

(11) Número de Publicação: **PT 1696958 E**

(51) Classificação Internacional:  
**A61K 45/00** (2006.01) **A61P 27/02** (2006.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2004.12.17</b>	(73) Titular(es):	
(30) Prioridade(s): <b>2003.12.22 US 531770 P</b>	<b>ALCON, INC</b>	<b>CH</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2006.09.06</b>	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2007.03.28</b> <b>007/2007</b>	<b>IOK-HOU PANG</b>	<b>US</b>
	<b>ROBERT A. LANDERS</b>	<b>US</b>
	(74) Mandatário:	
	<b>JOSE EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO</b>	
	<b>R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **AGENTES PARA O TRATAMENTO DE RETINOPATIA GLAUCOMATOSA E NEUROPATIA ÓPTICA .**

(57) Resumo:

## Resumo

### "Agentes para o tratamento de retinopatia glaucomatosa e neuropatia óptica"

Os agentes que estimulam a translocação nuclear da proteína Nrf2 e o consequente aumento dos produtos génicos que destoxificam e eliminam metabolitos citotóxicos, são usados como método para tratar a retinopatia glaucomatosa ou neuropatia óptica. Os agentes estruturalmente diversos que actuam na via Nrf2/ERA, induzem a expressão de enzimas e proteínas que possuem propriedades citoprotectoras, quimicamente versáteis, e são uma defesa contra metabolitos tóxicos e xenobióticos. Estes agentes incluem alguns electrólitos e oxidantes tais como o aceitante de adição Michael, difenol, tiocarbamato, quinona, 1,2-ditiol-3-tiona, hidroxianisol butilado, flavonóides, um isotiocianato, 3,5-di-tetra-butil-4-hidroxitolueno, etoxiquina, uma cumarina, combinações destes ou derivados ou análogos destes farmacologicamente activos.

**Descrição****"Agentes para o tratamento de retinopatia glaucomatosa e neuropatia óptica"****Âmbito do Invento**

O presente invento é relativo ao campo dos agentes profiláticos e terapêuticos da retinopatia e neuropatia óptica devida a glaucoma.

**Antecedentes do invento**

O glaucoma é um grupo heterogéneo de doenças que têm um conjunto semelhante de manifestações clínicas, incluindo lesão do nervo óptico e morte por apoptose selectiva das células ganglionares da retina (CGR), o que conduz a uma perda progressiva do campo visual e a cegueira. O aumento anormal da Pressão Intra-Ocular (PIO) está associado à maior parte das formas de glaucoma. O único tratamento disponível consiste em fazer baixar a PIO, quer seja por medicação ou por cirurgia. O abaixamento da PIO é eficaz para retardar o desenvolvimento de certos tipos de glaucoma, protelando os seus efeitos devastadores. No entanto, a perda de

campo visual nos doentes com glaucoma nem sempre se correlaciona com a PIO e o abaixamento da PIO por si só não impede completamente a progressão da doença. Isto implica que a pressão possa não ser a única causa de retinopatia glaucomatosa e neuropatia óptica. Outros mecanismos adicionais contribuirão provavelmente para a progressão da doença. A retinopatia glaucomatosa é normalmente considerada um como distúrbio funcional ou alteração patológica da retina, particularmente com a morte das CGR, observada em doentes ou animais com glaucoma. A neuropatia óptica glaucomatosa refere-se a distúrbios funcionais ou alterações patológicas do nervo óptico, através do qual passam os axónios das CGR.

Um corte histológico da retina humana do adulto mostra as seguintes camadas de células abaixo indicadas, que vão desde a região proximal ou interna (lado vítreo) até à região distal ou externa (lado coroideu).

Membrana limitante interna,  
Camada óptica fibrosa,  
Camada das células ganglionares,  
Camada plexiforme interna,  
Camada nuclear interna,  
Camada plexiforme externa,  
Camada nuclear externa,

Membrana limitante externa,  
Segmentos internos dos bastonetes e cones,  
Segmentos externos dos bastonetes e cones,  
Epitélio pigmentar da retina,  
Capilares coroideus.

O epitélio pigmentar da retina e os capilares coroideus situam-se na parte posterior da retina, próximo da membrana coroideia, enquanto que a membrana limitante interna se encontra próximo da câmara vítrea. A camada de células ganglionares recebe o estímulo luminoso e envia-o através de axónios mielinizados pelo nervo óptico para o cérebro. As células ganglionares são as células em risco no glaucoma.

Os mecanismos moleculares propostos como contribuindo para a morte das CGR incluem a toxicidade do glutamato, remoção de factores neurotróficos, alterações vasculares (isquémia), glicose reactiva e toxicidade induzida pelo óxido nítrico. No entanto, nenhum destes mecanismos propostos é universalmente aceite pelos investigadores desta área.

O pedido da patente PCT número PCT/US02/40457 de Gao, X., e al., publicada como WO03/051313, produz alegadamente a indução pelo sulforano de uma enzima de

fase II de destoxificação nas células do epitélio pigmentar da retina humana. A publicação da patente U.S. nº 2002/0091087, de Zhang, Y., e al., determina alegadamente o tratamento de uma doença neurodegenerativa através de um composto, o sulforafano, que eleva o glutatião ou uma enzima de fase II de destoxificação no tecido da espinal medula, na doença de Alzheimer e na esclerose lateral amiotrófica. As células do epitélio pigmentar da retina diferem das células ganglionares da mesma na medida em que estas são neurónios e as células do epitélio pigmentar da retina não o são. Além disso, as respostas biológicas do tecido ocular, tal como a retina, a agentes terapêuticos particulares não podem ser previstas a partir das respostas biológicas de tecido da espinal medula ou tecido cerebral. As publicações citadas não fazem referência à protecção ou tratamento da perda de células ganglionares da retina (CGR) e neuropatia óptica no glaucoma.

Não existe qualquer método terapêutico anti-glaucoma globalmente aceite para controlar a retinopatia glaucomatosa ou a neuropatia óptica. Considerando o impacto do glaucoma na saúde e a ineficácia dos métodos anteriores de tratamento, será desejável conseguir um método melhorado de tratamento que controle a retinopatia glaucomatosa e neuropatia óptica no glaucoma.

**Resumo do Invento**

De acordo com o presente invento, um agente com actividade estimuladora da translocação nuclear da proteína Nrf2 e consequente aumento de produtos genéticos que destoxifiquem e eliminem metabolitos citotóxicos confere um efeito protector ou terapêutico no retardamento ou prevenção da perda de células ganglionares da retina e da lesão glaucomatosa do nervo óptico. Na acepção aqui utilizada, "actividade estimuladora da translocação nuclear da proteína Nrf2" significa um agente que aumenta a disponibilidade ou o transporte de Nrf2 para o núcleo. A translocação da proteína Nrf2 para o núcleo permite um aumento subsequente na expressão de produtos genéticos que destoxificam e eliminam metabolitos citotóxicos. Os processos do presente invento garantem um método de tratamento da retinopatia glaucomatosa e neuropatia óptica, compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de mistura contendo um agente com actividade estimuladora da translocação nuclear da proteína Nrf2, e um excipiente aceitável. O indivíduo afectado pode estar em risco de desenvolver retinopatia glaucomatosa ou neuropatia óptica ou ter sintomas de retinopatia glaucomatosa ou neuropatia óptica.

O agente que estimula a translocação nuclear da proteína Nrf2 e o subsequente aumento dos produtos genéticos que destoxificam e eliminam os metabolitos tóxicos da presente invento pode incluir o aceitante de adição Michael, difenol, tiocarbamato, quinona, 1,2-ditiol-3-tiona, hidroxianisol butilado, flavonóides, um isotiocianato, 3,5-di-tetra-butil-4-hidroxitolueno, etoxiquina, 3-hidroxicumarina, combinações destes ou derivados ou análogos farmacologicamente activos destes. Numa configuração, o agente inclui um isotiocinato, como o sulfurafano, ou um derivado farmacologicamente activo deste. Numa outra configuração, o agente inclui uma 1,2-ditiol-3-tiona, como o oltipraz, ou um derivado farmacologicamente activo deste.

O agente que estimula a translocação nuclear da proteína Nrf2 e o subsequente aumento dos produtos genéticos que destoxificam e eliminam os metabolitos tóxicos pode ser administrado por injecção intra ocular, implantação de um dispositivo de libertação lenta, por via tópica, oral ou intranasal, por injecção sistémica ou outros processos de administrações.

Numa realização adicional do presente método inventivo, é diagnosticada ao indivíduo retinopatia ou neuropatia óptica glaucomatosa e, numa outra realização,

o indivíduo apresenta sintomas de retinopatia glaucomatosa ou neuropatia óptica.

#### **Breve descrição do desenho**

O desenho ilustra o efeito do sulforafano na toxicidade induzida pelo glutamato nas células ganglionares da retina de ratos adultos em cultura. As células foram tratadas com os compostos indicados durante 3 dias. A sobrevivência foi analisada por contagem das células saudáveis Thy-1 positivas. O asterisco (\*) representa uma diferença estatisticamente significativa em relação aos valores de controlo, determinada por análise unidireccional de variância entre grupos ANOVA e pelo teste de Dunnett.

#### **Descrição detalhada do invento**

O presente invento está relacionada com o emprego de agentes que estimulam a translocação nuclear da proteína Nrf2 e o subsequente aumento dos produtos genéticos que destoxicificam e eliminam os metabolitos tóxicos num composto para tratar a retinopatia glaucomatosa e a neuropatia óptica.

O termo "tratar a retinopatia glaucomatosa e a neuropatia óptica", na acepção aqui utilizada, significa retardar ou prevenir o desenvolvimento, inibir a progressão ou moderar a retinopatia glaucomatosa ou neuropatia óptica ou os sintomas desta patologia. Estimular a translocação nuclear da proteína Nrf2 e o subsequente aumento dos produtos genéticos que destoxificam e eliminam os metabolitos tóxicos é determinante para a protecção das células ganglionares da retina e para a protecção do nervo óptico.

A translocação nuclear da proteína Nrf2 é induzida em células expostas a certos electrólitos e oxidantes. Os genes induzidos devido à translocação nuclear da proteína Nrf2 produzem enzimas destoxificadoras que asseguram a protecção contra os electrólitos e promovem a reparação ou degradação das proteínas danificadas. A indução destas enzimas é regulada ao nível transcricional e é mediada por um promotor específico, o elemento de resposta antioxidante ou ERA, encontrado no promotor do gene que codifica a enzima. A sequência contexto do ERA, a natureza dos indutores químicos e o tipo de célula afectam a actividade do promotor num determinado gene.

O factor de transcrição Nrf2 é um membro da família de factores de transcrição NF-E2 e é responsável pela sobre regulação do elemento de resposta antioxidante

(ERA) através da expressão genética. O Nrf2 induz a expressão genética por ligação à região ERA (elemento de resposta antioxidante) do promotor para activar a transcrição genética de base ou em resposta ao sinal de stress oxidativo. Em condições normais, pensa-se que o Nrf2 esteja presente no citoplasma ligado por uma proteína repressora Keap1, uma proteína citoplasmática ancorada ao citoesqueleto de actina. Sem querer estar limitados pela teoria, os investigadores acreditam que os agentes com actividade estimuladora da translocação nuclear da proteína Nrf2 podem competir com a região rica em cisteína de um factor citosólico Keap1 pela interacção com Nrf2 (Dinlcova-Kostova, A.T., e al., *Proc Nati Acad Sci, USA*, 99:11908-11913(2002)). A disruptão do complexo Nrf2-Keap1 por certos compostos, como o sulforafano podem libertar o Nrf2 para se translocar para o núcleo onde este pode heterodimerizar-se com outros factores de transcrição (i.e., Maf, c-Jun, etc.) nas regiões ERA de genes conduzindo à indução da expressão de genes ERA-regulada.

As enzimas e proteínas expressas por esta via Nrf2/ERA têm propriedades citoprotectoras quimicamente versáteis e são uma defesa contra metabolitos tóxicos e xenobióticos. As enzimas e proteínas conhecidas como sendo expressas pela via Nrf2/ERA incluem S-transferases

da glutationa, UDP-glucoronosiltransferases, NADP(H) quinona oxireductase, gama-glutamilcisteína sintetase, proteínas de resposta ao stress e proteínas ubiquitina/proteossoma.

Os agentes com actividade estimuladora da translocação nuclear da proteína Nrf2 incluem, por exemplo:

Aceitantes de adição Michael (p.e., compostos carbonil  $\alpha,\beta$ -insaturados, tais como o dietilmaleato ou dimetilfumarato;

Difenóis tais como resveratrol;

Hidroxianisóis butilados tais como 2(3)-tetra-butil-4-hidroxianisol;

Tiocarbamatos tais como pirrolidineditiocarbamato,

Quinonas tais como tetra-butil-hidroquinona,

Isotiocianatos tais como sulfurafano, o seu precursor glucosinolato, glucorafanino, ou fenetyl isotiocianato (FEITC),

1,2-ditiol-3-tionas tais como oltipraz,

3,5-di-tetra-butil-4-hidroxitolueno,

Etoxiquina,

Cumarinas tais como 3-hidroxicumarina,

Flavonóides tais como queracetina ou curcumina,

Sulfureto de dialil,

Indol-3-carbinol,

Epigalo-3-catequina galato

Ácido elágico

Combinações destes ou derivados ou análogos farmacologicamente activos dos mesmos.

Um aceitante Michael é uma molécula que tem um adjacente alceno ao electrão de valência. O grupo do electrão de valência é geralmente um carbonilo, mas também pode ser um grupo nitrilo ou nitríco. Apesar de quimicamente diferentes, estes compostos são electrófilos e têm capacidade de reagir com grupos sulfidrilo nucleofílicos. Um "derivado farmacologicamente activo destes", é um agente estruturalmente relacionado com qualquer dos compostos acima referidos com actividade estimuladora da translocação nuclear da proteína Nrf2 e derivados desta e pode ser um éster, um amido ou um sal dos mesmos, por exemplo. Um "análogo farmacologicamente activo destes", é um agente que é estruturalmente semelhante a qualquer dos compostos acima referidos com actividade estimuladora da translocação nuclear da proteína Nrf2 mas difere ligeiramente na composição tal como na substituição de um átomo por um átomo de um elemento diferente ou na presença de um grupo funcional específico, por exemplo. Numa configuração, o presente invento disponibiliza sulforafano, oltipraz, um análogo

farmacologicamente activo deste ou um sal farmaceuticamente aceitável deste como um método de tratamento da neuropatia óptica glaucomatosa ou retinopatia glaucomatosa.

Sulforafano (Produto nº S6317, Sigma-Aldrich) é reconhecido por induzir a quinona reductase, glutationa-S-transferase e glutationa reductase, por exemplo. A indução enzimática tem sido observada em diversas linhas celulares incluindo as células do epitélio pigmentar da retina em adultos humanos (Zhang, Y., e al., *Proc Nati Acad Sci, USA*, 99:2399-2403 (1992)). Os análogos do sulforafano incluem, por exemplo, 6 - (isotiocianato-2-hexanona), exo-2-acetil-5-isotiocianatonorbomano, exo - (isotiocianato-6-metilsulfonilnorbornano), 6-isotiocianato-2-hexanol, 1- (isotiocianato-4-dimetilfosfonilbutano), exo-2-(1-hidroxietil)-5-isotiocianatonorbomano, exo-2-acetil-5-isotiocianatonorbomano, 1-(isotiocianato-5-metilsulfonilpentano), cis-3(metilsulfonil)(ciclohexilmetylisocianato) e trans-3-(metilsulfonil) (ciclohexilmetylisocianato).

*Modo de administração:* O agente do presente invento pode ser administrado directamente no olho (por exemplo: gotas ou pomadas oculares tópicas; dispositivos de libertação lenta no fundo-de-saco ou implantados

adjacentes à esclerótica ou dentro do olho; injecção periocular, conjuntival, abaixo da cápsula de tenon, intra-câmera, intravítreia, ou intracanalicular) ou por via sistémica (por exemplo: oralmente, injecções intravenosas, subcutâneas ou intramusculares; por via parentérica, administração dérmica ou nasal) usando técnicas bem conhecidas pelos entendidos na matéria. Também está previsto que os agentes do invento possam ser formulados em dispositivos de inserção ou implantes intraoculares.

*Indivíduo:* Um sujeito submetido a tratamento da retinopatia glaucomatosa ou neuropatia óptica como aqui é descrito pode ser humano ou outro animal em risco de desenvolver retinopatia glaucomatosa ou neuropatia óptica ou com sintomatologia de retinopatia glaucomatosa ou neuropatia óptica.

*Formulações e dosagem:* Os agentes do presente invento podem ser administrados como soluções, suspensões ou emulsões (dispersões) num excipiente oftálmico adequado. Apresentam-se seguidamente exemplos de formulações possíveis incorporados neste invento.

Quantidade em peso %	
Agente estimulador da translocação nuclear da proteína Nrf2	0.01-5; 0.01-2.0
Hidroxipropilmetylcelulos e	0.5
Cloreto de sódio	.8
Cloreto de benzalcônio	0.01
EDTA	0.01
NaOH/HCL	Até pH 7.4
Água purificada	Até 100%

Quantidade em peso %		
Agente estimulador da translocação nuclear da proteína Nrf2	0.00005-0.5;	0.0003-0.3;
Tampão salino fosfato	1.0	
Cloreto de benzalcônio	0.01	
Polisorbato 80	0.5	
Água purificada	Até 100%	

	Quantidade em peso %
Agente estimulador da translocação nuclear da proteína Nrf2	0.001
Fosfato de sódio monobásico	0.05
Fosfato de sódio dibásico (anídrico)	0.15
Cloreto de sódio	0.75
EDTA disódico	0.05
CremopherEL	0.1
Cloreto de benzalcônio	0.01
HCL e/ou NaOH	pH 7.3-7.4
Água purificada	Até 100%

	Quantidade em peso %
Agente estimulador da translocação nuclear da proteína Nrf2	0.0005
Tampão salino fosfato	1.0
Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrin	4.0
Água purificada	Até 100%

Numa outra configuração, as composições oftálmicas são formuladas para garantir uma concentração intraocular de cerca de 0.1-100 nanomolares (nM) ou, numa outra configuração, 1-10 nM. Podem ser atingidas concentrações plasmáticas máximas acima de 20 micromolares com a administração sistémica. As composições tópicas são administradas na superfície do olho entre uma a quatro vezes por dia, de acordo com a prática de rotina de um clínico habilitado. O pH da formulação deve ser de 4-9, ou 4.5 a 7.4. As formulações sistémicas podem conter cerca de 10 mg a 1000 mg, cerca de 10 mg a 500 mg, cerca de 10 mg a 100 mg ou a 125 mg, por exemplo, do agente que estimula a translocação nuclear da proteína Nrf2 e consequente aumento de produtos genéticos que destoxificam e eliminam metabolitos citotóxicos.

Uma "quantidade eficaz" refere-se à quantidade de agente susceptível de estimular a translocação nuclear da proteína Nrf2 e subsequente aumento de produtos genéticos que destoxificam e eliminam os metabolitos citotóxicos. Esta indução de expressão genética garante a defesa contra a toxicidade dos electrólitos reactivos, bem como outros metabolitos tóxicos. Deste modo, um agente que estimule a translocação nuclear da proteína Nrf2 e consequente aumento de produtos genéticos que

destoxificam e eliminam metabolitos citotóxicos é determinante para a protecção contra a citotoxicidade.

Esta protecção retarda ou previne a instalação de sintomatologia num indivíduo em risco de desenvolver neuropatia óptica glaucomatosa ou retinopatia glaucomatosa. A quantidade eficaz de uma formulação pode depender de factores como a idade, raça, e sexo do indivíduo ou da gravidade da neuropatia óptica, por exemplo. Numa realização, o agente é administrado topicalmente no olho e atinge as células ganglionares da retina numa dose terapêutica, melhorando assim o processo patológico da retinopatia ou neuropatia óptica.

Embora o regime preciso seja deixado à consideração do clínico, a solução ou soluções resultantes são preferencialmente administradas colocando uma gota de cada solução(ões) em cada olho entre uma a quatro vezes ao dia, ou como indicado pelo médico.

*Excipientes aceitáveis:* Um excipiente oftalmicamente aceitável refere-se aos excipientes que causam uma irritação ocular mínima ou nula, garantem uma conservação adequada se necessário e libertam um ou mais agentes que estimulam a translocação nuclear da proteína Nrf2 e subsequente aumento de produtos genéticos que destoxificam e eliminam metabolitos citotóxicos do

presente invento numa dosagem homogénea. Para a administração oftálmica, um agente que estimule a translocação nuclear da proteína Nrf2 e consequente aumento de produtos genéticos que destoxificam e eliminam os metabolitos citotóxicos deve ser combinado com conservantes oftalmologicamente aceitáveis, co-solventes, surfactantes, espessantes, promotores da penetração, tampões, cloreto de sódio ou água para formar uma suspensão, oftálmica aquosa, estéril, solução, gel viscoso ou semi-viscoso ou outros tipos de composições sólidas ou semi-sólidas como uma pomada. Podem ser preparadas formulações oftálmicas em solução, dissolvendo o agente num tampão aquoso isotônico fisiologicamente aceitável. Além disso, a solução oftálmica pode incluir um surfactante oftalmologicamente aceitável para promover a dissolução do agente. Podem ser adicionados espessantes, como hidroximetil celulose, hidroxietil celulose, metilcelulose, polivinilpirrolidona, ou semelhantes, às composições do presente invento a fim de melhorar a retenção do composto.

Para preparar uma formulação oftálmica estéril em pomada, o agente que estimula a translocação nuclear da proteína Nrf2 e consequente aumento de produtos genéticos que destoxificam e eliminam os metabolitos citotóxicos é combinado com um conservante num veículo apropriado, como

óleo mineral, lanolina líquida, ou vaselina branca. As formulações oftálmicas estéreis em gel podem ser preparadas por suspensão do agente numa base hidrofílica preparada a partir da combinação de, por exemplo, CARBOPOL®-940 (BF Goodrich, Charlotte, NC) ou similar, de acordo com métodos conhecidos no sector para outras formulações oftálmicas. Pode utilizar-se VISCOAT® (Laboratórios Alcon, Inc., Fort Worth, TX) para injecção intraocular, por exemplo. Outras composições do presente invento podem conter materiais promotores da penetração, como CREMOPHOR® (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) e TWEEN® (monolaureato de polioxietileno sorbitano, Sigma Aldrich), no caso de agentes da presente invento serem menos penetrantes no olho.

### **Exemplo 1**

#### **Agentes com actividade estimuladora da translocação nuclear da proteína Nrf2**

São utilizadas células vasculares endoteliais, como as células endoteliais aórticas bovinas (CEAB, Tecnologias CVE, Rensselaer, NY), para determinar os agentes com actividade estimuladora da translocação nuclear da proteína Nrf2. Por exemplo, monocamadas confluentes de células endoteliais aórticas bovinas são

expostas a agentes candidatos em meio de Dulbecco modified Eagle's com 1% de soro bovino fetal, até 24 horas. São preparados lisados de células, extractos citosólicos e extractos nucleares, os quais são trabalhados por imunofixação e quantificados, tal como descrito em Buckley, B.J., e al. (*Biochem Biophys Res Commun*, 307:973-979 (2003)). É em seguida testada a actividade de agentes que aumentam a quantidade de Nrf2 detectada na fracção nuclear em comparação com células controlo sem agente, num ensaio de toxicidade das células ganglionares da retina, como descrito adiante no exemplo 2.

### **Exemplo 2**

#### **Protecção das células ganglionares da retina de rato por um agente com actividade estimuladora da translocação nuclear da proteína Nrf2**

São combinadas células neurais de retina de rato de cultura com um agente estimulador da translocação nuclear da proteína Nrf2 entre 1 a 24 horas, sendo em seguida a combinação exposta ao peróxido. A sobrevivência das células neurais da retina quando comparada com uma cultura de controlo sem peróxido, indica que o agente confere protecção contra o oxidante.

São isoladas e cultivadas células neurais da retina de ratos recém-nascidos como descrito em Pang, I-H, e al, (*Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1170-1176 (1999)). "Neural da retina" refere-se à retina sem o respectivo epitélio pigmentar. Dessa forma, a cultura contém uma população mista de tipos celulares da retina. Resumidamente, são anestesiados ratos Sprague-Dawley recém-nascidos com 2,5 dias de vida, sendo praticada uma abertura mediana de 2mm no escalpe caudal até ao seio transverso. As células ganglionares da retina são selectivamente e de forma retrógrada marcadas com um corante fluorescente, Di-l, (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianino), um marcador lipofílico que selecciona uniformemente os neurónios (Molecular Probes, Eugene, OR). A ponta da agulha de injecção (30 ga) é inserida 6 mm abaixo da superfície do crânio e são injectados 5µl de solução de Di-l no colículo superior. A solução de Di-l contém 3 mg/ml de Di-l em 90% de etanol e 10% de dimetilsulfóxido. A ferida é coberta com uma gota de colódio flexível.

Dois a quatro dias após a injecção de Di-l, os ratos são anestesiados e sacrificados por decapitação. Os seus olhos são enucleados e colocados em meio de Dulbecco modified Eagle's: mistura de nutrientes F12 (1:1; DMEM/F12, Gibco, Gaithersburg, MD). A retina de cada olho

é destacada e isolada. As células da retina são dissociadas por uma solução contendo 10 mg de papaina (34 unidades/ml), 2 mg de DL-cisteína (3.3 nM) e 2 mg de albumina sérica bovina (0.4 mg/ml) em 5 ml de DMEM/F12, durante 25 mins a 37 °C, e em seguida lavadas 3 vezes com 5ml de meio RGC (DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 4 nM de glutamina, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina). As peças de retina são trituradas por passagens através de pipetas descartáveis até as células ficarem dispersas. As suspensões celulares (aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/ml) são colocadas em pratos de cultura com o fundo de vidro recoberto por poli-D-lisina. As células são cultivadas com 95% de ar/5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Procede-se à determinação dos efeitos protectores de um agente com actividade estimuladora da translocação nuclear da proteína Nrf2, tratando as culturas com o agente candidato durante 1 a 24 horas e adicionando em seguida 300 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As CGR cultivadas são identificadas por fluorescência Di-1. A sobrevivência das CGR é avaliada contando o número de células que ficam com fluorescência Di-1. Os agentes que melhoram a sobrevivência das células ganglionares da retina comparativamente com o controlo são determinantes para

proteger as CGR da agressão citotóxica e são úteis para o tratamento da neuropatia óptica glaucomatosa.

### **Exemplo 3**

#### **Protecção com Sulforafano das células ganglionares da retina de rato da toxicidade induzida pelo glutamato**

Ratos adultos Sprague-Dawley foram mortos por asfixia com CO<sub>2</sub>, sendo os seus olhos enucleados e colocados em meio NEUROBASAL™ (Gibco, Gaithersburg, MD). A retina de cada olho foi destacada e isolada. As células da retina foram dissociadas, combinando mais de 20 retinas com 5 ml de solução de papaina contendo 10 mg de papaina, 2 mg de DL-cisteína e 2 mg de albumina sérica bovina em 5 ml de meio NEUROBASAL™, durante 25 min a 37 °C e, em seguida, lavadas 3 vezes com 5mL de meio RGC (NEUROBASAL™), meio suplementado, tal como citado no exemplo 2 com 1% de soro bovino fetal. As peças de retina foram trituradas passando através de pipetas descartáveis aquecidas várias vezes, até as células estarem dispersas. A suspensão de células foi colocada numa estrutura com 8 compartimentos/poços recoberta por poli-D-lisina e laminina, sendo o glutamato e glutamato com sulforofano adicionados aos poços especificados. As células foram

cultivadas com 95% de ar/5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante três dias.

No final do período de incubação, as células foram fixadas e marcadas para o Thy-1, um marcador CGR, por Imunocitoquímica. A sobrevivência celular foi quantificada por contagem manual de células saudáveis Thy-1 positivas em cada um dos poços. Os dados resultantes são ilustrados no desenho e demonstram que o tratamento das CGR com glutamato (100 µM) durante 3 dias causou uma redução de 40-60% nas células sobreviventes. O tratamento das células com sulforafano (0.5 µM) impediu tal toxicidade. Estes resultados demonstram que o sulforafano confere protecção contra as agressões das células ganglionares da retina.

As referências citadas no presente, na medida em que fornecem procedimentos exemplificativos ou outros detalhes suplementares aos apresentados consideram-se especificamente incorporadas por referência.

Salvo indicação em contrário, os termos "um" e "uns" são usados com o significado de "um", "pelo menos um" ou "um ou mais".

**Reivindicações**

1. Utilização de uma quantidade eficaz de uma composição contendo um agente estimulador da translocação nuclear da proteína Nrf2 e um transportado aceitável, na preparação de um medicamento destinado ao tratamento da retinopatia glaucomatosa ou neuropatia óptica, num sujeito.
2. Utilização da Reivindicação 1, em que o sujeito se encontra em risco de desenvolver retinopatia glaucomatosa ou neuropatia óptica.
3. Utilização da Reivindicação 1, em que o sujeito tem sintomas de retinopatia glaucomatosa ou neuropatia óptica.
4. Utilização das Reivindicações 1 a 3, em que o agente inclui um aceitante de adição Michael, difenol, tiocarbamato, quinona, 1,2-ditiol-3-tiona, hidroxianisol butilado, flavonóides, um isotiocianato, 3,5-di-tetra-butil-4-hidroxitolueno, etoxiquina, uma cumarina, combinações destes ou derivados ou análogos farmacologicamente activos destes.
5. Utilização da Reivindicação 4, em que o agente inclui

um isoftiocianato ou um derivado ou análogo farmacologicamente activo deste.

6. Utilização da Reivindicação 5, em que o isoftiocianato inclui sulforafano ou um derivado farmacologicamente activo deste.

7. Utilização da Reivindicação 4, em que o agente inclui uma 1,2-ditiol-3-tiona ou um derivado farmacologicamente activo desta.

8. Utilização da Reivindicação 4, em que a 1,2-ditiol-3-tiona inclui oltipraz ou um derivado farmacologicamente activo desta.

9. Utilização da Reivindicação 4, em que o agente inclui um flavonóide ou um derivado farmacologicamente activo deste.

10. Utilização da Reivindicação 4, em que o flavonóide inclui quercetina ou um derivado farmacologicamente activo desta.

11. Utilização de qualquer Reivindicação anterior, em que o medicamento é preparado para injecção intra-ocular,

implantação de um dispositivo de libertação retardada ou administração tópica, oral ou intranasal.

12. Utilização da Reivindicação 11, em que o medicamento é preparado para administração intra-ocular

Lisboa, 24 de Maio de 2007

