchenko L, Tsybalyuk N, West GA, Gerzanich V. Newly expressed SUR1-regulated NC(Ca-ATP) channel mediates cerebral edema after ischemic stroke. *Nat Med*. 2006 Apr; 12(4):433-40.
- Simard JM, Woo SK, Bhatta S, Gerzanich V. Drug acting on SUR1 to treat CNS ischemia and trauma. *Curr Opin Pharmacol*. 2008 Feb; 8(1): 42-9.
- 15 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.
- Tsukahara Y, Blair NP, Spellman Eappen DC, et al. Ketamine suppresses ischemic injury in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33:1822-5.
- 20 Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D, et al. Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:1619-24.
- Yoon YH, Marmor MF. Dextromethorphan protects retina against ischemic injury in vivo. *Arch Ophthalmol* 1989; 107:409-11.

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de los canales iónicos regulados por la subunidad SUR para utilización en el tratamiento y/o prevención de una patología asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana, en el que dicho inhibidor se selecciona del grupo constituido por glibenclamida, acetohexamida, carbutamida, glibornurida, clorpropamida, 5 tolbutamida, tolazamida, glipizida, gliquidona, glicopiramida, glisojepida y glimepirida, y en el que la patología asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana se selecciona del grupo constituido por glaucoma, neuropatías ópticas glaucomatosas sin hipertensión, degeneración macular asociada a la edad, inflamaciones intraoculares agudas o crónicas (uveítis, uveo-retinitis, coroiditis), neuropatías ópticas isquémicas o tóxicas, endoftalmitis, retinitis infecciosas, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, retinopatía isquémica 10 proliferante, retinitis pigmentarias, retinopatías asociadas a una hemoglobinopatía, una foto-degeneración, un desprendimiento de retina, patologías vasculares retinianas y/o coroideas (estenosis, trombosis y oclusiones vasculares), hemorragias retinianas y/o coroideas, miopía y degeneraciones retinianas hereditarias o adquiridas.
2. Inhibidor para una utilización según la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor es glibenclamida.
3. Inhibidor para una utilización según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho inhibidor se administra en combinación con otra sustancia activa, simultánea o secuencialmente. 15
4. Inhibidor para una utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la patología asociada a la isquemia retiniana y/o a una excitotoxicidad retiniana se selecciona del grupo constituido por glaucoma, degeneración macular asociada a la edad, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, retinopatía isquémica proliferante y una retinitis pigmentaria.
- 20 5. Inhibidor para una utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sujeto a tratar es un ser humano seleccionado del grupo constituido por un lactante, un niño y un adulto.
6. Inhibidor para una utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sujeto a tratar es un animal seleccionado del grupo constituido por un perro, un gato, un caballo, una vaca, una oveja, un cerdo y un primate no humano.
- 25 7. Inhibidor para una utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho inhibidor se administra por vía intravítrea, por vía subconjuntival, por vía oral, por instilación tópica, por vía periocular e intraocular o por vía parenteral.

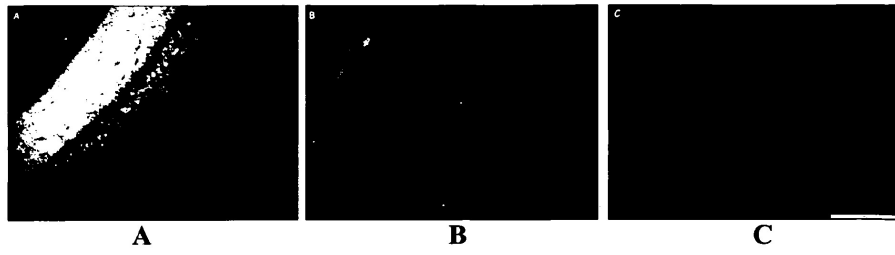


Figura 1

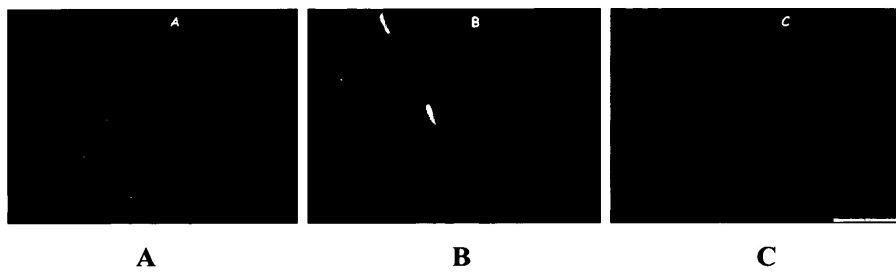


Figura 2

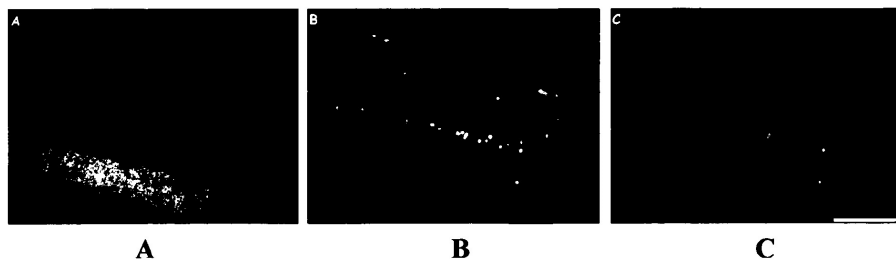


Figura 3

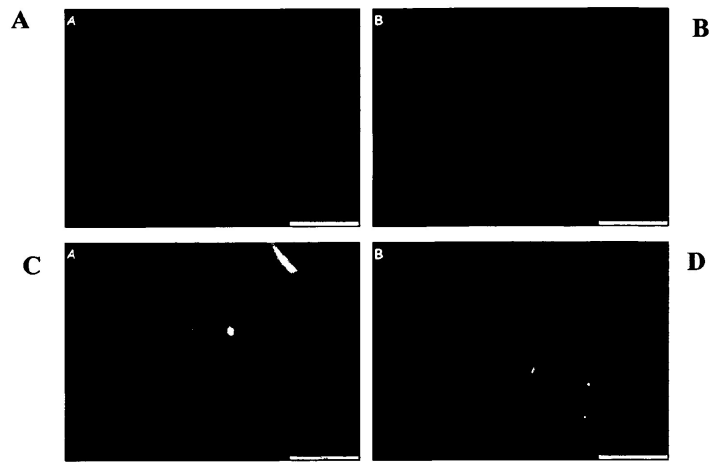


FIGURA 4

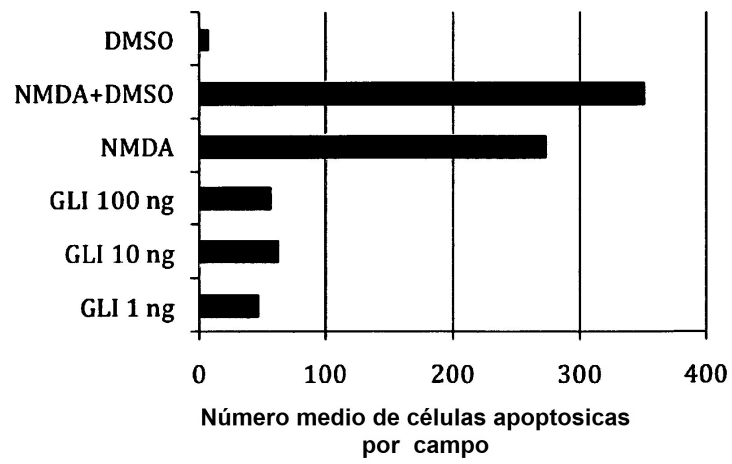


FIGURA 5

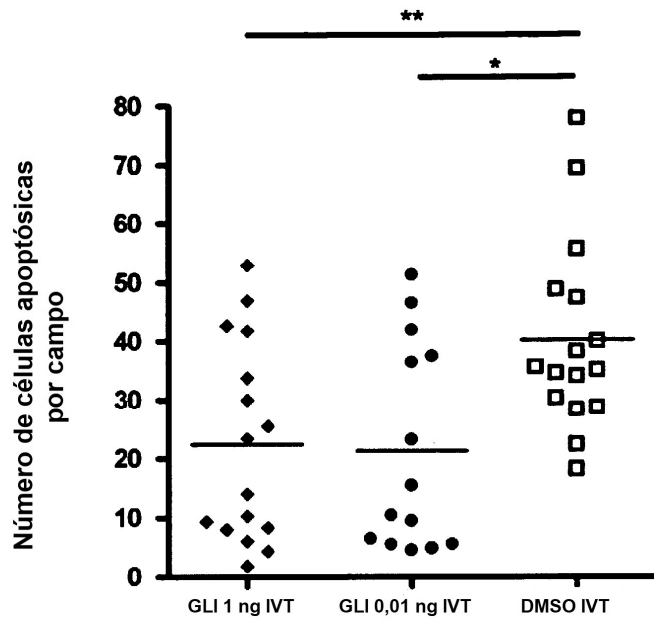


FIGURA 6

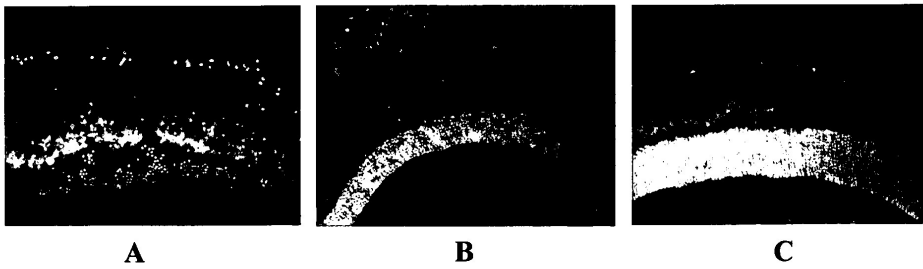


FIGURA 7

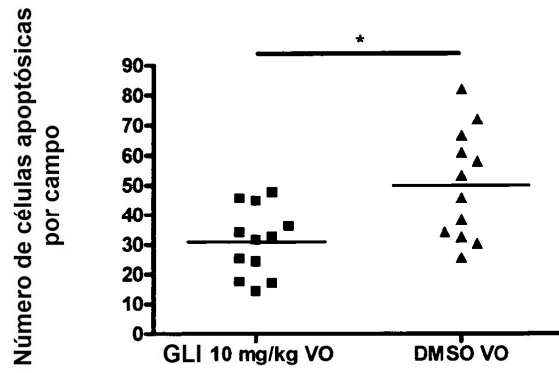


FIGURA 8

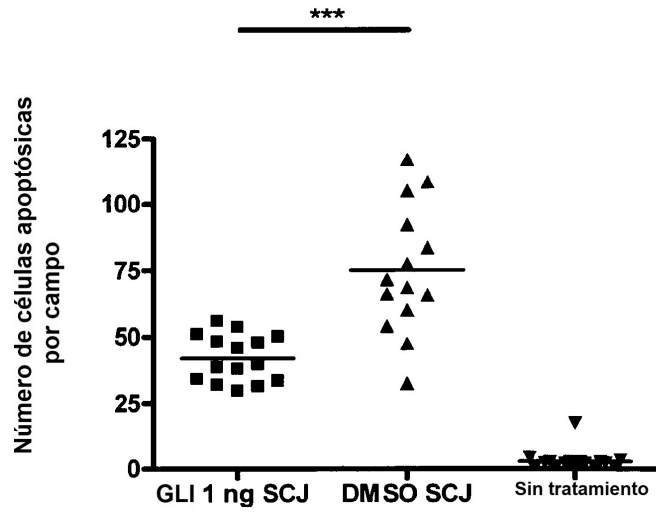


FIGURA 9

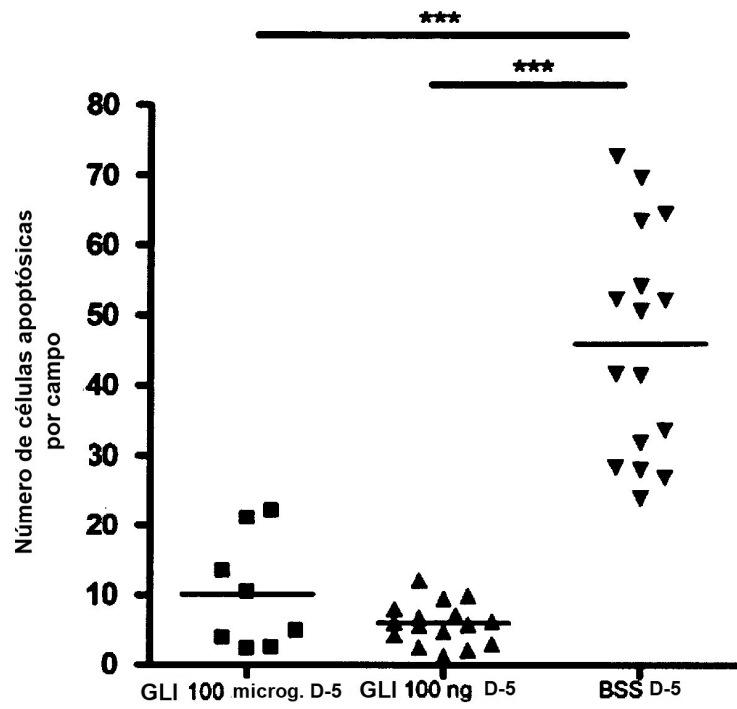


FIGURA 10