



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 311 466**

51 Int. Cl.:
A61K 33/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00948171 .4**
96 Fecha de presentación : **28.07.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1200103**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2002**

54 Título: **Xenón como antagonista del NMDA para la neuroprotección.**

30 Prioridad: **29.07.1999 GB 9917822**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

73 Titular/es: **Protexeon Limited**
Aldwych House, 81 Aldwych
London WC2B 4HN, GB

72 Inventor/es: **Franks, Nicholas P. y**
Maze, Mervyn

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 311 466 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

Xenón como antagonista del NMDA para la neuroprotección.

5 Antecedentes

La presente invención se refiere a la utilización del xenón como un neuroprotector y/o en la inhibición de la plasticidad sináptica. Particularmente, la invención se refiere a la utilización del xenón como un antagonista del NMDA y para el tratamiento de las afecciones asociadas con la actividad del receptor NMDA.

10 El receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) constituye un subtipo principal de los receptores del glutamato, y se cree que el glutamato constituye el neurotransmisor excitatorio más importante en el sistema nervioso central de los mamíferos. De manera importante, se ha demostrado que la activación del receptor NMDA constituye el evento central que conduce a la excitotoxicidad y a la muerte neuronal en muchos estados patológicos, así como (constituye) el resultado de la hipoxia y de la isquemia después de un trauma cefálico, del ictus y del paro cardíaco.

Es conocido en la técnica que el receptor NMDA desempeña un papel importante en la plasticidad sináptica que subyace a muchas funciones cognitivas superiores, tales como la memoria y el aprendizaje, así como (juega un papel importante) en ciertas vías nociceptivas y en la percepción del dolor (Collingridge *et al*, The NMDA Receptor, Oxford University Press, 1994). Además, ciertas propiedades de los receptores NMDA sugieren que pueden estar implicados en el procesamiento de la información en el cerebro que subyace a la misma consciencia.

Los antagonistas de los receptores NMDA son terapéuticamente evaluables por diversas razones, tales como las tres razones específicas siguientes: En primer lugar, los antagonistas de los receptores NMDA confieren una analgesia profunda, un componente muy deseable de la anestesia general y de la sedación. En segundo lugar, los antagonistas del receptor NMDA son neuroprotectores en muchas circunstancias clínicamente importantes (que incluyen isquemia, trauma cerebral, estados de dolor neuropático, y ciertos tipos de convulsiones). En tercer lugar, los antagonistas de los receptores NMDA confieren un grado variable de amnesia.

30 Sin embargo, resulta evidente a partir de la técnica anterior que existen diversos inconvenientes asociados con los antagonistas habituales de los receptores NMDA. Incluyen la producción de movimientos involuntarios, la estimulación de sistema nervioso simpático, la inducción de neurotoxicidad a dosis altas (que guarda relación, ya que los antagonistas de los receptores NMDA son poco potentes como anestésicos generales), la depresión del miocardio, y preconvulsiones en algunos sistemas epileptogénicos, por ejemplo, “facilitación” (Wlaz P *et al*, Eur. J. Neurosci. 1994; 6:1710-1719). En particular, han existido dificultades considerables para desarrollar nuevos antagonistas de los receptores NMDA que puedan cruzar la barrera hematoencefálica. Este factor ha limitado también las aplicaciones terapéuticas de muchos antagonistas conocidos del NMDA.

El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar mejores antagonistas de los receptores NMDA para 40 utilización general farmacéutica, que puedan difundirse fácilmente a través de la barrera hematoencefálica.

Exposición de la invención

Se presentan aspectos de esta invención en las reivindicaciones adjuntas y en la descripción siguiente.

Así, la presente invención se refiere a la utilización de xenón como un neuroprotector y/o como un inhibidor de la plasticidad sináptica. En un aspecto preferido, el xenón actúa como un antagonista del receptor NMDA.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento, que comprende la 50 modulación de la actividad de un receptor NMDA en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la modulación de la actividad del receptor NMDA administrando al mamífero una cantidad de xenón terapéuticamente efectiva.

En un aspecto preferido de la invención, el xenón se administra en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente.

Preferentemente, el procedimiento de tratamiento puede utilizarse para tratar a un mamífero que soporte una situación asociada con la actividad del receptor NMDA. En un aspecto más preferido, el mamífero se trata para una afección que está asociada con la activación del receptor NMDA.

60 Todavía más preferentemente, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento en el que el xenón reduce el nivel de activación del receptor NMDA.

Otra forma de realización de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica apropiada para modular la actividad de un receptor NMDA, comprendiendo dicho procedimiento la 65 adición de un antagonista del NMDA a un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable en el que la mejoría comprenda la utilización de xenón como el antagonista del NMDA.

Otra forma de realización de la presente invención proporciona una composición farmacéutica para modular la actividad del NMDA, que comprende un antagonista del NMDA y un portador, excipiente o diluyente, farmacéuticamente aceptable en la que la mejoría comprenda la utilización de xenón como el antagonista del NMDA.

5 Todavía otra forma de realización de la invención, se refiere a la utilización del xenón en la preparación de un producto farmacéutico para su uso en la modulación de la actividad de un receptor NMDA en un mamífero.

En un aspecto preferido, el xenón en el producto farmacéutico se utiliza en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente.

10 Preferentemente, el producto farmacéutico se utiliza para tratar una afección asociada con la actividad del receptor NMDA. En un aspecto más preferido, el producto farmacéutico se utiliza para tratar una afección asociada con la activación del receptor NMDA. Todavía más preferentemente, el producto farmacéutico se utiliza para reducir el nivel de activación del receptor NMDA.

15 Descripción detallada

La presente invención se refiere a la utilización del xenón como un neuroprotector y/o para inhibir el desarrollo de la tolerancia a los opiáceos. En un aspecto preferido, el xenón actúa como un antagonista de los receptores NMDA.

20 El xenón es un gas químicamente inerte cuyas propiedades anestésicas se han conocido durante 50 años (Lawrence JH *et al.*, J. Physiol., 1946; 105:197-204). Desde su primera utilización en cirugía (Cullen SC *et al.*, Science 1951; 113:580-582), diversos grupos de investigación han mostrado que posee un perfil farmacológico excelente, que incluye la ausencia de sub-productos metabólicos, analgesia profunda, comienzo y recuperación rápidos, y efectos mínimos sobre el sistema cardiovascular (Lachmann B *et al.*, Lancet 1990; 335: 1413-1415; Kennedy RR *et al.*, Anaesth. Intens. Care 1992;20:66-70; Luttrupp HH *et al.*, Acta Anaesthesiol. Scan 1994;38:121-125; Goto T *et al.*, Anesthesiology, 1997; 86:1273-1278; Marx T *et al.*, Br. J. Anaesth, 1997; 78:326-327). Sin embargo, hasta la fecha, los mecanismos moleculares que sostienen la actividad clínica del xenón, han permanecido oscuros.

30 Se ha descrito la utilización del xenón en una aplicación farmacéutica en las solicitud de patente del Reino Unido nº GB 9913677.2 (presentada el 11 de junio de 1999).

El término “antagonista” se utiliza en su sentido normal en la técnica, es decir, un compuesto químico que evita la activación funcional de un receptor mediante su agonista natural (glutamato, en este caso).

35 Es ampliamente sabido que la mayoría de otros anestésicos potencian la actividad de los receptores inhibitorios GABA (ácido γ -aminobutírico del tipo A) (Franks NP *et al.*, Nature 1994;367:607-614; Mihic SJ *et al.*, Nature 1997; 389:385-389). Sin embargo, se cree que el efecto del xenón sobre estos receptores es despreciable. En vez de esto, el xenón inhibe potentemente los canales excitatorios del receptor NMDA. Este efecto explica muchos de las características importantes de su perfil farmacológico y es probablemente instrumental en los efectos analgésicos y anestésicos de este gas inerte.

40 Debe apreciarse que la técnica anterior ni ha dado a conocer ni ha sugerido la utilización de xenón como un neuroprotector y/o un inhibidor de la plasticidad sináptica. La técnica anterior ni ha dado a conocer ni ha sugerido la utilización de xenón como un antagonista de los receptores NMDA.

A diferencia de muchos otros antagonistas del NMDA, el xenón puede equilibrarse rápidamente con el cerebro, difundiendo a través de la barrera hematoencefálica. Otra ventaja de utilizar el xenón como un antagonista del NMDA es que la molécula constituye un gas inerte y volátil que puede eliminarse rápidamente con la respiración.

50 Así, la presente invención se refiere a la utilización del xenón para:

- a) proporcionar neuroprotección;
- 55 b) inhibir la plasticidad sináptica, por ejemplo, inhibir el desarrollo de la tolerancia a los opiáceos.

El término “neuroprotección” significa la protección de una entidad neural, tal como una neurona, en el sitio de la agresión, por ejemplo, una agresión isquémica o una traumática.

60 En otra forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para proporcionar neuroprotección y/o inhibir la plasticidad sináptica en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva de xenón.

65 Preferentemente, el xenón se administra en combinación con un portador, diluyente o excipiente, farmacéuticamente aceptable. Como ejemplo, en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el xenón puede mezclarse con cualquier agente o agentes aglomerante(s), lubricante(s), de suspensión, de revestimiento, o de solubilización, que se seleccionan con respecto a la vía de administración farmacéutica estándar que se tenga la intención de utilizar.

ES 2 311 466 T3

El xenón puede administrarse también en combinación con otro agente farmacéuticamente activo. El agente puede ser cualquier agente farmacéuticamente activo apropiado, incluyendo agentes anestésicos o sedantes que promuevan la actividad GABAérgica. Ejemplos de dichos agentes GABAérgicos incluyen el isoflurano, el propofol y las benzodiazepinas.

En otra forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir el nivel de activación de los receptores NMDA en un mamífero, comprendiendo el procedimiento la modulación de la actividad del receptor NMDA, administrando al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de xenón, en el que dicha reducción alcance la neuroprotección y/o una inhibición de la plasticidad sináptica.

Otra forma de realización de la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica apropiada para la neuroprotección y/o la inhibición de la plasticidad sináptica, comprendiendo dicho procedimiento la adición de xenón a un portador, excipiente o diluyente, farmacéuticamente aceptable en el que la mejoría comprende la utilización de xenón como un neuroprotector y/o un inhibidor de la plasticidad sináptica.

En otra forma de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica para la neuroprotección y/o una inhibición de la plasticidad sináptica, que comprende xenón y un portador, excipiente o diluyente, farmacéuticamente aceptable en el que la mejoría comprende la utilización de xenón como un neuroprotector y/o un inhibidor de la plasticidad sináptica.

Típicamente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden suministrarse intravenosamente (mediante la administración de una inyección intravenosa rápida o infusión), neuraxialmente (subdural o subaracnoidea), transdérmicamente, o mediante inhalación.

A título de ejemplo, la presente invención se refiere asimismo a la utilización de xenón en la preparación de un medicamento para:

- a) proporcionar neuroprotección;
- b) inhibir la plasticidad sináptica, por ejemplo inhibir el desarrollo de la tolerancia a los opiáceos.

La concentración del xenón utilizado en la composición puede ser la concentración mínima que se requiere para obtener el efecto clínico deseado. Es habitual para un médico determinar la dosis actual que será la más apropiada para un paciente individual, variando esta dosis con la edad, peso y respuesta del paciente particular. Pueden existir, por supuesto, casos individuales que merezcan dosis más altas o más bajas, y las cuales están comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

La composición farmacéutica de la presente invención puede estar destinada a la administración humana o animal.

Por tanto, la composición de la presente invención puede utilizarse también como un medicamento animal. A este respecto, la invención se refiere además a una composición veterinaria que comprenda la composición de la presente invención y un diluyente, excipiente o transportador veterinariamente aceptables.

Para la utilización veterinaria, la composición de la presente invención, o su composición veterinariamente aceptable, se administra típicamente según la práctica normal veterinaria y el veterinario determinará el régimen de dosis y la vía de administración que sea la más apropiada para un animal en particular.

La invención se describe además haciendo referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 representa las respuestas postsinápticas inhibitorias y excitatorias de control.

La figura 2 representa las gráficas representativas que muestran los efectos del xenón sobre las respuestas postsinápticas excitatorias e inhibitorias.

La figura 3 representa el porcentaje de la corriente máxima de control respecto a la concentración del NMDA en presencia y ausencia de xenón.

La figura 4 representa el efecto de AP5 y del xenón sobre la respuesta postsináptica excitatoria, y dentro del gráfico, el componente mediado por el receptor NMDA.

La figura 5 representa la construcción y representación del aparato utilizado para exponer las células en cultivo.

La figura 6 representa una vista general de la cámara completa utilizada para exponer las células en cultivo.

La figura 7 representa la cinética de la cámara para un experimento típico en el que el xenón se introduce en la cámara, mostrando el aumento del xenón y la disminución del nitrógeno respecto al tiempo (en minutos).

La figura 8 representa un esquema de calibración para el xenón.

ES 2 311 466 T3

La figura 9 representa un ejemplo típico de un análisis del gas de la cámara.

La figura 10 representa una curva dosis-respuesta de la agresión neuronal inducida por el NMDA.

5 La figura 11 representa una curva dosis-respuesta de la agresión neuronal inducida por el glutamato.

La figura 12 representa el efecto del 75% del xenón durante y después de la agresión neuronal inducida por el NMDA.

10 La figura 13 representa el efecto del 75% del xenón durante y después de la agresión neuronal inducida por el glutamato.

La figura 14 representa el efecto de dosis crecientes de la Prostaglandina E1 (PGE1) sobre la adenilil ciclasa (AC).

15 La figura 15 representa el efecto de la coadministración de norepinefrina sobre la actividad de la adenilil ciclasa (AC).

Con mayor detalle, la figura 1 A), una corriente representativa postsináptica excitatoria (EPSC), su sensibilidad a 1 mM de ácido quinurénico e insensibilidad a 10 μ M de bicuculina. El interior del gráfico muestra la relación lineal corriente-voltaje para el valor máximo de la EPSC, normalizada para la corriente medida a -60 mV; los puntos de datos representan valores medios (para un promedio de 5 células). B) Una corriente representativa postsináptica inhibitoria (IPSC), su sensibilidad a 10 μ M de bicuculina e insensibilidad a 1mM de ácido quinurénico. El interior del gráfico muestra la relación lineal corriente-voltaje para el valor máximo de la IPSC, normalizada con respecto a la corriente medida a -60 mV; los puntos de datos representan los valores medios (para un promedio de 6 células). En los interiores de los gráficos las barras de errores son SEMs, pero éstos no se muestran cuando son más pequeños que el tamaño del símbolo.

Con mayor detalle, la figura 2 muestra A) Corrientes postsinápticas GABAérgicas en presencia y ausencia de 3,4 mM de xenón. El xenón no posee un efecto significativo sobre la IPSC. El interior del gráfico muestra rasgos representativos que ilustran la falta de un efecto de 4,3 mM de xenón sobre la corriente evocada por 3 μ M de GABA. B) Corrientes postsinápticas glutamatérgicas en presencia y ausencia de 3,4 mM de xenón. El efecto principal es una reducción en el componente lento de la corriente (en este ejemplo en aproximadamente 70%). Los puntos representan ajustes biexponenciales para las corrientes medidas. El interior del gráfico muestra rasgos representativos que ilustran el efecto de 3,4 mM de xenón en la corriente evocada por 100 μ M de NMDA.

Con mayor detalle, la figura 3 representa que NMDA activa una corriente interna (que se fija a -60 mV en las neuronas) con un EC_{50} de $24 \pm 2 \mu$ M de NMDA y un coeficiente de Hill de $1,2 \pm 0,1$. El xenón inhibe la corriente en aproximadamente un 60%, pero no cambia significativamente el EC_{50} o el coeficiente de Hill. Cada punto de los datos representa la corriente máxima media de por lo menos 6 células.

Con mayor detalle, la figura 4 muestra que el xenón inhibe selectivamente el componente mediado por el receptor NMDA de las corrientes postsinápticas excitatorias glutamatérgicas (EPCSs). A las neuronas se les fijó un voltaje (mediante pinzamiento de la membrana, de -60 mV, estimulándose las respuestas sinápticas mediante un impulso despolarizante de 2 ms a +20 mV. Las EPCS glutamatérgicas de control exhibieron una caída bifásica característica. El componente lento se bloqueó completamente mediante 200 μ M AP5, dejando casi inafectado al componente rápido. En el interior del gráfico (representado) el componente mediado por el receptor NMDA (la diferencia entre las EPCS de control y aquéllas en presencia de AP5) y su tamaño en presencia de xenón (calculado tomando la diferencia entre las EPSC en presencia del xenón y aquéllas en presencia de AP5). Las soluciones de control se equilibraron a temperatura ambiente con N₂ al 80% y O₂ al 20%, y las soluciones del ensayo con xenón al 80% y O₂ al 20%.

Con mayor detalle, la figura 5 muestra detalles de la placa de sujeción y del conjunto de ventiladores, del gas y de los procedimientos de suministro eléctricos. La cámara está realizada en acero inoxidable o aluminio anodizado y puede esterilizarse fácilmente. Los gases penetran a través de una entrada que está acoplada a un ventilador de alta velocidad que proporciona una mezcla efectiva, para asegurar que las células estén expuestas a concentraciones de xenón definidas con precisión. Si el xenón se introduce en la cámara a v ml/min y la cámara tiene un volumen V y la concentración del xenón que penetra en la cámara es C_{in} , entonces la concentración del gas que proviene del exterior C_{out} está dada por:

$$C_{out} = C_n \left[1 - e^{-\frac{v}{V} t} \right]$$

Con mayor detalle, la figura 7 muestra un ensayo experimental que ilustra que el xenón reemplaza al nitrógeno a exactamente la tasa teórica. En presencia de una placa de cultivo de células, el volumen de gas es de 570 mls. Por tanto, para una tasa de 40 ml de xenón/minuto, y una placa de cultivo celular única, el gas en la cámara deberá alcanzar teóricamente el 95% de la concentración final cuando t=43 minutos si los gases están perfectamente mezclados.

ES 2 311 466 T3

Con mayor detalle, la figura 8 constituye un ejemplo de un esquema de calibración para el xenón, mostrando la altura de la esfera en el medidor de flujo (mm) con respecto a la velocidad de flujo del xenón (mls/minuto). La composición del entorno gaseoso al cual las células se expusieron se definió utilizando rotámetros de flujo de precisión que habían sido calibrados para el xenón (o alternativamente para el nitrógeno, oxígeno o dióxido de carbono).

Con mayor detalle, la figura 9 muestra un análisis de gas cuando una mezcla definida de gases (xenón, nitrógeno y dióxido de carbono) se hizo pasar a través de una cámara que mezclaba los gases, dando lugar a un entorno estable y controlado con precisión. La composición de los gases se confirmó utilizando la cromatografía de gases. Se tomaron muestras de los gases a la salida, sellándose en un vial de vidrio. El vial se transfirió a un muestreador Perkin Elmer automático con cabezal espacioso HS 40XL que muestreó los gases en el vial (volumen de muestreo de 40 μ l), suministrándose entonces éstos a un cromatógrafo de gas Perkin Elmer XL provisto con una columna Chromosorb 102 80-100 Mesh de 2 metros x 1/8ss, sometida a procesamiento a 60°C con helio como gas transportador (2 mls/min). Los gases se detectaron utilizando un detector térmico de conductividad a 110°C con una temperatura del inyector de 150°C.

Con mayor detalle, la figura 10 muestra una curva dosis-respuesta de una lesión neuronal inducida por el NMDA en un cultivo con una antigüedad de 15 días. Los experimentos de control demostraron que la monocapa de glía subyacente no fue afectada por NMDA con la máxima dosis utilizada (Tratamiento: 10 minutos, liberación de LDH después de 24 horas).

Con mayor detalle, la figura 11 muestra una curva dosis-respuesta de una lesión neuronal inducida por el glutamato en un cocultivo con una antigüedad de 15 días. Los experimentos de control demostraron que la monocapa de glia subyacente no fue afectada por el glutamato con la máxima dosis utilizada (Tratamiento: 30 minutos, liberación de LDH después de 6 horas).

Con mayor detalle, la figura 12 muestra el efecto del xenón al 75% durante y después de una lesión neuronal inducida por NMDA, en la que cultivos hermanos (n=3) se expusieron a NMDA (750 μ mol durante 10 minutos) y la lesión neural subsiguiente se cuantificó por la aparición de LDH 24 horas después de la exposición.

Con mayor detalle, la figura 13 muestra el efecto del xenón al 75% durante y después de la lesión neural inducida por el glutamato, en la cual los cultivos hermanos (n=3) se expusieron al glutamato (75 μ moles durante 10 minutos) y la subsiguiente lesión neuronal se cuantificó por la aparición de LDH 24 horas después de la exposición.

Con mayor detalle, la figura 14 muestra que dosis crecientes de PGE1 estimulan la adenilil ciclasa (AC) de forma dependiente de la dosis.

Con mayor detalle, la figura 15 muestra que cuando se coadministra la norepinefrina alfa-2 agonista bajo condiciones en las que la actividad AC es estimulada con PGE₁, la actividad de AC es inhibida de forma dependiente de la dosis por la norepinefrina. Incluso bajo condiciones basales ("PGE₁"), el efecto inhibitorio es evidente.

Estudios llevados a cabo por el solicitante han mostrado que el xenón no tiene virtualmente efecto sobre los receptores GABA_A. Las corrientes activadas por 3 μ M GABA, tanto en neuronas hipocámpicas de ratas cultivadas fijadas con un voltaje, como en células PA3 fijadas con un voltaje (Hadingham KL *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992;89, 6378-6382) que expresaron establemente subunidades definidas de GABA, no se vieron afectadas significativamente, incluso por el xenón al 100%. El significado de esta observación es importante, dado que para funcionar como un anestésico humano, la concentración efectiva máxima media E₅₀ es el 71% v/v (Cullen *et al.*, Anesthesiology 1969, 305-309). Se mostró también que el xenón tenía un efecto escaso sobre las sinapsis funcionales que liberaban GABA en las neuronas hipocámpicas, reduciendo el xenón del 80% en sólo un 8 \pm 2% las corrientes postsinápticas inhibitorias máximas, indicando que los efectos presinápticos del xenón deben ser muy modestos.

En contraposición, se mostró que el xenón tenía un efecto significativo sobre los receptores NMDA. Estudios mecánicos sobre neuronas hipocámpicas cultivadas han mostrado que el xenón al 80% (el cual mantendrá la anestesia quirúrgica) reduce las corrientes activadas por NMDA hasta en un 60%, sin un cambio significativo en el valor EC₅₀ del NMDA o en el coeficiente de Hill. Esta inhibición no competitiva indica que el xenón inhibirá intensamente la transmisión neural, a pesar de las altas concentraciones de glutamato en las hendiduras sinápticas.

Se llevaron a cabo otros estudios utilizando cultivos microsátélites de las neuronas hipocámpicas que forman sinapsis con ellas mismas (autapsis) (Bekkers JM *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991; 88, 7834-7838). Una típica corriente postsináptica glutamatérgica registrada a partir de una neurona hipocámpica se muestra en la figura 4. Los registros de control muestran un curso bifásico característico del tiempo, con un componente rápido mediado por receptores no-NMDA y un componente mucho más lento mediado por los receptores NMDA. El componente mediado por el receptor NMDA se identifica rápidamente, pues es bloqueado por el antagonista competitivo AP5 altamente selectivo, DL-2-amino-5-fosfonopentanoato (Walkins JC *et al.*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1981; 21, 165-204).

Se mostró que la adición de 200 μ m de AP5 bloqueó casi completamente el componente lento, dejando sólo un componente rápido, con un único curso exponencial del tiempo muy parecido al del componente rápido del control. El efecto del xenón sobre la corriente postsináptica glutamatérgica se parece a la del AP5 (figura 4). El componente lento

mediado por el receptor NMDA se redujo por encima del 70%, mientras que el componente rápido cambió apenas. Por tanto, el xenón no sólo inhibe los receptores sinápticos NMDA, sino que posee un pequeño efecto aparente sobre los receptores no-NMDA.

5 En términos del efecto sobre las corrientes sinápticas, la selectividad de la acción observada con el xenón es inesperada. En vista de que casi todos los anestésicos generales potencian las acciones del GABA en los receptores GABA_A (Tanelian DL. *et al*, *Anesthesiology* 1993; 78:757-776; Franks NP *et al*, *Nature* 1994; 367:607-614), se anticipó que el xenón no sería la excepción. Sin embargo, la ausencia completa de un efecto del xenón sobre los receptores GABA_A lo sitúa en el mismo tipo de agentes que la quetamina, un anestésico denominado “disociativo”, que es también inefectivo en los receptores GABA_A (Brockmeyer DM *et al*, *Br. J. Anesth.* 1995; 74:79-84), creyéndose que actúa predominantemente en los receptores NMDA. De modo similar, los resultados han mostrado que el xenón bloquea selectivamente los receptores NMDA con un pequeño efecto en los receptores AMPA/KA. Este último resultado sugiere intensamente que las acciones del xenón son postsinápticas en origen. La falta de un efecto del xenón sobre el tiempo de disminución del componente del receptor NMDA, sin embargo, descarta un único mecanismo de inhibición del bloqueo del canal abierto, como lo da a entender la observación de que la concentración de EC₅₀ para las corrientes evocadas por NMDA no cambia en presencia del xenón. Cualquiera que sea la base molecular exacta para la sorprendente selectividad del xenón por los receptores NMDA, da cuenta de manera bastante simple de muchas características de su perfil farmacológico inusual, incluyendo la capacidad para inducir una analgesia profunda y los efectos psicotomiméticos.

20 Por lo tanto, está claro que el xenón es sorprendentemente selectivo en su acción, presentando muchos efectos distintos sobre la transmisión sináptica inhibitoria y excitatoria. La acción del xenón puede ser considerada únicamente en términos de efectos en las sinapsis glutamatergicas, aunque otras dianas pueden identificarse bien en el futuro. Sin embargo, la insensibilidad de las sinapsis GABAérgicas con respecto al xenón, indica que sus mecanismos de acción son claramente distintos a los de los anestésicos más generales. A nivel mecánico, está claro que para el xenón, los receptores postsinápticos constituyen las dianas moleculares más importantes.

La presente invención se describe a continuación mediante ejemplos.

30 Ejemplos

Cultivo de neuronas hipocámpicas

35 Se hicieron crecer neuronas hipocámpicas en cultivos, utilizando procedimientos que se describen anteriormente (Segal MM *et al*, *J. Neurophysiol.* 1990, 64:1390-1399; Bekkers JM *et al*, *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88:7834-7838; Mennerick S *et al*, *J. Neurophysiol.* 1995, 73:320-332). Brevemente, hipocampos procedentes de ratas Sprague Dawley (días 1-3 después del nacimiento), se sometieron a disección, se cortaron a rodajas aproximadamente y se agitaban en una solución que contenía papaína (20 unidades ml⁻¹) durante 30 minutos a 37°C. Después de lavado con una solución libre de enzimas, se trituró suavemente el tejido con una pipeta de Pasteur pulida al fuego, sembrándose las células con una densidad de 8-10 x 10⁴ células ml⁻¹ y se cultivaron (aire al 95%/CO₂ al 5%) a 37°C. Los cubres de vidrio utilizados para el cultivo de las células se revistieron en primer lugar con agarosa (0,15% peso/vol) y entonces se pulverizaron con una fina neblina de poli-D-lisina (PDL) y colágeno (0,1 mg ml⁻¹ PDL y 0,5 mg ml⁻¹ de colágeno de la cola de rata a partir de un microatomizador de vidrio y esterilizado por exposición a UV. Esto produjo micro-islas de sustrato permisivo con diámetros de entre 100 y 1000 µm. A los 3-4 días después de la siembra, cuando la capa de células gliales mostraba una confluencia de aproximadamente 80%, se le añadió un agente antimitótico (citosina β - arabinofuranosida, 5 µM) para detener la proliferación de células gliales. Se dejó entonces que los cultivos neuronales maduraran durante otros 4-9 días. Utilizamos microislas que contenían neuronas aisladas únicas cuyas prolongaciones axónicas y ramificaciones dendríticas formaban múltiples auto-sinapsis (autapsis). Este procedimiento proporcionó una gran población de conexiones monosinápticas fenotípicamente idénticas.

50 *Electrofisiología*

En las neuronas se fijó un voltaje (mediante pinzamiento de la membrana) utilizando la técnica de registro de la célula completa (amplificador Axopatch 200, Axon instruments, Foster City, CA). Se fabricaron los electrodos a partir de vidrio borosilicato que tenían resistencias de entre 3-5 MΩ. La resistencia de las series se compensó en un 75-90%. En las neuronas se fijó un voltaje a -60 mV, y las respuestas sinápticas se estimularon mediante una pulsación despolarizante de 2 ms a +20 mV. Poco después de la restauración del potencial de la membrana a -60 mV, se observó una voluminosa (1-20 nA) corriente postsináptica, gravándola. Para las mediciones sinápticas, se muestrearon los datos a 50 kHz, se filtraron a 20 kHz (-3 dB, Bessel 8-polo) y se guardaron en un ordenador. La solución extracelular de registro fue (mM) 137 NaCl, KCl, 3 CaCl₂, 5HEPES, 10 glucosa, 0,001 glicina, 0,0001 estricnina - HCl, titulada a un pH de 7,3 con NaOH; y la solución intracelular (pipeta) fue (mM) 140 KCl, 4NaCl, 0,5 EGTA, 2MgATP, 10 HEPES, titulada con pH 7,25 con KOH.

65 Para los experimentos en los que GABA, NMDA o glutamato se aplicaron exógenamente, las neuronas crecieron en cultivo de masa y se utilizaron 3-11 días después de la siembra. Los datos se muestrearon a 200 Hz y se filtraron a 100 Hz (-3dB, Bessel 8-polo). La solución extracelular de registro para las respuestas evocadas por el glutamato y el NMDA fue (mM) 150 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, 0,0002 citrato de tetrodotoxina (Tocris Cookson, Bristol, Inglaterra), 0,1 picrotoxina, 0,0001 estricnina-CIH, 0,001 glicina, que se titularon a pH 7,40 con NaOH; la

ES 2 311 466 T3

solución extracelular de registro para las respuestas evocadas por el GABA fueron (mM) 150 NaCl, 4 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, 0,0002 citrato de tetrodotoxina, que se tituló a pH 7,40 con NaOH, y la solución intracelular (pipeta) para las respuestas evocadas por GABA-,NMDA- y glutamato fueron (mM) 140 CsCl, 3NaCl, 11 EGTA, 2MgATP, 10 HEPES, titulada con pH 7,20 con CsOH. Si no se indica de otra forma, todas las sustancias químicas se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (Poole, Dorset, Inglaterra). Las soluciones de los ensayos se aplicaron a las células utilizando un sistema de perfusión de inoculación rápida, (Downie DL *et al*, Br. J. Pharmacol 1996, 1996, 118: 493-502). Todas las mediciones electrofisiológicas se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20-23°C).

Preparación de las soluciones anestésicas

Las soluciones de xenón se prepararon haciendo burbujear, en primer lugar, los gases puros (oxígeno, nitrógeno o xenón) a través de burbujeadores de vidrio sinterizado en recipientes Drechsel de 250- o 500 ml rellenos con la solución salina extracelular de gravado. Las soluciones se hicieron burbujear durante 1,5-2 horas, aunque se encontró que el equilibrio se consiguió a los 45 minutos. (Para minimizar la oxidación, las neurotoxinas y neurotransmisores se excluyeron de la solución salina completamente oxigenada). Durante el burbujeo, las soluciones se agitaron continuamente a temperatura ambiente. Estas soluciones se mezclaron entonces para obtener las deseadas concentraciones finales de los gases. Las soluciones de control de la presente invención contuvieron habitualmente el 80% de la solución de nitrógeno y el 20% de la solución de oxígeno, mientras que nuestras soluciones de ensayo contuvieron habitualmente el 80% de la solución de xenón y el 20% de la solución de oxígeno. Utilizando un coeficiente Bunsen de partición agua/gas del 0,0965 (Smith RA *et al*, Biochem Biophys. Acta 1981, 645:327-338), calculamos que nuestra solución estándar de ensayo contenía 3,4 mM de xenón. El xenón (grado de investigación, pureza del 99,993%) se suministró por gases BOC, Guildford, Surrey, Inglaterra. En todos los casos, se preaplicó el xenón a las neuronas durante por lo menos 30 segundos antes del inicio de las corrientes sinápticas.

Integración de las respuestas sinápticas

Para obtener una estimación de la transferencia total de carga, las EPSC o IPSC se integraron numéricamente. Sin embargo, a causa de que en algunos casos las corrientes no habían descendido al nivel de base al final del período de gravado, se aplicó una corrección (que fue invariablemente inferior a 5% de la transferencia total de carga) extrapolando la corriente observada al nivel de base utilizando un ajuste biexponencial a la fase de disminución de la respuesta.

Corrientes sinápticas de control

Se caracterizaron las corrientes sinápticas de control, que se adscribieron casi invariablemente a una de dos poblaciones, según los hallazgos de los estudios previos (Bekkers JM *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991, 88:7834-7838; Mennerick S *et al*, J. Neurophysiol. 1995, 73:320-332). La mitad aproximadamente de las células mostraron corrientes postsinápticas que disminuyen relativamente rápido (tiempo medio, -8 ms), mientras que la otra mitad mostraron corrientes que eran notablemente más lentas (tiempo medio, -40 ms) (ver la figura 1 y la tabla 1). Las respuestas más rápidas se registraron a partir de las células con una apariencia redondeada y que mostraban complejas ramificaciones dendríticas. Su sensibilidad al ácido quinurénico (inhibición de la corriente máxima del 80 ± 3% con 1 mM de ácido quinurénico, $n=7$ células) y la insensibilidad a la bicuculina (inhibición del 0,4 ± 1,3% de la corriente máxima con 10 μM bicuculina; $n= 13$ células) identifican a estas células como neuronas glutamatérgicas excitatorias. Al contrario, las corrientes sinápticas más lentas fueron bloqueadas casi completamente por la bicuculina (inhibición del 94 ± 1% de la corriente máxima con 10 μM de bicuculina; $n=8$) células y no fueron afectadas por el ácido quinurénico (inhibición del 6 ± 4% de la corriente máxima con 1 mM de ácido quinurénico; $n= 5$ células), identificando de este modo estas respuestas como GABAérgicas. Estas neuronas inhibitorias tendían a ser más planas, con ramificaciones dendríticas más sencillas. A causa del hallazgo reciente de que el GABA y la glicina pueden coliberarse por las interneuronas de la médula espinal (Jonas P *et al.*, Science 1998, 281;419-424), se consideró la posibilidad de que las respuestas inhibitorias que estábamos gravando, estuvieran mediadas, en parte, por receptores de la glicina. Sin embargo, la corriente de control apenas se afectó (inhibición del 4 ± 2%; $n= 6$ células) por 100 nM de estricnina, confirmando que las corrientes inhibitorias eran enteramente GABAérgicas.

Las corrientes excitatorias e inhibitorias presentaban esencialmente idénticos tiempos para alcanzar los valores máximos (véase la tabla 1), estos valores máximos cambiaron de forma lineal con el potencial del ensayo (véase el interior del gráfico en la figura 1). La fase de disminución de la corriente sináptica $I(t)$, en la que t es el tiempo medido a partir del máximo valor de la corriente, se ajustó mediante una ecuación biexponencial del tipo

$$I(t) = I_{fast} e^{-t/\tau_{fast}} + I_{slow} e^{-t/\tau_{slow}}$$

en la que $I_{rápido}$ e I_{lento} son las amplitudes y $\tau_{rápido}$ y τ_{lento} son las constantes de tiempo de los componentes rápido y lento, respectivamente. Los valores para estas constantes del tiempo de disminución medidas a partir de las respuestas inhibitorias y excitatorias de control se proporcionan en la tabla 1. En ambos casos, dos tercios aproximadamente de la transferencia total de carga se realizaron por el componente lento. Para las respuestas glutamatérgicas excitatorias, este componente lento puede identificarse fácilmente como mediado por los receptores NMDA, porque está completamente (99 ± 1%; $n=10$ células) boqueado por 200 μM MAP5 (DL-2-amino-5-fosfonopentanoato, un antagonista muy selectivo

del receptor NMDA (Davies J *et al*, Neurosci. Letts 1981, 21:77-81). En presencia de esta concentración de AP5, la fase de disminución de la corriente sináptica pudo ajustarse bien mediante un exponencial único de una magnitud y un curso del tiempo poco distinto de los del componente rápido de control.

- 5 Este componente rápido, que determina muy ampliamente la magnitud de la corriente excitatoria máxima ($I_{rápida}/I_{total} = 92 \pm 1\%$; $n=13$ células), puede atribuirse a corrientes mediadas por receptores AMPA/KA (Bekkers JM *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88:7834-7838; Mennerick S *et al*, J. Neurophysiol. 1995, 73:320-332).

Los efectos del xenón sobre las corrientes sinápticas

10

La concentración gaseosa del xenón que previene una respuesta a un estímulo doloroso, (es decir. MAC) parece variar entre las especies, siendo en el hombre de 71% atm (Cullen SC *et al*, Anesthesiology 1969, 31:305-309, de 98% atm en los monos rhesus (Whitehurst SL *et al*, J. Neurosurg. Anesthesiol. 1994, 6: 275-279) y de 161% atm en ratas (Koblin DD *et al*, Anesth. Analg. 1998, 87: 419-424). Cuando estos valores se convierten a concentraciones acuosas libres a 37°C (Franks NP *et al*, Br. J. Anaesth. 1993, 71:65-76, Franks NP *et al*, Anesthesiology, 1996, 84:716-720) utilizando un coeficiente Ostwald de partición agua/gas de 0,0887 (Weathersby PK *et al*, Undersea Biomed. Res. 1980, 7:277-296), los valores que se obtuvieron son de 2,5 mM, 3,4 mM y 5,6 mM para el hombre, monos y ratas respectivamente, siendo el valor promedio de 3,8 mM. Para los experimentos que se describen en la presente memoria, que se llevaron a cabo a temperatura ambiente, la concentración del xenón presente en la solución estándar de ensayo fue de 3,4 mM. A esta concentración, el xenón tuvo efectos despreciables sobre las corrientes sinápticas inhibitorias, pero deprimió intensamente las corrientes excitatorias. Esto se ilustra con trazos representativos en la figura 2.

Para las corrientes sinápticas GABAérgicas, 3,4 mM de xenón ni afectaron el valor máximo, ni el curso del tiempo de las corrientes postsinápticas. En la tabla 2 se presentan los cambios porcentuales en los diversos parámetros sinápticos inhibitorios, en la que puede apreciarse que ninguno de ellos cambiaron significativamente. También se investigaron los efectos del xenón sobre las corrientes evocadas mediante una baja (3 μ M) concentración del GABA aplicado exógenamente. Aquí, 4,3 mM de xenón no tuvieron efecto significativo sobre la corriente inducida por el GABA (potenciación $2 \pm 3\%$), $n= 4$ células). En el interior de la gráfica 2A, se muestra un par representativo de rasgos. Al contrario, 3,4 mM de xenón deprimió en gran medida la corriente sináptica glutamatérgica, estando confinado casi exclusivamente su efecto al componente lento de la corriente mediado por el receptor NMDA (fig 2B). Esto es evidente en los cambios porcentuales en los diversos parámetros sinápticos excitatorios que se presentan en la tabla 2. Aquí puede apreciarse que los efectos cualitativos del xenón son estrechamente mimetizados de forma importante por los efectos de AP5. A la concentración dada de AP5 (200 μ M), se esperaría que el componente del receptor NMDA se bloqueara casi completamente (Davles J *et al*, Neurosci. Letts 1981, 21:77-81), y esto está de acuerdo con el bloqueo del 99% de I_{lento} (véase la tabla 2). Esto se acompaña por una reducción del 75% en la transferencia total de la carga, cercana al 61% de la carga total, que estimamos es llevada a cabo por el componente lento mediado por el receptor NMDA (véase la tabla 1). La diferencia puede explicar la reducción pequeña pero significativa, mediante AP5, de la constante temporal del componente rápido $\tau_{rápido}$, (tabla 2). Como el xenón, provoca una inhibición importante (70%) de I_{lento} y una gran inhibición (56%) de la transferencia total de la carga, con sólo un pequeño efecto sobre el componente rápido mediado por el receptor AMPA/KA.

Efecto neuroprotector

Cocultivo de células neuronales fetales y gliales neonatales

45

Se prepararon cultivos de células corticales murinas disociadas utilizando neocórtex cerebrales enteros de ratones fetales (14-17 días de gestación). A partir de ratones postnatales tempranos se prepararon cultivos de células gliales corticales. Después de la división de células no neuronales con citosina arabinósido, las células neuronales corticales supervivientes se sembraron sobre las células gliales y se cocultivaron.

50

Lesionando un cocultivo neuronal con NMDA

Las placas de cocultivo tras 15 días de cosechar originariamente las células corticales, se expusieron a temperatura ambiente a 10-1000 μ M de N-metil, D-aspartato (NMDA), en una solución salina de control (CCS) durante 10 minutos. Después de lavar cuidadosamente con CCS, las células se incubaron durante 6-24 horas en un medio esencial mínimo de Eagle sin glutamato o lactato deshidrogenasa (LDH), pero suplementado con glucosa 25 mM, y NaHCO₃ 38 mM a 37°C en atmósfera de CO₂ (5%) humidificada. El grado de lesión se determinó midiendo la LDH que se liberó al medio. En la figura 10 se muestra una curva dosis-respuesta de la lesión inducida por el NMDA, tal como se ha descrito antes en la presente memoria.

60

Lesionando un cocultivo neuronal con glutamato

Las placas de cocultivo tras 15 días de cosechar originariamente las células corticales, se expusieron a temperatura ambiente a 10-1000 μ M de glutamato, en (CCS) durante 10-30 minutos. Después de lavar cuidadosamente con CCS, las células se incubaron durante 6-24 horas en un medio esencial mínimo de Eagle sin glutamato o lactato deshidrogenasa (LDH), pero suplementado con glucosa 25 mM, y NaHCO₃ 38 mM a 37°C en atmósfera de CO₂ (5%) humidificada. El grado de lesión se determinó midiendo la LDH que se liberó al medio. En la figura 11 se muestra una curva dosis-respuesta de la lesión inducida por el glutamato, tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

65

Protección con xenón de células neuronales-gliales cocultivadas lesionadas con NMDA

Se suministró el 75% de una atmósfera de xenón a las células durante y después de la exposición a 75 μ M de glutamato, una concentración que produce una lesión casi máxima. El grado de lesión se determinó midiendo la LDH que se liberó al medio (después de corregir la liberación de la LDH de base”). El xenón redujo la lesión producida por el glutamato en más del 35%; cuando se continuó el xenón después de la exposición al glutamato, la lesión se redujo posteriormente, en más de un 60%. Los resultados del efecto protector del xenón se representan en la figura 13, tal como se describe anteriormente en la presente memoria.

Inhibición de la plasticidad sináptica

La perturbación de la función en el sistema nervioso central puede producirse mediante un cambio en la resistencia de las conexiones neurales, a lo que se hace referencia como plasticidad sináptica. Se ha utilizado la progenie celular híbrida neuroblastoma X glioma para examinar el efecto del xenón en la plasticidad sináptica. En este paradigma, los receptores alfa-2-adrenérgicos que están implicados de forma importante en la transmisión sináptica, inhiben la adenil ciclasa (AC).

Para examinar el efecto inhibitorio de los receptores alfa-2-adrenérgicos sobre AC, es primero necesario estimular la AC endógena con Prostaglandina E₁ (PGE₁). Dosis crecientes de PGE₁ que dependen de la dosis estimulan AC (figura 14). Cuando la norepinefrina alfa-2 agonista se coadministró bajo condiciones en las que la actividad se estimula con PGE₁, esta actividad fue inhibida de forma dosis-dependiente por la norepinefrina (figura 15).

Para inducir “la plasticidad sináptica”, las células se pretrataron durante 8 horas con norepinefrina después de preparar homogenados a partir de células enteramente lavadas, perdiendo su efecto inhibitorio sobre la actividad AC estimulada con PGE₁ la norepinefrina que se volvió a aplicar. Si estas células son coincidentalmente expuestas al xenón durante la fase de pretratamiento, la acción inhibitoria de la norepinefrina permanecerá.

TABLA 1

Parámetros de control para las corriente sinápticas

Parámetro	Corrientes extractorias	a n	Corrientes inhibitorias	a n ^a
Tiempo hasta valor máximo	4,9 ± 0,6	12	5,0 ± 0,3	14
Semi vida biológica de la disminución	7,8 ± 0,5	13	38,5 ± 3,5	16
$\tau_{\text{rápido}}$ (ms)	9,0 ± 0,7	13	38,1 ± 3,9	16
τ_{lento} (ms)	210 ± 28	13	229 ± 44	16
$I_{\text{rápido}} / I_{\text{total}}^b$	0,92 ± 0,01	13	0,7 ± 0,04	17
$Q_{\text{lento}} / Q_{\text{total}}^c$	0,61 ± 0,04	13	0,63 ± 0,04	16
^a número de células				
Total ^b = $I_{\text{rápido}} + I_{\text{lento}}$				
Qtotal ^c = $Q_{\text{rápido}} + Q_{\text{lento}}$				

ES 2 311 466 T3

TABLA 2

Efectos de 3,4 mM(-IMAC) xenón sobre las corrientes sinápticas y de 200 μ M AP5 sobre las corrientes sinápticas excitatorias

5

Parámetro	Corrientes inhibitorias			Corrientes excitatorias					
	+ 3,4 mM xenón	+ 3,4 mM xenón	+ 200 μ m AP5						
	% cambio (medias \pm SEM)	\downarrow, \uparrow o ns ^a	n ^b	% cambio (medias \pm SEM)	\downarrow, \uparrow o ns ^a	n ^b	% cambio (medias \pm SEM)	\downarrow, \uparrow o ns ^a	n ^b
I _{valor}	-3,1 \pm 2,2	ns	11	-13,5 \pm 1,8	\downarrow	10	-16,3 \pm 2,1	\downarrow	10
Semivida biológica	-3,4 \pm 2,4	ns	10	-22,7 \pm 2,5	\downarrow	11	-24,1 \pm 3,3	\downarrow	10
disminución									
Total de carga de transferencia	-2,3 \pm 3,9	ns	10	55,6 \pm 2,7	\downarrow	11	-75,2 \pm 2,5	\downarrow	10
I _{rápido}	-4,3 \pm 2,8	ns	11	-4,1 \pm 5,2	ns	11	6,8 \pm 6,2	ns	10
I _{lento}	18,8 \pm 12,4	ns	11	-70,3 \pm 2,4	\downarrow	11	-98,8 \pm 0,8	\downarrow	10
τ _{rápido}	-1,3 \pm 3,5	ns	11	-12,3 \pm 1,8	\downarrow	11	-5,9 \pm 2,3	\downarrow	10
τ _{lento}	0,8 \pm 6,0	ns	11	-6,7 \pm 6,5	ns	11	-	-	-
Q _{rápido}	1,5 \pm 7,2	ns	12	-11,4 \pm 5,6	ns	11	5,3 \pm 9,6	ns	10
Q _{lento}	12,6 \pm 8,4	ns	12	-68,2 \pm 4,2	\downarrow	11	-96,0 \pm 3,4	\downarrow	10

^a no significativo con un nivel de confianza del 95%(ensayo t de Student), ^b número de células

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 311 466 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización del xenón en la preparación de un producto farmacéutico para su utilización en la neuroprotección y/o para inhibir el desarrollo de la tolerancia a los opiáceos.

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el xenón en el producto farmacéutico se utiliza en combinación con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

10 3. Utilización según la reivindicación 1, en la que el producto farmacéutico está destinado a su utilización en el tratamiento de una afección asociada con la actividad del receptor NMDA.

15 4. Utilización según la reivindicación 1, en la que el producto farmacéutico está destinado a su utilización en el tratamiento de una afección asociada con la activación del receptor NMDA.

5. Utilización según la reivindicación 1, en la que el producto farmacéutico está destinado a su utilización en la reducción del nivel de activación del receptor NMDA.

20 6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el xenón está destinado a su administración en combinación con un agente GABAérgico.

7. Utilización según la reivindicación 6, en la que el GABAérgico es seleccionado de entre isoflurano, propofol y una benzodiacepina.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

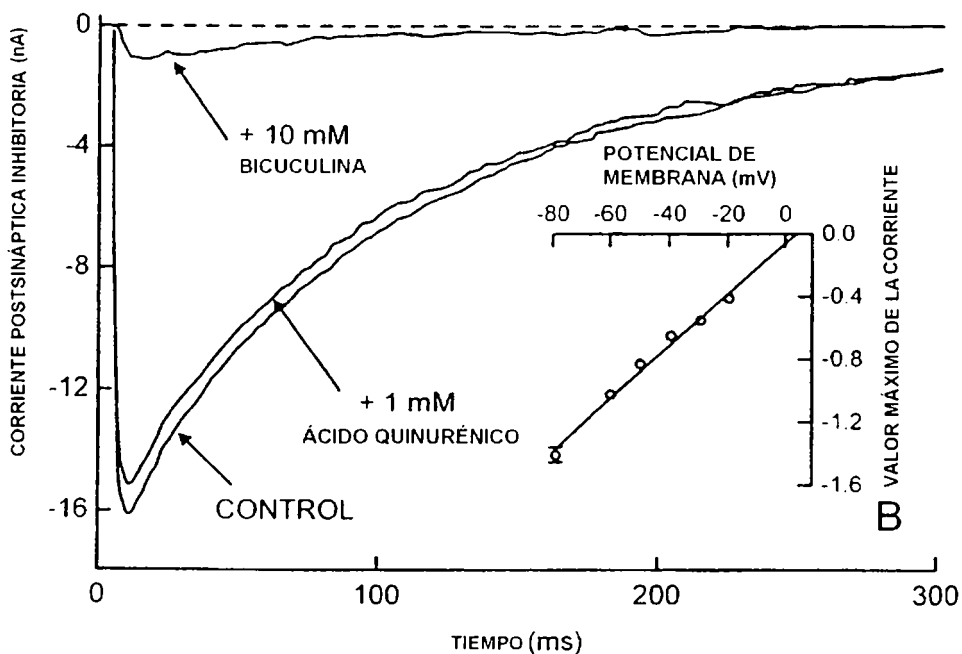
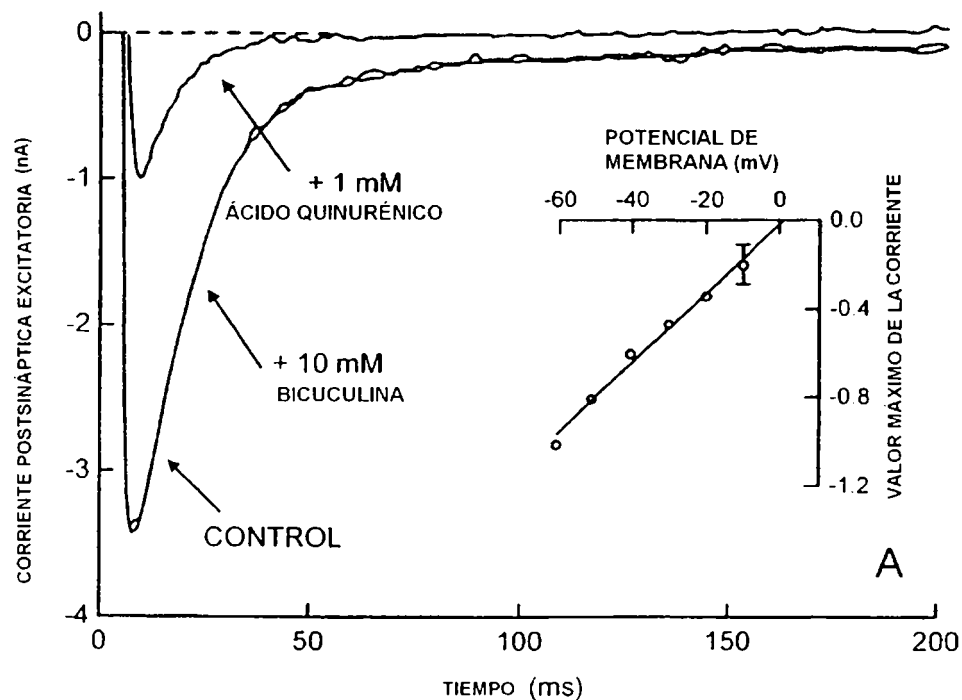


FIG. 1

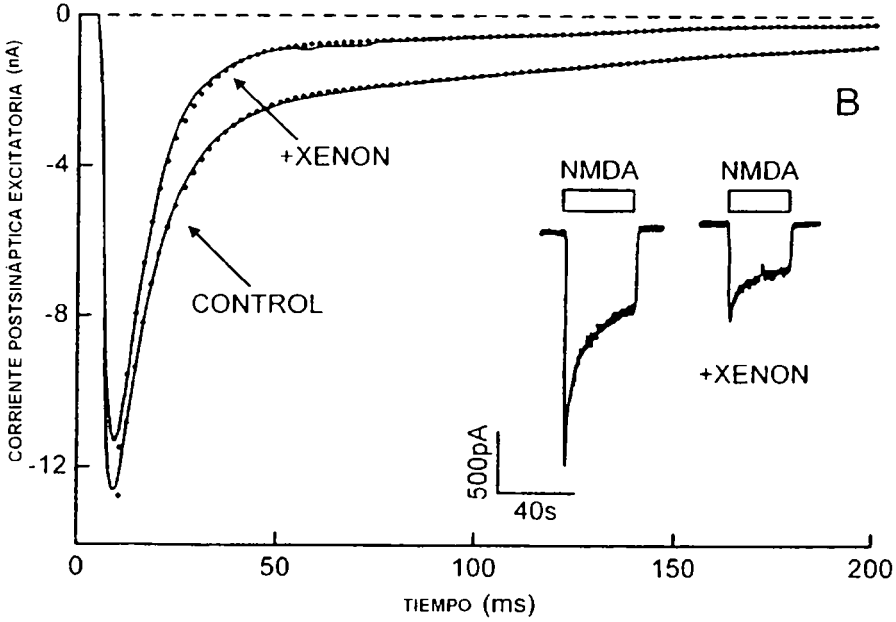
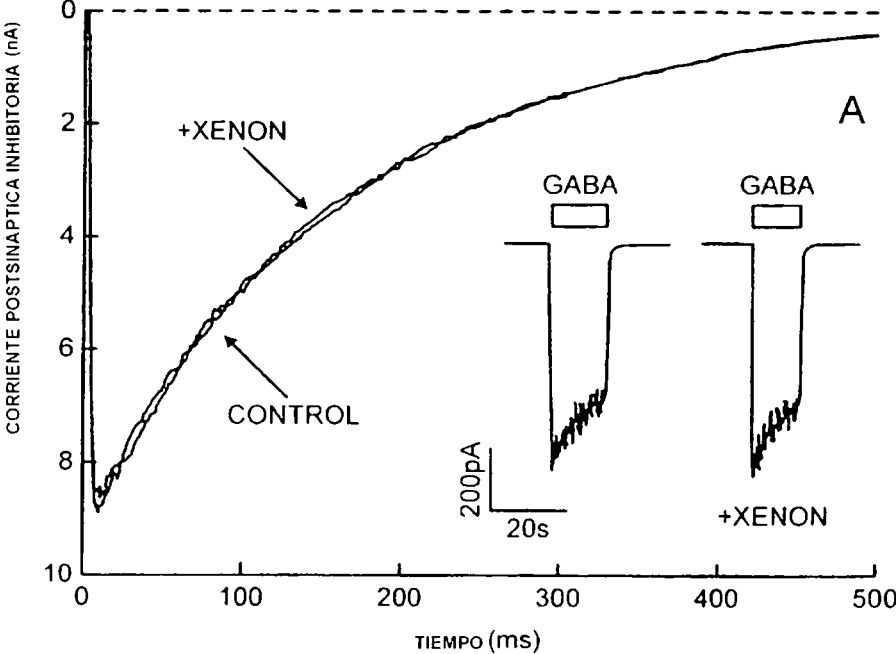


FIG. 2

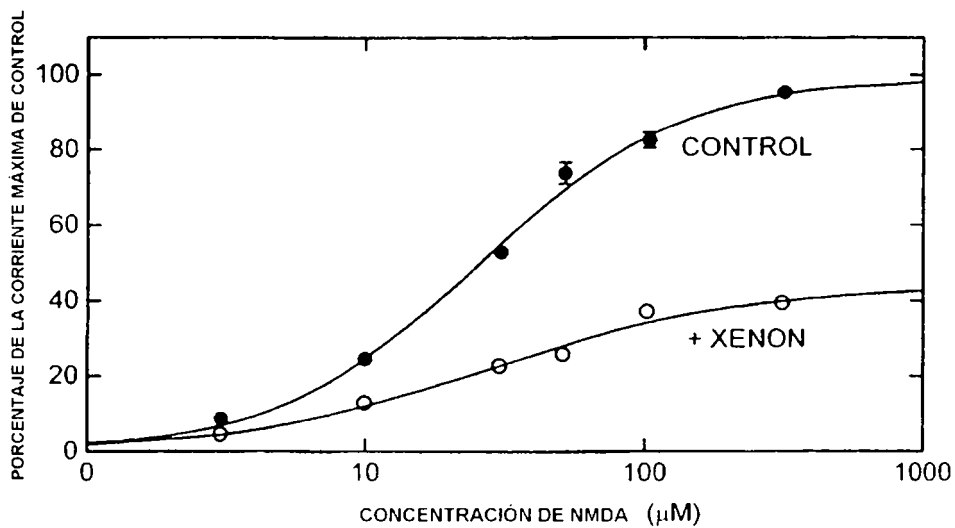


FIG. 3

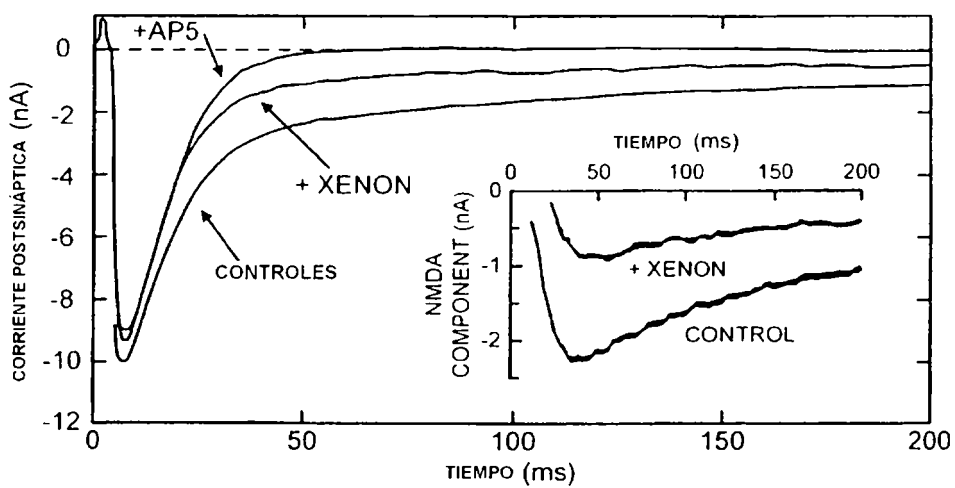


FIG. 4

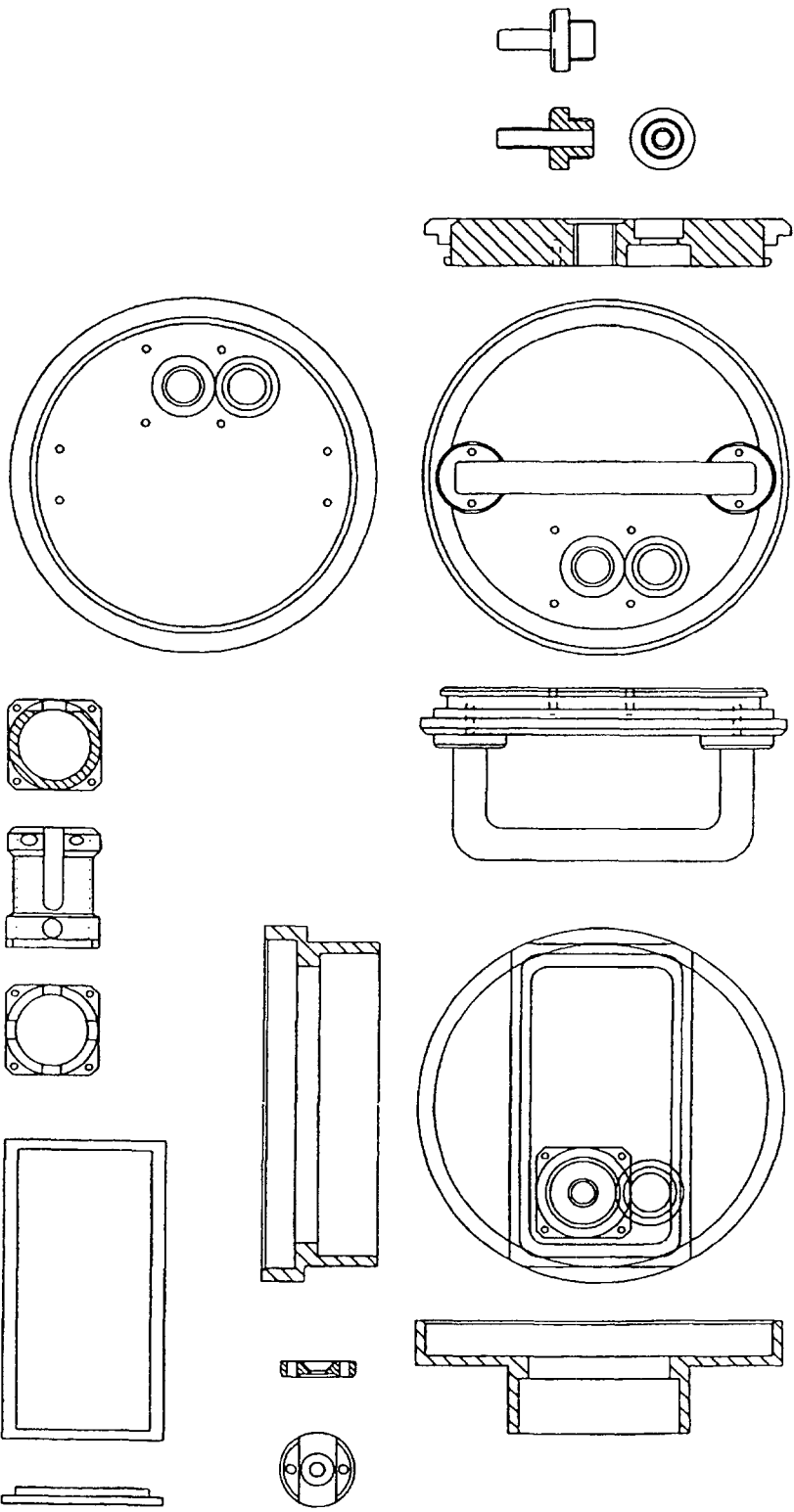


FIG. 5

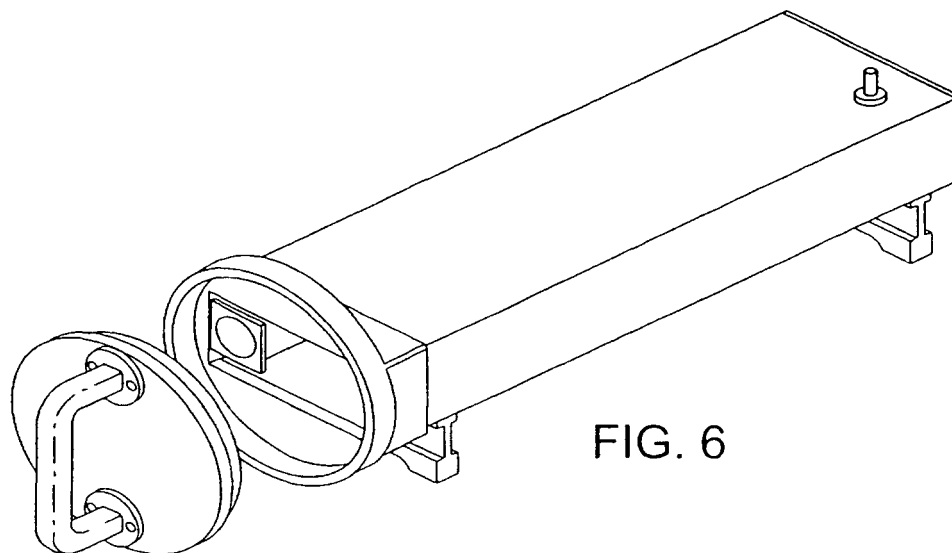


FIG. 6

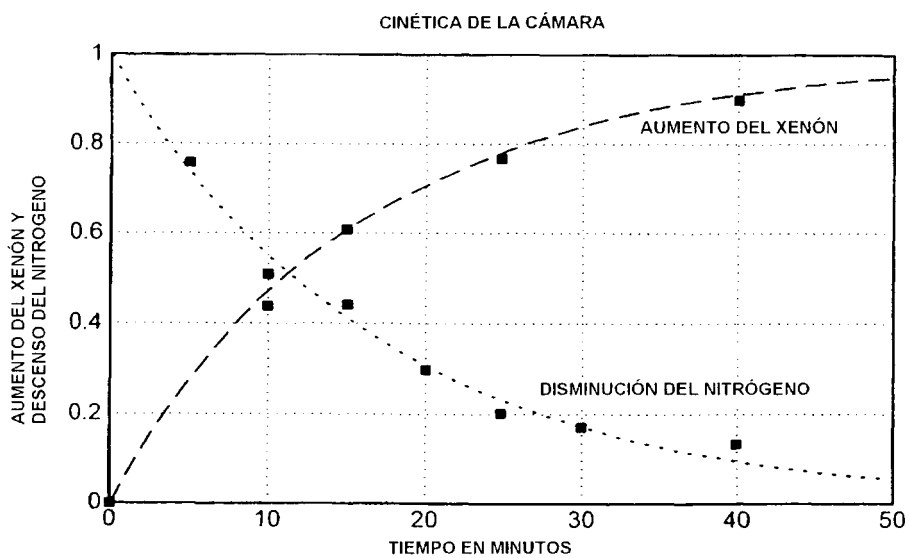


FIG. 7

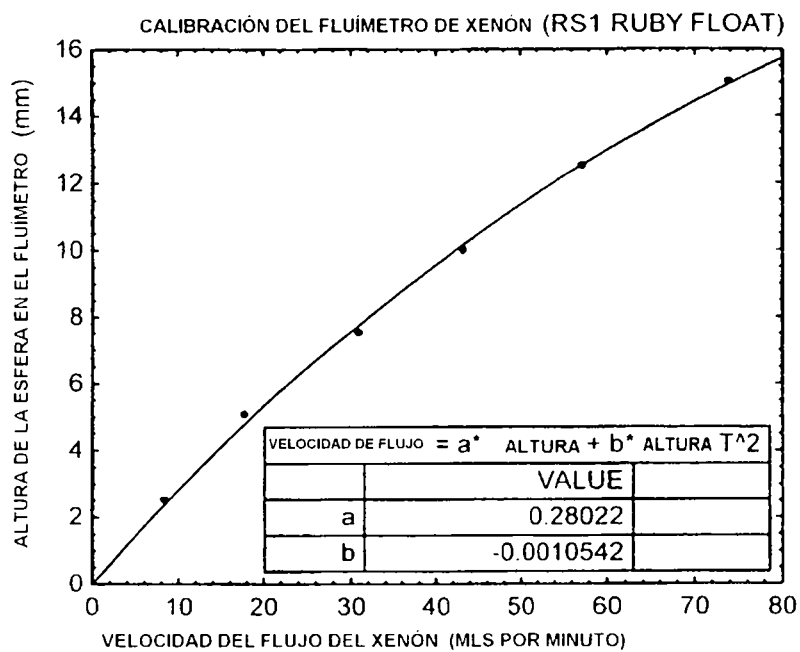


FIG. 8

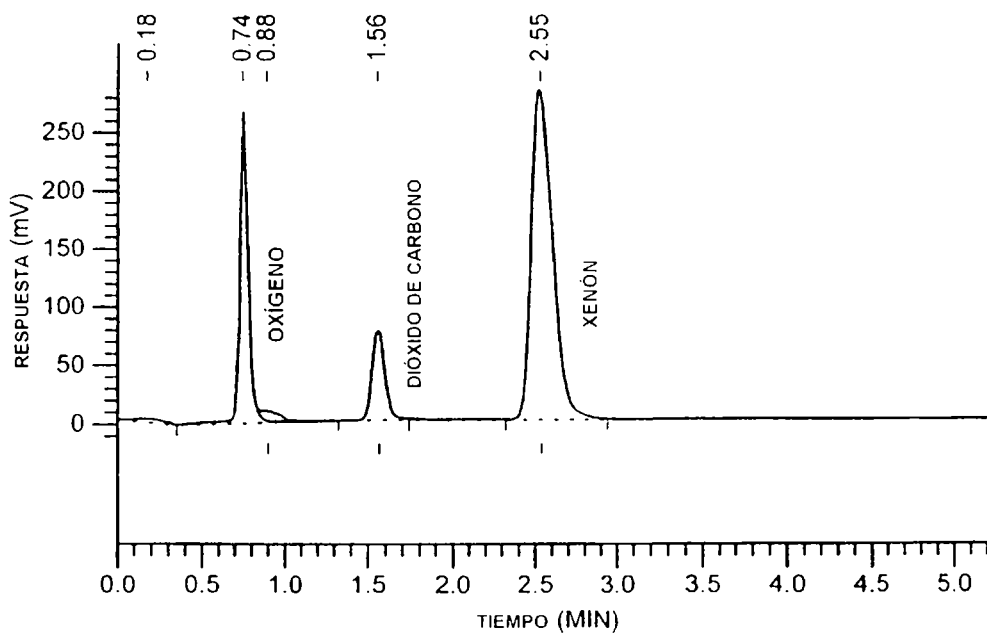


FIG. 9

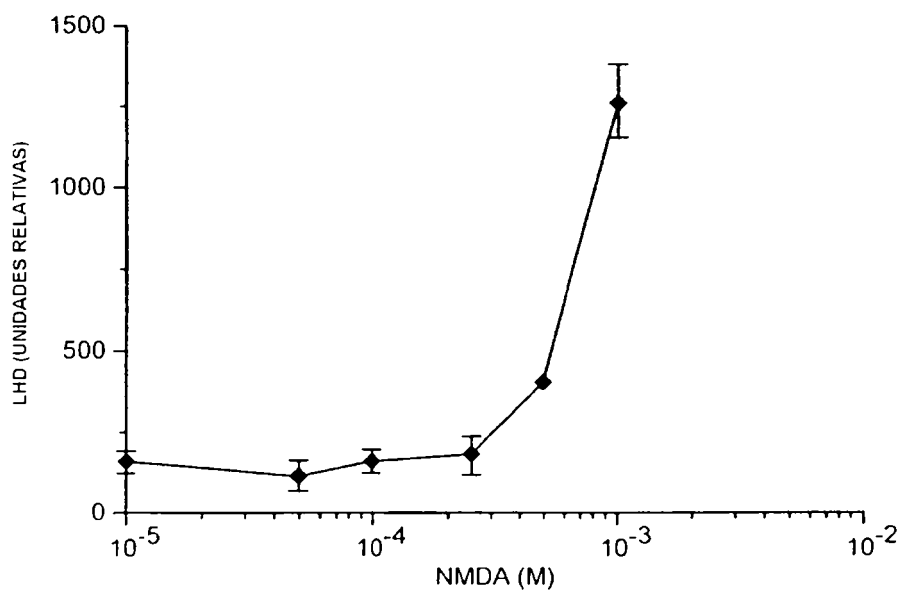


FIG. 10

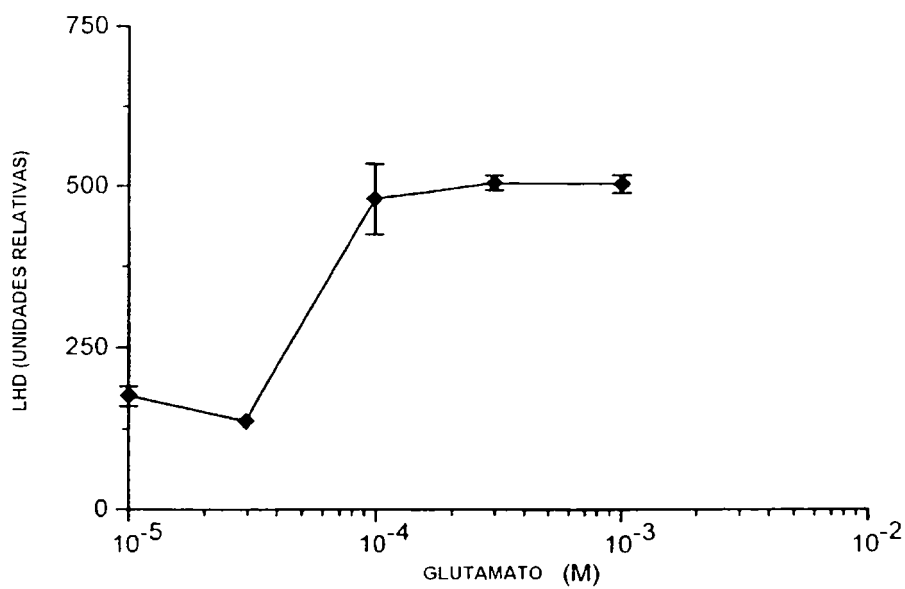


FIG. 11

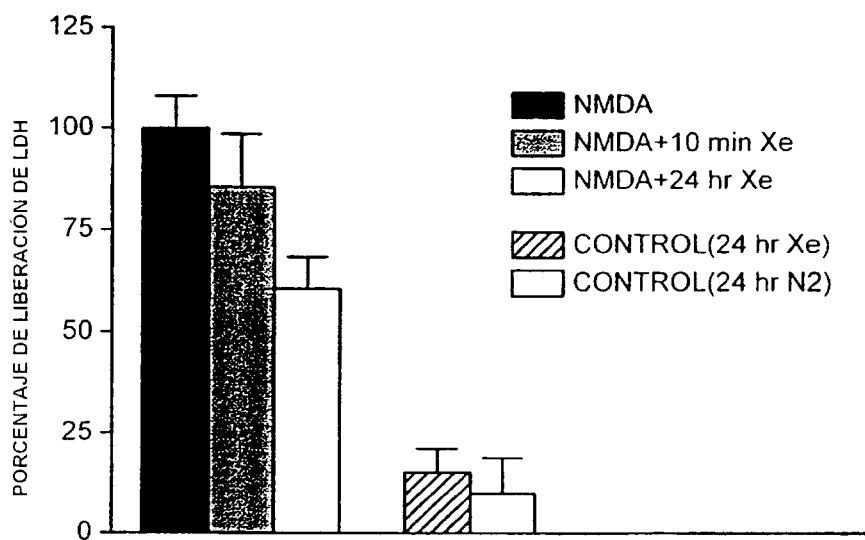


FIG. 12

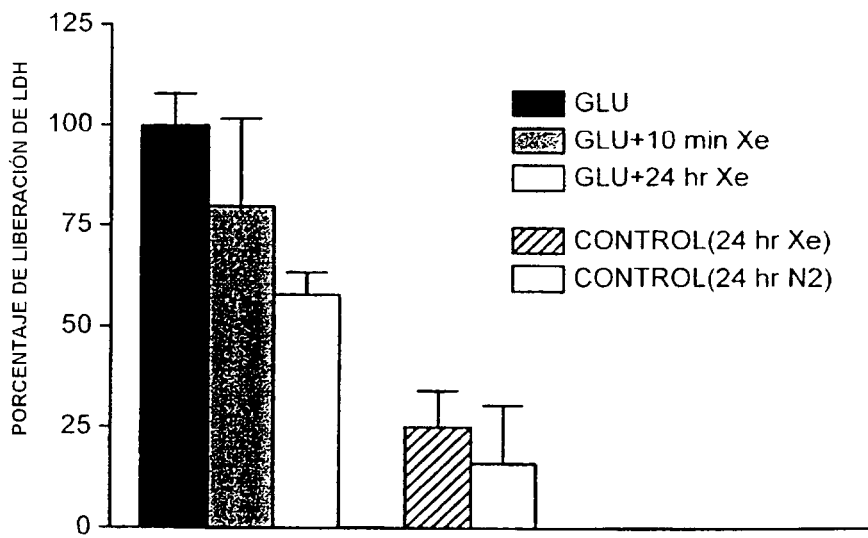


FIG. 13

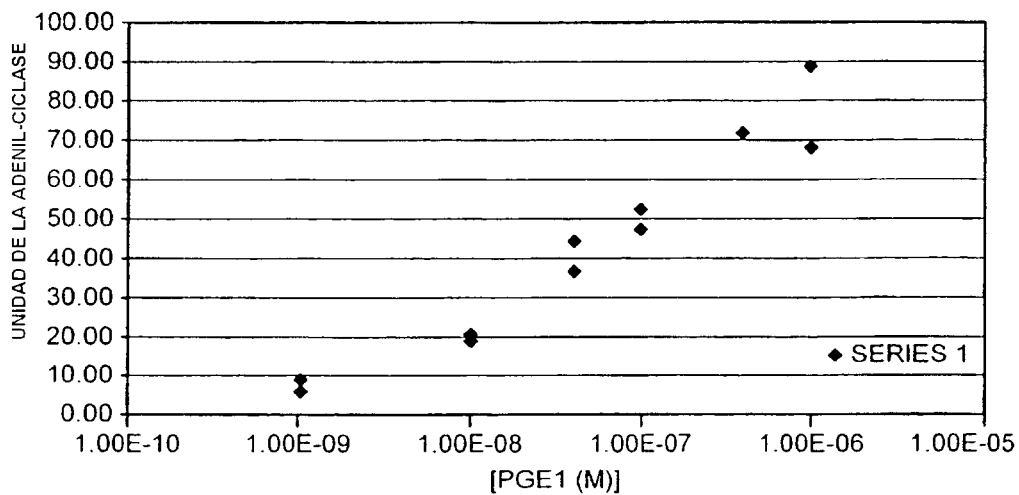


FIG. 14

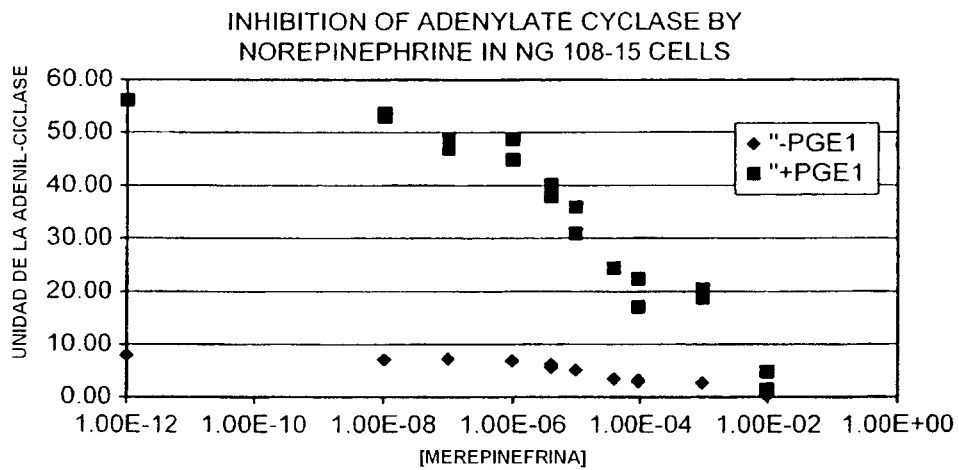


FIG. 15