

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 957 548**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06	(2006.01)	A61K 31/5377	(2006.01)
A61K 31/44	(2006.01)	A61K 31/7076	(2006.01)
A61K 31/4439	(2006.01)	A61P 25/00	(2006.01)
A61K 31/505	(2006.01)		
A61K 31/517	(2006.01)		
A61K 31/519	(2006.01)		
A61K 31/53	(2006.01)		
A61P 43/00	(2006.01)		
A61K 31/4418	(2006.01)		
A61K 31/522	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2017 PCT/GB2017/051029**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017 WO17178820**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2017 E 17718395 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2023 EP 3280414**

54 Título: **Moduladores del receptor de adenosina para el tratamiento de los trastornos del ritmo circadiano**

30 Prioridad:
15.04.2016 GB 201606622

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.01.2024

73 Titular/es:
**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED
(100.0%)
Buxton Court 3 West Way
Botley Oxford OX2 0JB, GB**

72 Inventor/es:
**VASUDEVAN, DR. SRIDHAR;
JAGANNATH, DR. AARTI y
FOSTER, PROF RUSSELL**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 957 548 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

Moduladores del receptor de adenosina para el tratamiento de los trastornos del ritmo circadiano

5 Casi todos los organismos de la Tierra aplican un temporizador biológico interno para anticipar los cambios que acompañan al ciclo solar diario. La posesión de dicho temporizador interno permite a los organismos "saber" inherentemente en qué parte del ciclo solar diario se encuentran, sin recibir señales externas. Dichos ritmos diarios generados internamente se denominan "ritmos circadianos" y son endógenos del organismo.

Los mecanismos subyacentes a los ritmos circadianos implican oscilaciones circadianas en procesos como la expresión génica y las modificaciones de proteínas. Un reloj central controla estas oscilaciones circadianas mediante la generación de señales.

10 El reloj circadiano de los mamíferos en el cerebro transmite ritmicidad de 24 horas a los ciclos de actividad y descanso, la temperatura, el sueño y prácticamente todos los demás procesos fisiológicos y de comportamiento. La imposición de un marco temporal interno es una parte esencial de la biología de un organismo; permite que todos los procesos internos funcionen en armonía, como la expresión génica, la división celular y el metabolismo. Con el fin de que tales ritmos sean adaptativos, deben estar sincronizados o arrastrados con el entorno externo, producido
15 predominantemente por el ciclo de luz/oscuridad de 24 horas debido a la rotación de la Tierra, y/o con otras señales de arrastre, conocidas como "dadores de tiempo" o zeitgebers.

Es clave que los ritmos circadianos sean generados internamente por el organismo y no impulsados por el entorno externo. Sin embargo, estos ritmos circadianos endógenos se ajustan mediante señales ambientales, de modo que están sincronizados con el ciclo o reloj externo.

20 En ausencia de claves o señales externas, el ritmo circadiano endógeno en un ser humano dura de promedio un poco más de 24 horas. Este puede ser el caso de sujetos totalmente ciegos que carecen de percepción consciente de la luz, donde la ausencia total de detección del ciclo de luz/oscuridad puede ser suficiente para que el reloj funcione sin ajuste basado en señales externas. En estos casos, el ritmo circadiano puede requerir una realineación, de modo que el reloj interno funcione al mismo tiempo que el externo.

25 El reloj circadiano interno tiene su propio tiempo, conocido como tiempo circadiano (CT); que es un estándar de tiempo basado en el período de marcha libre de un ritmo (oscilación). Esto puede o no estar alineado con el tiempo externo/ambiental. El CT es efectivamente la hora interna (ya sea para todo el reloj o para el tejido relevante). El tiempo relativo al entorno externo se denomina ZT o tiempo Zeitgeber. En condiciones de arrastre, CT0 = ZT0 = inicio de la fase de luz (típicamente a las 6 o 7 am) y en condiciones de funcionamiento libre, CT0 en un ser humano sería el momento en que ocurre el inicio de la actividad. Es posible determinar el CT de un tejido o de un individuo mediante pruebas, como se analiza más adelante.
30

El mecanismo subyacente al reloj es un bucle de retroalimentación de transcripción-traducción (TTFL) autónomo de células ubicuas en donde los factores de transcripción CLOCK y BMAL1 impulsan la expresión de *Period* (*Per1/2*) y *Criptocromo* (*Cry1/2*), cuyos productos proteicos a su vez se retroalimentan para inhibir CLOCK y BMAL1, lo que da lugar a un circuito de retroalimentación negativa dentro de un período de 24 horas.
35

Cada célula individual de un organismo tiene un reloj celular individual. Los relojes celulares individuales se mantienen en sincronía mediante un marcapasos maestro en los núcleos supraquiasmáticos (SCN) del hipotálamo. Con el fin de adaptarse al mundo externo de 24 horas, el reloj debe recibir y responder a señales que proporcionen señales temporales (zeitgebers). Los Zeitgebers modulan el patrón de expresión temporal de genes de reloj como *Per1/2* (Schwartz et al., Proc Natl Acad Sci U S A 108, 17219-17224, 2011) para establecer la fase, amplitud y período de oscilación del reloj molecular. La luz, que señala el ciclo amanecer-anocheecer, impulsa la transcripción mediada por el factor de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) de los genes *Per*. Sin embargo, los relojes circadianos de todo el cuerpo reciben información de numerosas fuentes, incluidos los alimentos, los glucocorticoides y la temperatura. El reloj molecular recibe información ambiental a través de ligandos que se unen a los receptores nucleares y de la superficie celular y activan vías de señalización posteriores que convergen en el TTFL. Si bien se conocen algunas de estas vías (p. ej., los receptores NMDA envían señales de luz al SCN), la mayoría siguen siendo desconocidas.
40
45

Es posible que las células y/o tejidos del cuerpo tengan un ritmo circadiano que no esté sincronizado con el ritmo central o SCN. En este escenario, las células y/o tejidos corren a un ritmo diferente al del resto del cuerpo. Esto puede dar lugar al desarrollo de patologías en esas células y tejidos, ya que se llevan a cabo procesos fisiológicos en el momento inadecuado.
50

Por ejemplo, se ha mostrado que un reloj circadiano "defectuoso" o desalineado en los tejidos pancreáticos puede estar relacionado con el desarrollo de diabetes. (Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes, Marche et al, Nature, 466, 627-631, julio de 2010).

55 Cuando se produce una falta de sincronización interna entre el reloj biológico de una persona y su horario ambiental de 24 horas, puede ocurrir un grupo de patologías conocidas como trastornos del ritmo circadiano. Esta desincronización puede ocurrir en el SCN y, por lo tanto, en el ritmo circadiano de todo el cuerpo, o puede ocurrir en

tejidos seleccionados periféricos al SCN como se describió anteriormente. Es posible que se produzca una desincronización central o periférica sin ningún síntoma manifiesto. Cuando el ritmo circadiano de un sujeto no está sincronizado con el reloj externo/ambiental, se puede decir que funciona libremente. En última instancia, dado que un reloj que funciona libremente puede durar hasta una hora más que el reloj externo de la ilustración, cada 12 días, el ritmo circadiano del sujeto estará completamente en antifase con respecto al mundo exterior y experimentará síntomas extremos de desfase horario.

Quando el ritmo circadiano y el reloj externo/ambiental no están sincronizados, esto puede tener muchos impactos fisiológicos y conductuales. Varias disfunciones del ritmo circadiano pueden deberse a la falta de sincronía con el reloj externo.

En algunos casos, se puede detectar una desincronización del ritmo circadiano del SCN de una persona debido a que cambia el ritmo de reposo-actividad. Los tiempos de descanso y actividad se pueden medir mediante un sensor de actimetría, por ejemplo. Se ha mostrado una correlación entre la deriva no arrastrada en la fase circadiana y el componente no de 24 h del ritmo de reposo-actividad en sujetos cuando se analizaron los datos de actigrafía de muñeca. Existe la posibilidad de que la desalineación circadiana crónica también pueda tener consecuencias metabólicas, cognitivas y emocionales adversas en sujetos con trastorno No-24 (Emens, Jonathan S. et al. "Non-24-Hour Disorder in Blind Individuals Revisited: Variability and the Influence of Environmental Time Cues ". Sleep 36.7 (2013): 1091-1100. PMC. Web. 7 de abril. 2017).

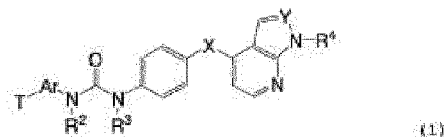
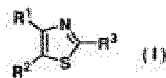
Se pueden introducir disfunciones o desalineaciones del ritmo circadiano en un individuo, tal como mediante intervención farmacológica. Por ejemplo, se ha mostrado que algunos tratamientos contra el cáncer son capaces de alterar el ritmo circadiano (Ortiz-Tudela E., et al, Int. J Cancer. 1 de junio de 2014; 134(11): 2717-25.) Tales disfunciones en el ritmo circadiano pueden correlacionarse con peores resultados del tratamiento y, por lo tanto, es importante que estas se reconozcan y aborden. Por el contrario, también se sabe que algunas proteínas a las que se dirigen los agentes farmacológicos se expresan solo durante ciertos momentos del día y esto puede ocurrir fuera del horario de vigilia del paciente (p. ej., a las 3 am). En estas circunstancias, sería útil alterar los ritmos circadianos para alinear el "tiempo del fármaco " con el tiempo de vigilia.

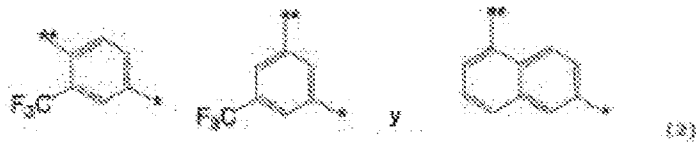
La desalineación del ritmo circadiano también puede ocurrir cuando las personas viajan a través de zonas horarias. El desfase horario, también descrito como desincronosis y arritmia circadiana, es una afección fisiológica que resulta de un viaje rápido transmeridiano de larga distancia (este-oeste u oeste-este).

Además, puede producirse una desalineación del ritmo circadiano en los trabajadores por turnos, que trabajan por la tarde y durante la noche, ya que están activos durante su ciclo de descanso normal. El trastorno del trabajo por turnos es un trastorno reconocido del ritmo circadiano.

Ciertos trastornos del ritmo circadiano pueden ser trastornos del ritmo circadiano del sueño, donde la desalineación del reloj circadiano se manifiesta en el momento del sueño, que a su vez está determinado por el ritmo de reposo-actividad.

Los métodos actuales de tratamiento de los trastornos del ritmo circadiano se centran principalmente en la terapia con luz brillante y el uso de agonistas de los receptores de melatonina. Estos métodos tienen sus inconvenientes; no son uniformemente efectivos; por ejemplo, no se ha mostrado que la melatonina tenga ningún efecto en el síndrome de la fase avanzada del sueño o en el desfase horario en los viajes hacia el oeste, y se observan resultados mixtos en el trastorno del trabajo por turnos y en los trastornos del sueño fuera de las 24 horas. La terapia con luz brillante requiere exposición a altos niveles de luz (2.500-10.000 lux) en ventanas de tiempo precisas cada día (revisado en Zee et al., 2013, Circadian rhythm abnormalities. Continuum: Lifelong Learning in Neurology, 19 (1, Sleep Disorders), 132-147) y para que el sujeto sea avistado. Además, la técnica anterior (EP1921077A1) divulga un agente terapéutico y/o preventivo para un trastorno del sueño que comprende, como ingrediente activo, un derivado de tiazol representado por la fórmula general (I), [en donde R 1 representa un grupo heterocíclico aromático de cinco miembros que incluye al menos un átomo de oxígeno, o similares, R 2 representa halógeno o similares, y R 3 representa -NR 10 R 11 (en donde R 10 y R 11 pueden ser iguales o diferentes, y cada uno representa un átomo de hidrógeno o similar), o similares] o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.





También, John R. Atack et al 2014 (CHEMICAL NEUROSCIENCE, US, (20141015), vol. 5, no. 10, páginas 1005 - 1019) divulga JNJ-40255293, un nuevo antagonista de adenosina A_{2A} / A₁ con eficacia en modelos preclínicos de la enfermedad de Parkinson.

5 La presente invención utiliza la vía de señalización de la adenosina, una vía reguladora del reloj novedosa y no caracterizada, como diana para fines terapéuticos. Más particularmente, la presente invención aprovecha la modulación de al menos dos receptores de adenosina, para utilizar la vía de señalización de adenosina para alterar y/o realinear el ritmo circadiano de un individuo. Los presentes inventores se han dado cuenta de que para que sea fisiológicamente relevante y también tolerable para el sujeto, el tratamiento para mover o cambiar un ritmo circadiano (por cualquier motivo) requiere la modificación de al menos dos subtipos de receptores de adenosina. Esto es deseable; ya que parecería que diferentes subtipos de receptores de adenosina pueden modular el ritmo circadiano a través de diferentes vías, y que el efecto acumulativo es mucho más prometedor que la modulación de un solo receptor. Los resultados incluidos aquí demuestran que al menos el receptor A₁ y el receptor A_{2A} utilizan diferentes vías de señalización, y que la combinación selectiva de moduladores en estos receptores es ventajosa para modificar, cambiar o mover el reloj o ritmo circadiano de un individuo. Se puede ver en las Figuras y Ejemplos que solo es posible inducir la expresión de *Per1* y *Per2* tomando como diana dos subtipos de receptores de adenosina, en los ejemplos estos son el receptor A₁ y el receptor A_{2A}. Tal y como se usa en la presente memoria, los receptores de adenosina y los subtipos de receptores de adenosina se refieren a los receptores o subtipos de receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} y/o A₃.

10 No es deseable modificar un único subtipo de receptor de adenosina utilizando una única terapia experimental, ya que tiene un efecto menos potente sobre el reloj circadiano y, además, se asocia con un mayor riesgo de efectos secundarios graves del tratamiento. Por ejemplo, los ensayos clínicos para el uso de antagonistas selectivos del receptor A₁ se han detenido debido a que los sujetos sufrieron convulsiones. Por lo tanto, los expertos en la técnica considerarían que el uso de antagonistas del receptor A₁ para modificar el ritmo circadiano están contraindicados por el riesgo de efectos secundarios graves y, por tanto, su uso no sería terapéuticamente relevante. Además, tampoco es terapéuticamente relevante modificar todos los subtipos de receptores de adenosina. La modificación de todos los subtipos conduce a efectos secundarios no deseados, ya que los receptores de adenosina se expresan de manera ubicua en diferentes tejidos y pueden tener muchas funciones fisiológicas. Por tanto, el uso de cafeína, que antagoniza todos los tipos de receptores de adenosina (AR): A₁, A_{2A}, A₃ y A_{2B} y compuestos similares quedan fuera del alcance de esta invención. Muchos de los primeros moduladores de los receptores de adenosina desarrollados también modularían todos los subtipos de receptores. Dichos compuestos incluyen CGS 15943. Este último compuesto puede unirse a los cuatro receptores de adenosinas. Como tal, este compuesto queda fuera del alcance de la presente invención.

En la presente memoria se divulga, pero no se reivindica, un modulador del receptor de adenosina para su uso en el tratamiento de trastornos del ritmo circadiano.

15 Un modulador del receptor de adenosina se refiere a un modulador que actúa como agonista, agonista inverso o antagonista del receptor de adenosina. El modulador es preferiblemente un antagonista o agonista inverso.

20 Un 'receptor de adenosina' es una clase de receptores purigénicos acoplados a proteína G con adenosina como ligando endógeno. Estos receptores están ampliamente distribuidos por todo el cuerpo y se dividen en cuatro subclases, que incluyen los receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃. La adenosina funciona como una molécula de señalización mediante la activación de estos cuatro receptores de adenosina distintos, que se expresan ampliamente y han sido implicados en varias funciones biológicas, tanto fisiológicas como patológicas. Los receptores de adenosina se presentan como cuatro subtipos diferentes de GPCR, con los subtipos de receptores A_{2A} y A_{2B} acoplados a G_s y los subtipos de receptores A₁ y A₃ acoplados a G_i. La expresión diferencial de estos receptores puede conducir a efectos aguas abajo muy diferentes de la señalización de adenosina a través de diversos efectores.

25 En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende al menos un modulador selectivo del receptor de adenosina, en donde dicho modulador antagoniza los subtipos de receptor de adenosina A₁ y A_{2A} para su uso en el tratamiento de trastornos del ritmo circadiano o para su uso en la modulación de un reloj biológico. La composición puede no comprender un modulador de los receptores de adenosina A_{2B} o A₃.

30 El receptor de adenosina al que se dirige el modulador o la composición puede estar presente en cualquier tejido. El receptor de adenosina puede estar en el cerebro, más notablemente en el hipotálamo y más particularmente en el núcleo supraquiasmático (SCN). El receptor de adenosina puede estar en tejidos periféricos del cerebro. El tejido periférico del cerebro puede incluir cualquier tipo de célula, tejido u órgano que no forme parte del cerebro. Estos pueden ser, sin limitación: células sanguíneas y del sistema inmunológico, células de la médula ósea, células epiteliales o de la piel, células germinales, células contráctiles y musculares, neuronas, células secretoras de hormonas y células secretoras. Estos también pueden ser de tipos de tejido muscular, epitelial, conectivo y nervioso, más específicamente tejido u órganos del sistema cardiovascular, pulmones, corazón, sistema circulatorio, sistema

inmunológico o linfático, estómago, páncreas, hígado, bazo, intestino delgado o grueso, tejidos reproductivos, riñones, vejiga o sistema urinario, músculo, médula ósea, piel, sistema endocrino o sistema nervioso periférico.

5 El modulador puede tener buena afinidad por los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}, pero no los cuatro subtipos de receptores. El modulador tendrá afinidad y se unirá a los receptores de adenosina A₁ y A_{2A} y, opcionalmente, los receptores de adenosina A_{2B} o A₃. Preferiblemente, el modulador tendrá afinidad y se unirá a los subtipos de receptores de adenosina A₁ y A_{2A}, y no tiene afinidad ni se une a los dos subtipos restantes. La afinidad puede definirse como la capacidad del modulador para unirse al receptor afín y medirse utilizando la ocupación del receptor. Una buena afinidad por un receptor significa en este contexto que más de aproximadamente el 25 % de los receptores están ocupados por el modulador. Una afinidad deseable por el receptor puede estar en la región del 15 %-90 % de ocupación del receptor, del 15 % al 80 % de ocupación, del 20 % al 70 % de ocupación, preferiblemente del 20 % al 50 % de ocupación o del 20 % al 40 % de ocupación. La afinidad puede definirse además como la probabilidad de que el modulador ocupe el receptor en cualquier instante dado.

El modulador o modulador selectivo puede unirse a su receptor de adenosina afín mediante cualquier mecanismo apropiado, incluyendo de forma alostérica u ortostérica.

15 El modulador puede ser selectivo para los subtipos de receptores de adenosina A₁ y A_{2A} y un tercer subtipo de receptores de adenosina, pero no tiene afinidad por los cuatro subtipos. Un modulador selectivo es preferentemente selectivo solo para uno o dos subtipos de receptores de adenosina. Por tanto, los moduladores no selectivos del receptor de adenosina que modulan todos los subtipos de receptores no entran dentro del alcance de la invención.

20 Preferiblemente, el modulador del receptor de adenosina se proporciona como una composición, comprendiendo dicha composición al menos un modulador selectivo del receptor de adenosina, en donde dicha composición antagoniza los subtipos de receptores de adenosina A₁ y A_{2A} y, opcionalmente, los subtipos de receptores de adenosina A_{2B} o A₃. Por tanto, se prefiere modular los subtipos de receptores de adenosina A₁ y A_{2A}, pero no todos los subtipos de receptores de adenosina en los usos y métodos de la invención. Opcionalmente, la composición comprende uno o dos moduladores selectivos del receptor de adenosina que actúan en uno o dos subtipos de receptores de adenosina. 25 Estos moduladores selectivos del receptor de adenosina no tienen afinidad por los otros dos subtipos de receptores y preferiblemente no se unen ni interactúan en absoluto con estos receptores.

La composición antagoniza los subtipos de receptores A₁ y A_{2A}, opcionalmente A_{2B}. Se prefiere que ninguno de los otros subtipos de receptores de adenosina esté modulado. Los otros subtipos de receptores son los que no están especificados ni enumerados, es decir, para una modulación específica de los subtipos de receptores A₁ y A_{2A}, se prefiere que los subtipos de receptores A_{2B} y/o A₃ no estén modulados. Se prefiere que una composición o modulador selectivo se una sólo a los subtipos de receptores A₁ y A_{2A} y no a los subtipos de receptores A_{2B} y/o A₃. Opcionalmente, la composición puede comprender un modulador selectivo de adenosina que sea selectivo para los subtipos de receptores A₁ y A_{2A}.

35 El modulador selectivo del receptor de adenosina puede tener al menos un 20 % de afinidad, o al menos un 30 % de afinidad, o al menos un 40 % de afinidad o al menos un 50 % de afinidad o al menos un 60 % de afinidad o al menos un 70 % de afinidad o al menos un 80 % de afinidad. o al menos un 90 % de afinidad o más por uno, dos o tres de los receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, con la condición de que el modulador selectivo del receptor de adenosina o la composición no tenga afinidad por los cuatro subtipos de receptores. Se prefiere que el modulador selectivo de adenosina tenga afinidad por sólo dos subtipos de receptores, es decir, que sea un antagonista dual o un agonista inverso. El modulador selectivo del receptor de adenosina puede tener una afinidad única o específica por cada uno de sus receptores afines. Por ejemplo, un modulador selectivo del receptor de adenosina puede tener una afinidad del 50 % por el receptor de adenosina A₁ y una afinidad del 55 % por el receptor de adenosina A_{2A}.

45 El modulador selectivo del receptor de adenosina puede tener al menos un 20 % de afinidad, o al menos un 30 % de afinidad, o al menos un 40 % de afinidad o al menos un 50 % de afinidad o al menos un 60 % de afinidad o al menos un 70 % de afinidad o al menos un 80 % de afinidad. o al menos un 90 % de afinidad o más por el receptor de adenosina A₁. El modulador selectivo puede tener una afinidad del 25 % o más por el receptor de adenosina A₁. Preferiblemente, el modulador tiene 50-70 % de afinidad por el receptor de adenosina A₁. El uso de un modulador selectivo del receptor de adenosina contra el receptor A₁ solo no entra dentro del alcance de esta invención. También debe modificarse al menos otro receptor de adenosina, ya sea por el mismo compuesto o por una combinación de moduladores selectivos.

50 El modulador selectivo del receptor de adenosina puede tener al menos un 20 % de afinidad, o al menos un 30 % de afinidad, o al menos un 40 % de afinidad o al menos un 50 % de afinidad o al menos un 60 % de afinidad o al menos un 70 % de afinidad o al menos un 80 % de afinidad. o al menos un 90 % de afinidad o más por el receptor A_{2A}. Preferiblemente, el modulador del receptor de adenosina tiene al menos un 30% de afinidad por el receptor de adenosina A_{2A}. El modulador selectivo puede tener una afinidad del 25 % o más por el receptor de adenosina A_{2A}. Preferiblemente, el modulador tiene 50-70 % de afinidad por el receptor de adenosina A_{2A}. El uso de un modulador selectivo del receptor de adenosina contra el receptor A_{2A} solo no entra dentro del alcance de esta invención. También debe modificarse al menos otro receptor de adenosina, ya sea por el mismo compuesto o por una combinación de moduladores selectivos.

El modulador selectivo del receptor de adenosina puede tener al menos un 20 % de afinidad, o al menos un 30 % de afinidad, o al menos un 40 % de afinidad o al menos un 50 % de afinidad o al menos un 60 % de afinidad o al menos un 70 % de afinidad o al menos un 80 % de afinidad. o al menos un 90 % de afinidad o más por el receptor A_{2B}. El modulador selectivo puede tener una afinidad del 25 % o más por el receptor de adenosina A_{2B}. El modulador selectivo del receptor de adenosina puede tener al menos un 30 % de afinidad por el receptor de adenosina A_{2B}. Preferiblemente, el modulador tiene 50-70 % de afinidad por el receptor de adenosina A_{2B}.

El modulador selectivo del receptor de adenosina puede tener al menos un 20 % de afinidad, o al menos un 30 % de afinidad, o al menos un 40 % de afinidad o al menos un 50 % de afinidad o al menos un 60 % de afinidad o al menos un 70 % de afinidad o al menos un 80 % de afinidad. o al menos un 90 % de afinidad o más por el receptor de adenosina A₃. El modulador selectivo puede tener una afinidad del 25 % o más por el receptor de adenosina A₃. Preferiblemente, el modulador tiene 50-70 % de afinidad por el receptor de adenosina A₃.

En la presente memoria se divulga, pero no se reivindica, una composición que comprende 2 moduladores selectivos del receptor de adenosina, en donde cada uno de los cuales es específico para los subtipos de receptores de adenosina A₁ y A_{2A}. En la presente memoria se divulga, pero no se reivindica, una composición que comprende 3 moduladores selectivos del receptor de adenosina en donde cada uno de los cuales es específico para los subtipos de receptores de adenosina A₁ y A_{2A} y el subtipo de receptor de adenosina A_{2B} o A₃. Cada uno de los moduladores selectivos se puede definir como se describió anteriormente, y cada uno puede tener una afinidad diferente por su receptor afín. Puede usarse un modulador selectivo del receptor de adenosina en la composición que es selectivo para dos subtipos de receptor de adenosina, en combinación con un segundo modulador selectivo del receptor de adenosina que es selectivo para un tercer subtipo de receptor de adenosina. Alternativamente, podrían usarse tres moduladores selectivos individuales, cada uno de los cuales modula un receptor de adenosina diferente.

La afinidad como se usa en la presente memoria puede correlacionarse con la ocupación del receptor, de modo que una afinidad de al menos el 20 % se correlacionaría con una ocupación de al menos el 20 %, es decir, al menos el 20 % del receptor expresado está ocupado por el modulador. La ocupación del receptor se puede cuantificar mediante métodos de rutina, incluidos ensayos de citometría de flujo y ensayos de unión de radioligandos. Es deseable una ocupación de al menos aproximadamente el 25 % para indicar que el modulador tiene una buena afinidad por el receptor.

Preferiblemente, no todos los subtipos de receptores de adenosina están modificados. Cuando se desea que un subtipo de receptor de adenosina particular o especificado no se modifique, ese modulador o composición tiene afinidad limitada o nula por ese subtipo de receptor de adenosina. Esto significa que el modulador o composición del receptor de adenosina muestra menos del 10 % de afinidad, preferiblemente menos del 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % de afinidad por el subtipo de receptor de adenosina especificado. El modulador o composición del receptor de adenosina no muestra afinidad por el subtipo de receptor de adenosina especificado. El modulador del receptor de adenosina preferiblemente no se une ni interactúa con el subtipo de receptor especificado. El subtipo de receptor "especificado" puede identificarse por omisión. Por ejemplo, si se describe que un modulador selectivo actúa selectivamente en los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}, entonces, por su naturaleza, no actúa en los receptores de adenosina A_{2B} y A₃.

El modulador selectivo de la invención puede ser un modulador de los receptores de adenosina A₁, A_{2A} y A_{2B}. El modulador selectivo puede no ser un modulador del receptor de adenosina A₃.

El modulador selectivo de la invención puede ser un modulador de los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}. El modulador selectivo puede no ser un modulador de los receptores de adenosina A_{2B} o A₃.

En la presente memoria se divulga, pero no se reivindica, que el modulador, el modulador selectivo o la composición están destinados a modular los receptores de adenosina en el cerebro, preferiblemente en el hipotálamo, opcionalmente en el SCN.

En la presente memoria se divulga, pero no se reivindica, que el modulador, el modulador selectivo o la composición están destinados a modular los receptores de adenosina en el pulmón. Esto puede usarse para gestionar o tratar el asma.

En la presente memoria se divulga, pero no se reivindica, que el modulador, el modulador selectivo o la composición están destinados a modular los receptores de adenosina en el páncreas. Esto puede usarse para gestionar o tratar la diabetes.

El modulador, modulador selectivo o composición se puede usar para modular los receptores de adenosina en un tipo de célula, tipo de tejido u órgano específico. Puede ser cualquier tipo de célula, tipo de tejido u órgano. Los tipos de células ejemplares incluyen, pero no se limitan a: células sanguíneas y del sistema inmunológico, células de la médula ósea, células epiteliales o de la piel, células germinales, células contráctiles y musculares, neuronas, células secretoras de hormonas y células secretoras. Estos también pueden ser de tipos de tejido muscular, epitelial, conectivo y nervioso, más específicamente tejido u órganos del sistema cardiovascular, pulmones, corazón, sistema circulatorio, sistema inmunológico o linfático, estómago, páncreas, hígado, bazo, intestino delgado o grueso, tejidos reproductivos, riñones, vejiga o sistema urinario, músculo, médula ósea, piel, sistema endocrino o sistema nervioso periférico.

Como se mencionó anteriormente, un aspecto de la invención proporciona una composición que comprende al menos un modulador selectivo del receptor de adenosina, en donde dicha composición antagoniza los subtipos del receptor

de adenosina A₁ y A_{2A} para su uso en el tratamiento de trastornos del ritmo circadiano o para su uso en la modulación de un reloj biológico. La composición puede no comprender un modulador de los receptores de adenosina A_{2B} o A₃.

Un trastorno del ritmo circadiano y la modulación de un reloj biológico son como se definen en la presente memoria.

5 Puede ser deseable modular un reloj biológico, también conocido como reloj circadiano, en situaciones en donde el ritmo circadiano del individuo no se altera de otro modo. Se ha descubierto que los tiempos de algunas intervenciones farmacológicas son importantes en relación con su eficacia, ya que pueden apuntar a una función celular particular que ocurre en ese "tiempo circadiano: CT". Por ejemplo, se ha descubierto que CT 15 (10 pm si está sincronizado con el reloj externo) puede ser un momento efectivo para administrar ciertos fármacos de quimioterapia (Lévi F et al, Circadian timing in cancer treatments. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2010; 50:377-421.) Este no es un momento socialmente aceptable para que el paciente o el médico administren fármacos. Por lo tanto, es posible modular su reloj biológico, de modo que no esté sincronizado con el reloj externo. Por tanto, la administración de un modulador o composición selectiva se puede utilizar para cambiar el reloj biológico y llevar el tiempo de CT efectivo para el tratamiento a un tiempo externo mejor.

15 Las razones alternativas para modular el reloj biológico pueden incluir viajes internacionales, preparación para el trabajo por turnos u otras razones sociales no relacionadas con la salud para desear modificar los ciclos de reposo-actividad.

20 Por lo tanto, en la presente memoria se divulgan, pero no se reivindican, métodos de tratamiento no médicos, tales como un método para modular un reloj biológico que comprende la administración de una composición que comprende al menos un modulador selectivo del receptor de adenosina, en donde dicha composición modula los subtipos de receptores de adenosina A₁ y A_{2A} y, opcionalmente, los subtipos de receptores de adenosina A_{2B} o A₃. Preferiblemente, se modulan dos subtipos de receptores de adenosina. En la presente memoria se divulgan, pero no se reivindican, métodos de tratamiento médico en un método para modular un reloj biológico o tratar un trastorno o disfunción del ritmo circadiano, que comprende la administración de una composición que comprende al menos un modulador selectivo del receptor de adenosina, en donde dicha composición modula los subtipos de receptores de adenosina A₁ y A_{2A}.

25 En una realización, es una composición que comprende al menos un modulador selectivo del receptor de adenosina, en donde dicha composición antagoniza los subtipos de receptores de adenosina A₁ y A_{2A} y, opcionalmente, los subtipos de receptores de adenosina A_{2B} o A₃, para su uso en la realineación circadiana. Preferiblemente, la composición es selectiva solo para los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}. La composición puede no comprender un modulador de los receptores de adenosina A_{2B} o A₃.

30 En la presente memoria también se divulga, pero no se reivindica, un método de realineamiento del ritmo circadiano que comprende la administración una vez al día de un compuesto que comprende al menos un modulador selectivo del receptor de adenosina, en donde dicha composición modula los subtipos de receptores de adenosina A₁ y A_{2A} y, opcionalmente, los subtipos de receptores de adenosina A_{2B} o A₃. Preferiblemente la composición es selectiva solo para los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}. La composición puede no comprender un modulador de los receptores de adenosina A_{2B} o A₃.

35 En una realización, es una composición que comprende al menos un modulador selectivo del receptor de adenosina, en donde dicha composición antagoniza los subtipos de receptores de adenosina A₁ y A_{2A} y, opcionalmente, los subtipos de receptores de adenosina A_{2B} o A₃, para su uso en el realineamiento o ajuste circadiano mediante administración una vez al día. Preferiblemente, la composición es selectiva solo para los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}. La composición puede no comprender un modulador de los receptores de adenosina A_{2B} o A₃.

40 Se prefiere para todos los aspectos y realizaciones de la invención que el modulador, modulador selectivo o composición se administre una vez al día. Esta administración una vez al día envía una poderosa señal para alterar el ritmo circadiano, y no deberían ser necesarias ni deseables administraciones repetidas dentro de un período de 24 horas.

El momento de esta única administración altera profundamente el ritmo o reloj circadiano.

45 Con el fin de avanzar el ritmo circadiano o reloj biológico de un individuo (o una célula, tejido u órgano del mismo) según cualquier aspecto o realización de la invención, se prefiere administrar el modulador, modulador selectivo o composición entre aproximadamente CT4 a 8, preferiblemente entre CT5 y 7, o en CT6. "Avanzar" el ritmo circadiano significa adelantar el ritmo en el día externo.

50 Con el fin de retrasar el ritmo circadiano de un individuo (o una célula, tejido u órgano del mismo) según cualquier aspecto o realización de la invención, se prefiere administrar el modulador, modulador selectivo o composición entre aproximadamente CT14 a 18, preferiblemente entre CT15 y 17, o en CT16. "Retrasar" el ritmo circadiano significa empujar el ritmo hacia atrás en el día externo.

55 El modulador, modulador selectivo o composición de la invención puede dar como resultado un aumento de la expresión génica de *Per1* después de la administración a un sujeto. Preferiblemente, el aumento se observa al menos de 2 a 6 horas después de la administración, preferiblemente al menos 4 horas después de la administración. El aumento de la expresión de *Per1* puede ser un aumento de aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 100 %.

aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 100 % o más en la expresión en comparación con en un sujeto sin la administración del modulador. El aumento de la expresión de *Per1* puede determinarse a nivel de ARN o de proteína.

5 El modulador, modulador selectivo o composición de la invención puede dar como resultado un aumento de la expresión génica de *Per2* después de la administración a un sujeto. Preferiblemente el aumento se observa al menos de 2 a 6 horas después de la administración, preferiblemente al menos 4 horas después de la administración. El aumento de la expresión de *Per2* puede ser un aumento de aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 100 % o más en la expresión en comparación con en un sujeto sin la administración del modulador. El aumento de la expresión de *Per2* puede determinarse a nivel de ARN o de proteína.

Un aumento de la expresión génica tanto de *Per1* como de *Per2* puede observarse y es deseable.

15 Los moduladores del receptor de adenosina, moduladores selectivos o composiciones según la presente invención se pueden usar para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar la aparición, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de un trastorno del ritmo circadiano.

Los moduladores del receptor de adenosina, moduladores selectivos o composiciones según la presente invención se pueden usar para tratar, aliviar, mejorar, mitigar, retrasar la aparición, inhibir la progresión, reducir la gravedad y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una disfunción del ritmo circadiano.

20 Los moduladores del receptor de adenosina, modulador selectivo o composición según la presente invención se pueden usar para modular un reloj biológico o una realineación circadiana. La modulación del reloj puede ocurrir cuando se desea desalinearse un reloj circadiano con el reloj externo actual, y se puede usar la realineación para volver a alinearlo correctamente con el reloj externo. Es posible que se requiera uno o ambos para ayudar a determinar el momento efectivo de las intervenciones farmacológicas u otras intervenciones terapéuticas.

25 El trastorno del ritmo circadiano puede ser un trastorno del ritmo circadiano del sueño o una disfunción del ritmo circadiano. El trastorno del ritmo circadiano del sueño puede incluir, pero no se limita a, trastorno de desfase horario o síndrome de cambio rápido de zona horaria, trastorno de la fase de sueño retrasada, trastorno de la fase de sueño avanzada, trastorno rítmico de la vigilia irregular del sueño, trastorno de vigilia fuera del horario de 24 horas, trastorno del trabajo por turnos o ritmos circadianos disruptivos. El trastorno del ritmo circadiano puede ser un trastorno del sueño y la vigilia que no dura 24 horas en sujetos anoftálmicos. El trastorno del ritmo circadiano puede ser un trastorno del trabajo por turnos. El trastorno del ritmo circadiano puede ser un trastorno del desfase horario. El trastorno del ritmo circadiano puede ser un trastorno de la fase avanzada del sueño.

35 La disfunción del ritmo circadiano puede ser cualquier desincronización detectada del ritmo circadiano del SCN o del ritmo circadiano del tejido periférico individual, que preferiblemente no se presenta como un trastorno del ritmo circadiano del sueño. Es posible detectar la desincronización del ritmo circadiano con el reloj externo por varios medios. Por ejemplo, se puede utilizar un sensor de actimetría o similar para controlar los periodos de descanso y actividad. Otras mediciones apropiadas pueden ser los niveles hormonales, la presión arterial, la frecuencia cardíaca y similares. Para tejidos específicos, las mediciones de metabolitos, niveles hormonales, expresión génica o modificación de proteínas pueden dar una indicación del ritmo circadiano en ese tejido, célula u órgano. Estos tejidos, células y órganos son como se definen anteriormente.

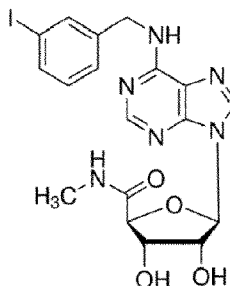
40 El antagonista del receptor de adenosina puede ser cualquier agente que inhiba o antagonice el receptor de adenosina. De manera similar, un agonista del receptor de adenosina puede ser cualquier agente que active o actúe como agonista del receptor de adenosina. Dicho antagonista o agonista puede ser una molécula pequeña, un péptido, una proteína, una terapia de ARN, tal como un ARNsi, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal. Preferiblemente, el antagonista o agonista es una molécula pequeña.

45 El antagonista selectivo del receptor de adenosina puede ser cualquier agente que inhiba o antagonice el receptor de adenosina especificado. De manera similar, un agonista inverso selectivo del receptor de adenosina puede ser cualquier agente que actúe en un receptor de adenosina constitutivamente activo para disminuir la actividad por debajo del nivel basal del receptor de adenosina. El nivel basal de actividad se mide en ausencia de adenosina. Por tanto, los antagonistas y agonistas inversos pueden tener un efecto similar para disminuir la actividad del receptor en relación con el ligando natural, la adenosina.

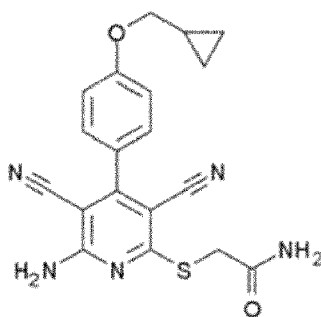
50 Dicho antagonista, agonista o agonista inverso puede ser una molécula pequeña, un péptido, un polipéptido, una proteína, un ARN no codificante, tal como un ARN en horquilla corta (ARNsh), ARN antisentido (ARNas), microARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ARNsi), ARN de transacción (ARNtasi), antagomires, aptámeros, esponjas de miARN y cualquier otro ARN funcional, o un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal. Preferiblemente, el antagonista o agonista inverso es una molécula pequeña.

El agonista, agonista inverso o antagonista puede ser una molécula conocida reutilizada o una molécula nueva. Los agonistas y antagonistas del receptor de adenosina ejemplares incluyen:

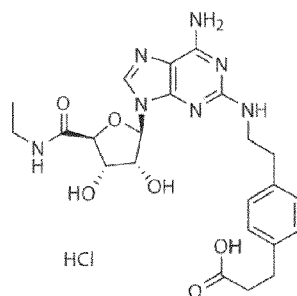
- 1-Desoxi-1-[6-(((3-yodofenil)metil)amino)-9H-purin-9-il]-N-metil-β-D-ribofuranuronamida, N⁶-(3-yodobencil)adenosina-5'-N-metiluronamida, también conocida como IB-Meca y es un agonista del receptor de adenosina A₃



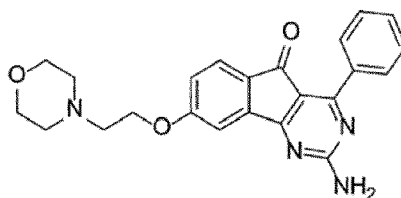
- 5
- 2-[[6-Amino-3,5-diciano-4-[4-(ciclopropilmetoxi)fenil]-2-piridinil]tio]-acetamida, también conocida como BAY-606583 y es un agonista del receptor A_{2B}



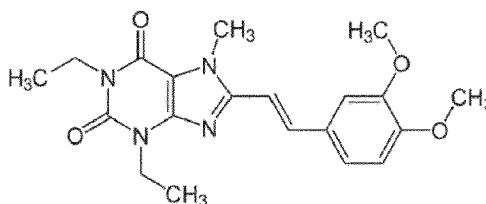
- ácido 3-[4-2-[[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(etilcarbamoil)-3,4-dihidroxi-oxolan-2-il]purin-2-il]amino]etil]fenil]propanoico, también conocido como CGS21680 y es un agonista del receptor A_{2A}.



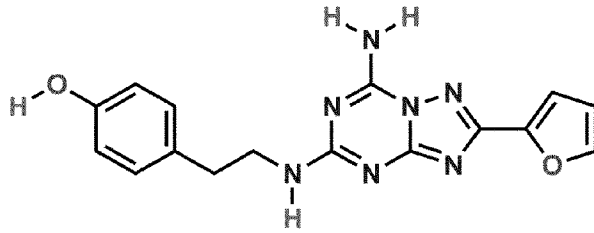
- 10
- 2-amino-8-[2-(4-morfolinil)etoxi]-4-fenil-5H-indeno[1,2-d]pirimidin-5-ona, también conocida como JNJ40255293 y es un antagonista del receptor A_{2A/A1}.



- 15
- 8-[(E)-2-(3,4-dimetoxifenil)vinil]-1,3-dietil-7-metil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona, también conocida como istradefilina y es un antagonista del receptor A_{2A}.

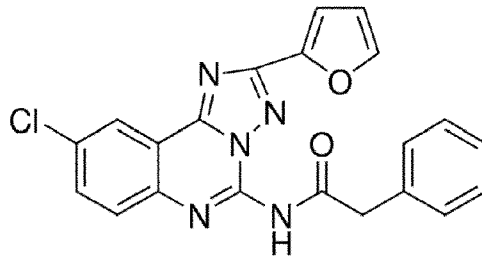


- 4-(2-(7-amino-2-(furan-2-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-5-ilamino)etil)fenol, también conocido como ZM241385 y es un antagonista del receptor A_{2A}.

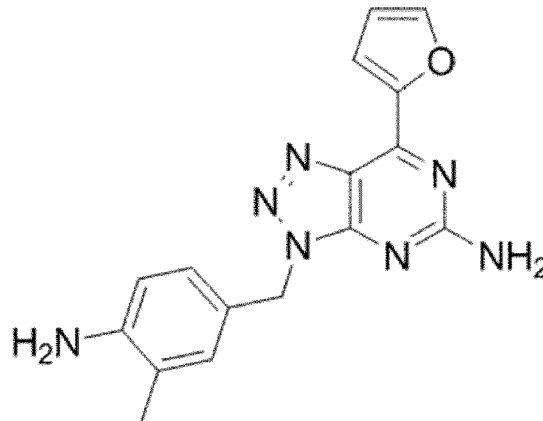


5

- 9-Cloro-2-(2-furanil)-5-((fenilacetil)amino)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolina, también conocida como MRS-1220 y es un antagonista del receptor A₃.

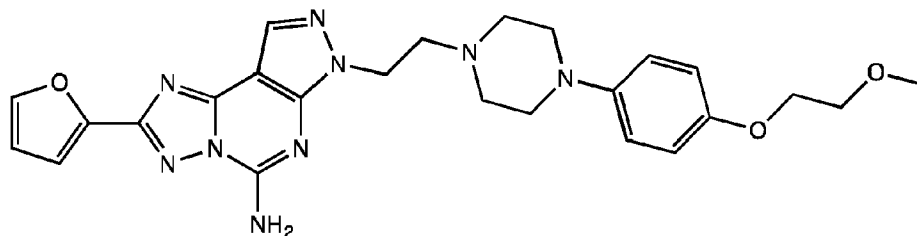


- 3-[(4-amino-3-metilfenil)metil]-7-furan-2-iltriazolo[5,4-d]pirimidin-5-amina, también conocida como vipadenant y es un antagonista del receptor A_{2A}.

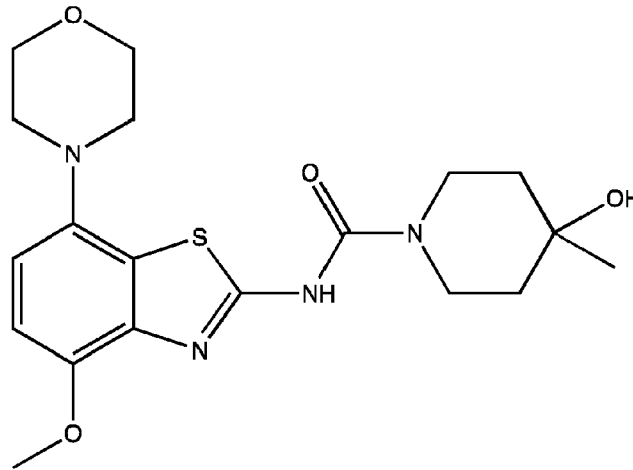


10

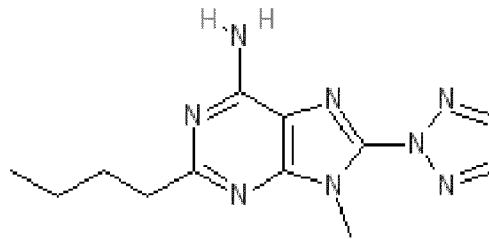
- 2-(2-Furanil)-7-[2-[4-[4-(2-metoxietoxi)fenil]-1-piperazinil]etil]7H-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pirimidina-5-amina, también conocida como preladenant y es un antagonista del receptor A_{2A}.



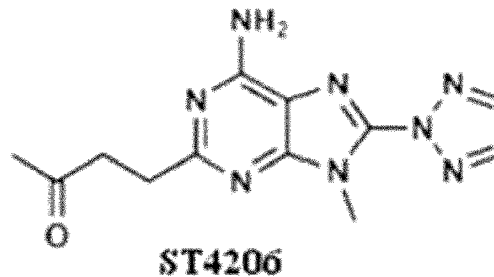
- 4-hidroxi-N-(4-metoxi-7-morfolinobenzo[d]tiazol-2-il)-4-metilpiperidina-1-carboxamida, también conocida como tozadenant y es un antagonista del receptor A_{2A}.



- 2-butil-9-metil-8-(triazol-2-il)purin-6-amina (ST-1535) es un antagonista del receptor A_{2A} .



- (6-Amino-9-metil-8-(2H-1,2,3-triazol-2-il)-9H-purin-2-il)butan-2-ona (ST4206) y es un antagonista del receptor A_{2A} .



5

Los preferidos son los moduladores selectivos del receptor de adenosina de doble direccionamiento, como ST-1535 y JNJ40255293. Opcionalmente, el modulador selectivo del receptor de adenosina es JNJ40255293. Estos son antagonistas selectivos de los receptores A_{2A}/A_1 .

10

El modulador o modulador selectivo de adenosina puede no ser cafeína, ya que la cafeína funciona como un modulador no selectivo de los receptores de adenosina (A_1 , A_{2a} , A_{2b} y A_3). Los profesionales de la salud no recomiendan la cafeína cuando un sujeto tiene dificultades en sus ciclos de reposo-actividad. De hecho, si el horario de sueño de un individuo es un problema, se le recomienda evitar por completo estimulantes como la cafeína. De manera similar, tampoco se recomiendan otros antagonistas no selectivos o agonistas inversos.

15

El alcance de la invención abarca todas las formas de sal farmacéuticamente aceptables de antagonistas, agonistas inversos y agonistas del receptor de adenosina, incluido cualquiera de los compuestos específicos descritos anteriormente, que pueden formarse, p. ej., mediante la protonación de un átomo que porta un par de electrones solitarios que es susceptible a la protonación, tal como un grupo amino, con un ácido inorgánico u orgánico, o como una sal de un grupo de ácido carboxílico con un catión fisiológicamente aceptable como son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de sales de adición de bases comprenden, por ejemplo: sales de metales alcalinos tales como sales de sodio o potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio o magnesio; sales de zinc; sales de amonio; sales de aminas alifáticas tales como trimetilamina, trietilamina, dicitclohexilamina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, sales de procaína, sales de meglumina, sales de etilendiamina o sales de colina; sales de aralkilamina tales como sales de N,N-dibenciletilendiamina, sales de benzatina, sales de benetamina; sales de aminas aromáticas heterocíclicas tales como sales de piridina, sales de picolina, sales de quinolina o sales de isoquinolina; sales de amonio cuaternario tales como sales de tetrametilamonio, sales de tetraetilamonio, sales de benciltrimetilamonio, sales de benciltrietilamonio, sales de benciltributilamonio, sales de metiltrioctilamonio o sales de tetrabutilamonio; y sales de aminoácidos básicos tales como sales de arginina, sales de lisina o sales de histidina. Las

25

- sales de adición de ácido ejemplares comprenden, por ejemplo: sales de ácidos minerales tales como hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, sales de sulfato, sales de nitrato, sales de fosfato (tales como, p. ej., sales de fosfato, hidrógenofosfato o dihidrógenofosfato), sales de carbonato, sales de hidrógenocarbonato o sales de perclorato; sales de ácidos orgánicos tales como sales de acetato, propionato, butirato, pentanoato, hexanoato, heptanoato, octanoato, ciclopentanopropionato, decanoato, undecanoato, oleato, estearato, lactato, maleato, oxalato, fumarato, tartrato, malato, citrato, succinato, glicolato, nicotinato, benzoato, salicilato, ascorbato o pamoato (embonato); sales de sulfonato tales como sales de metanosulfonato (mesilato), etanosulfonato (esilato), 2-hidroxietanosulfonato (isetionato), bencenosulfonato (besilato), p-toluenosulfonato (tosilato), 2-naftalenosulfonato (napsilato), 3-fenilsulfonato o canforsulfonato; y sales de aminoácidos ácidas tales como sales de aspartato o glutamato.
- 5
- 10 También se incluyen dentro del alcance de las composiciones farmacéuticamente aceptables los componentes cocrystalizados. Los cocrystalizados son cristales de múltiples componentes basados en interacciones de enlaces de hidrógeno sin la transferencia de iones de hidrógeno para formar sales. Se han descrito cocrystalizados de diversas sustancias orgánicas y se les han dado varios nombres, como compuestos de adición, complejos moleculares y cocrystalizados heteromoleculares. Los materiales cristalinos de componentes múltiples, como los cocrystalizados, ofrecen la posibilidad de propiedades físicas optimizadas. También se prevén sales cocrystalizadas.
- 15
- Un péptido puede incluir un compuesto que contiene dos o más aminoácidos en donde el grupo carboxilo de un ácido está unido al grupo amino del otro.
- Un ARNsi es un ácido nucleico que es un ácido ribonucleico bicatenario corto, de 15-50 pares de bases y preferiblemente de 21-25 pares de bases. El término ácido nucleico es un término técnico que se refiere a un polímero que contiene al menos dos nucleótidos. Los nucleótidos naturales contienen un grupo desoxirribosa (ADN) o ribosa (ARN), un grupo fosfato y una base. Las bases incluyen purinas y pirimidinas, que incluyen además los compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina y análogos naturales. Los derivados sintéticos de purinas y pirimidinas incluyen, pero no se limitan a, modificaciones que colocan nuevos grupos reactivos en la base tales como, pero no limitados a, aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos y haluros de alquilo. El término base abarca cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN, incluidos, pero no limitados a, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroxi)metiluracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina. Los nucleótidos son unidades monoméricas de polímeros de ácidos nucleicos y están unidos entre sí a través de grupos fosfato en los polinucleótidos naturales. Los polinucleótidos naturales tienen un esqueleto de ribosa-fosfato. Los polinucleótidos artificiales o sintéticos se polimerizan in vitro y contienen bases iguales o similares, pero pueden contener un esqueleto de un tipo distinto del esqueleto natural de ribosa-fosfato. Estos esqueletos incluyen, pero no se limitan a: PNA (ácidos nucleicos peptídicos), fósforotioatos, fósfordiamidatos, morfolinolinos y otras variantes del esqueleto de fosfato de polinucleótidos naturales.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40 El ARNsi contiene una secuencia que es idéntica o casi idéntica a una porción de un gen. El ARN puede ser polimerizado in vitro, el ARN recombinante, contener secuencias quiméricas o derivados de estos grupos. El ARNsi puede contener ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos sintéticos o cualquier combinación adecuada de modo que se inhiba la expresión del gen diana. El ARN es preferentemente bicatenario, pero puede ser monocatenario, triple o cuádruple. Un ejemplo de ARNsi monocatenario es un ARNsi con un bucle en forma de horquilla.
- 45
- Una proteína se refiere en la presente memoria a una serie lineal de más de 2 residuos de aminoácidos conectados entre sí como en un polipéptido. Se puede lograr un efecto "terapéutico" de la proteína para atenuar o prevenir el estado patológico si la proteína permanece dentro de la célula, permanece unida a la célula en la membrana o es secretada y disociada de la célula desde donde puede entrar en la circulación general y la sangre.
- 50
- El término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales o monoclonales, anticuerpos naturales, sintéticos o recombinantes, anticuerpos de dominio único de camélido, anticuerpos quiméricos tales como anticuerpos humanizados y sus fragmentos (por ejemplo, Fab'2, Fab, Fv, scFv) que han conservado su capacidad para actuar como agonista o antagonista de un receptor de adenosina.
- Los moduladores, moduladores selectivos o composiciones de la invención también pueden proporcionarse como profármacos o cualquier otro bioprecursor que se convierte durante el uso en agentes activos.
- 55
- Se apreciará que los términos "tratamiento" y "tratar", tal como se usan en la presente memoria, significan la gestión y cuidado de un sujeto con el fin de combatir una afección, tal como una enfermedad o un trastorno. El término pretende incluir el espectro completo de tratamientos para una afección determinada que padece el sujeto, tales como la administración del modulador del receptor de adenosina para aliviar los síntomas o complicaciones, retrasar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, aliviar o mitigar los síntomas y complicaciones, y/o curar o eliminar

la enfermedad, trastorno o afección, así como prevenir la afección, entendiéndose por prevención la gestión y cuidado de un sujeto con el fin de combatir la enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de moduladores del receptor de adenosina para prevenir la aparición de síntomas o complicaciones. El sujeto a tratar es preferentemente un mamífero, en particular un ser humano, pero también puede incluir animales, tales como perros, gatos, caballos, vacas, ovejas y cerdos.

En la presente memoria se divulga, pero no se reivindica, el uso de un modulador del receptor de adenosina, un modulador selectivo o una composición según la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos del ritmo circadiano.

El trastorno del ritmo circadiano puede ser una disfunción del ritmo circadiano o un trastorno del ritmo circadiano del sueño. Tal como se utiliza en la presente memoria, las disfunciones del ritmo circadiano no incluyen los trastornos del sueño del ritmo circadiano.

En la presente memoria se divulga, pero no se reivindica, un uso del modulador del receptor de adenosina, modulador selectivo o composición según la invención en el tratamiento de la desalineación circadiana.

En la presente memoria se divulga, pero no se reivindica, un uso del modulador del receptor de adenosina, modulador selectivo o composición según la invención para modular un reloj biológico. La modulación puede consistir en retrasar o adelantar el reloj biológico con respecto al reloj externo o ambiental dependiendo del momento de la administración del fármaco.

En la presente memoria se divulga, pero no se reivindica, una composición farmacéutica que comprende un modulador del receptor de adenosina, un modulador selectivo o una composición según la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas a usar comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un modulador del receptor de adenosina, modulador selectivo o composición o una sal farmacéuticamente aceptable u otra forma del mismo, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, diluyentes, cargas, desintegrantes, agentes lubricantes, aglutinantes, colorantes, pigmentos, estabilizadores, conservantes, antioxidantes y/o potenciadores de la solubilidad.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como las técnicas publicadas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular como formas de dosificación para administración oral, parenteral, tal como administración intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intraarterial, intracardial, rectal, nasal, tópica, en aerosol o vaginal. La composición farmacéutica se puede formular como una forma de dosificación para administración oral.

Las formas de dosificación para administración oral incluyen comprimidos recubiertos y no recubiertos, cápsulas de gelatina blanda, cápsulas de gelatina dura, pastillas para chupar, pastillas, soluciones, emulsiones, suspensiones, jarabes, elixires, polvos y gránulos para reconstitución, polvos y gránulos dispersables, gomas medicinales, comprimidos para masticar y comprimidos efervescentes. Las formas de dosificación para administración parenteral incluyen soluciones, emulsiones, suspensiones, dispersiones y polvos y gránulos para reconstitución. Las emulsiones son una forma de dosificación preferida para la administración parenteral. Las formas de dosificación para administración rectal y vaginal incluyen supositorios y óvulos. Las formas de dosificación para administración nasal se pueden administrar mediante inhalación e insuflación, por ejemplo, mediante un inhalador dosificador. Las formas de dosificación para administración tópica incluyen cremas, geles, pomadas, ungüentos, parches y sistemas de administración transdérmica.

El modulador del receptor de adenosina, el modulador selectivo, la composición o las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente que comprenden uno o más agonistas/agonistas inversos/antagonistas del receptor de adenosina se pueden administrar al sujeto mediante cualquier vía de administración conveniente, ya sea sistémica/periféricamente o en el sitio de acción deseada, que incluye, pero no se limita a, una o más de: oral (p. ej., como comprimido, cápsula o solución que se puede ingerir), tópica (p. ej., transdérmica, intranasal, ocular, bucal y sublingual), parenteral (p. ej., usando técnicas de inyección o técnicas de infusión, e incluyendo, por ejemplo, mediante inyección, p. ej., subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardíaca, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbitaria, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea, o intraesternal mediante, p. ej., implante de un depósito, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular), pulmonar (p. ej., mediante terapia de inhalación o insuflación usando, p. ej., un aerosol, p. ej., a través de la boca o la nariz), gastrointestinal, intrauterina, intraocular, subcutánea, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral), rectal y vaginal.

Si los moduladores, moduladores selectivos, composiciones o composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, entonces los ejemplos de dicha administración incluyen uno o más de: por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracardial, intracraneal, intramuscular o subcutánea, y/o mediante el uso de técnicas de infusión. Para la administración parenteral, los compuestos se usan mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer que la solución sea isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben tamponarse adecuadamente (preferiblemente

a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se logra fácilmente mediante técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas en la técnica.

5 Los moduladores o composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes saborizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, pulsada o controlada.

10 Los comprimidos pueden contener excipientes como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Además, se pueden incluir agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco. También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, celulosa o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones y/o elixires acuosos, el agente se puede combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, colorantes o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

15 Alternativamente, los moduladores, moduladores selectivos, composiciones o composiciones farmacéuticas se pueden administrar en forma de supositorio o pesario, o se pueden aplicar tópicamente en forma de gel, hidrogel, loción, solución, crema, pomada o polvo fino. También pueden administrarse por vía dérmica o transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche cutáneo.

20 Los moduladores, moduladores selectivos, composiciones o composiciones farmacéuticas también pueden administrarse mediante sistemas de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de composiciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen, p. ej., polilactidas (US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman, U. *et al*, 1983), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer, R. *et al*, 1981; Langer, R. *et al*, 1982), acetato de etileno y vinilo (Langer, R. *et al*, 1981; Langer, R. *et al*, 1982) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP133988). Las composiciones farmacéuticas de liberación sostenida también incluyen compuestos atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen un inhibidor/antagonista de EGFR se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como, p. ej., los métodos descritos en uno cualquiera de: DE3218121; Epstein *et al*, 1985; Hwang *et al*, 1980; EP0052322; EP0036676; EP088046; EP0143949; EP0142641; JP 83-118008; US 4.485.045 y US 4.544.545; y EP0102324.

30 Los moduladores, moduladores selectivos, composiciones o composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por vía pulmonar, vía rectal o vía ocular. Para uso oftálmico, se pueden formular como suspensiones micronizadas en solución salina isotónica, de pH ajustado, estéril, o, preferiblemente, como soluciones en solución salina isotónica, de pH ajustado, estéril, opcionalmente en combinación con un conservante tal como cloruro de benzalconio. Alternativamente, pueden formularse en una pomada como la vaselina.

35 También se prevé preparar formulaciones en polvo seco de los moduladores, moduladores selectivos, composiciones o composiciones farmacéuticas para administración pulmonar, particularmente inhalación. Dichos polvos secos pueden prepararse mediante secado por aspersión en condiciones que den como resultado un polvo bioactivo sustancialmente amorfo, vítreo o sustancialmente cristalino. Por consiguiente, se pueden preparar polvos secos de los inhibidores/antagonistas de EGFR según el proceso de emulsificación/secado por pulverización descrito en WO99/16419 o WO01/85136. El secado por pulverización de formulaciones en solución de los compuestos de la presente invención se lleva a cabo, por ejemplo, como se describe generalmente en "Spray Drying Handbook", 5ª ed., K. Masters, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1991), y en WO 97/41833 o WO 03/053411.

40 Para aplicación tópica en la piel, los moduladores, moduladores selectivos, composiciones o composiciones farmacéuticas se pueden formular como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, cera emulsionante y agua. Alternativamente, pueden formularse como una loción o crema adecuada, suspenderse o disolverse, por ejemplo, en una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

45 Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual. El nivel de dosis específico y la frecuencia de la dosificación para cualquier sujeto individual en particular pueden variarse y dependerán de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y momento de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, gravedad de la afección particular y sujeto individual sometido a terapia.

55 La composición farmacéutica puede contener un excipiente para facilitar el transporte a través de la barrera hematoencefálica. Tal y como se usa en la presente memoria, la 'barrera hematoencefálica' o 'BBB' se refiere a la

- barrera entre la circulación periférica y el cerebro y la médula espinal que está formada por uniones estrechas dentro de las membranas plasmáticas endoteliales de los capilares cerebrales, creando una barrera extremadamente estrecha que restringe el transporte de moléculas al cerebro. El excipiente que facilita el transporte a través de la barrera hematoencefálica se refiere a una sustancia que es capaz de alterar o penetrar la barrera hematoencefálica.
- 5 La cantidad de excipiente administrada con el modulador del receptor de adenosina es la cantidad efectiva para alterar la barrera hematoencefálica y permitir que el modulador del receptor de adenosina entre en el cerebro.
- Preferiblemente, los moduladores, moduladores selectivos, composiciones o composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral.
- Los moduladores, moduladores selectivos, composiciones o composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por vía intranasal. Las ventajas de la vía intranasal incluyen:
- 10
- a diferencia de la administración parenteral, la administración intranasal no es invasiva, generalmente se tolera bien y es fácil de autocontrol;
 - a diferencia de lo que ocurre tras la administración oral, la sustancia administrada no tiene que pasar por el sistema digestivo del tracto gastrointestinal ni sufrir una metabolización hepática;
- 15
- el área de mucosa nasal disponible para la absorción es relativamente grande y de fácil acceso;
 - y dado que el tiempo de permanencia de la sustancia en la nariz es corto, el pico de concentración hemática se alcanza rápidamente y esto puede controlarse en cada momento.
- En la presente memoria se divulga, pero no se reivindica, un método para tratar o prevenir trastornos del ritmo circadiano, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un modulador del receptor de adenosina, moduladores selectivos, una composición o una composición farmacéutica de la invención.
- 20
- Una cantidad efectiva es dosis es la cantidad que, durante un periodo de tiempo de tratamiento, que puede ser, p. ej., 1 día o varias semanas, da como resultado el arrastre del paciente a un ritmo circadiano de 24 horas. La cantidad efectiva puede requerirse en dosis múltiples durante 24 horas o en una sola administración.
- 25 La dosis diaria de un modulador del receptor de adenosina, modulador selectivo o composición de la invención estará, en general, en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1.000 mg, p. ej., aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg o aproximadamente 20 mg a aproximadamente 50 mg.
- 30 Para la prevención o el tratamiento del desfase horario en sujetos que viajan hacia el este, el antagonista del receptor de adenosina se puede tomar durante el día, preferiblemente entre aproximadamente las 7 am y aproximadamente las 2 pm.
- El agonista del receptor de adenosina se puede tomar muy temprano en la mañana, preferiblemente entre aproximadamente las 4 am y aproximadamente las 7 am para la prevención o el tratamiento del trastorno del desfase horario en sujetos que viajan hacia el este.
- 35 Se prefiere que el tiempo de administración esté dictado por el tiempo circadiano (CT) del ritmo que se va a modificar. El CT se puede determinar, como se mencionó anteriormente, mediante diversos ensayos y observaciones. Para hacer avanzar el reloj biológico o el ritmo circadiano, se prefiere que la administración sea con un modulador o composición selectiva entre aproximadamente CT4 y 8, preferiblemente entre CT5 y 7, o en CT6. "Avanzar" el ritmo circadiano significa adelantar el ritmo en el día externo.
- 40 Con el fin de retrasar el ritmo circadiano de un individuo (o una célula, tejido u órgano del mismo) según cualquier aspecto o realización de la invención, se prefiere administrar el modulador, modulador selectivo o composición entre aproximadamente CT14 y 18, preferiblemente entre CT15 y 17, o en CT16. "Retrasar" el ritmo circadiano significa empujar el ritmo hacia atrás en el día externo.
- 45 En la presente memoria se divulga, pero no se reivindica, una composición que comprende al menos un modulador selectivo del receptor de adenosina, en donde dicha composición antagoniza los receptores de adenosina A₁ y A_{2A}, para su uso en el tratamiento de disfunciones del ritmo circadiano o para su uso en el tratamiento de la desalineación circadiana. El modulador o moduladores selectivos pueden tener una afinidad limitada o nula por los receptores de adenosina A_{2B} y/o A₃.
- 50 La presente invención se puede llevar a cabo junto con otros enfoques de tratamiento, p. ej., en combinación con un segundo o múltiples otros agentes farmacéuticos activos, incluidos, pero no limitados a, otros agentes que afectan el insomnio, los patrones de sueño-vigilia, la vigilancia, la depresión o los episodios psicóticos.
- Puede ser deseable combinar el tratamiento con el modulador, modulador selectivo o composiciones de la invención

con otras intervenciones farmacológicas o terapéuticas. Estas intervenciones pueden ser más efectivas o tener menos efectos secundarios en un CT o ventana de CT particular. Los ejemplos de tales invenciones incluyen terapia anticancerosa, cardiovascular, respiratoria, antiinflamatoria, inmunosupresora, antiepiléptica, antipirética, analgésica, antipalúdica, antibiótica, antiséptica, estabilizadora del estado de ánimo, sustitutiva hormonal, anticonceptiva o cualquier otra terapia.

Se apreciará que las características opcionales aplicables a un aspecto o realización de la invención se pueden usar en cualquier combinación y en cualquier número. Además, también se pueden utilizar con cualquiera de los otros aspectos o realizaciones de la invención en cualquier combinación y en cualquier número. Esto incluye, pero no se limita a, las reivindicaciones dependientes de cualquier reivindicación que se utilice como reivindicaciones dependientes para cualquier otra reivindicación en las reivindicaciones de esta solicitud.

La invención se describirá adicionalmente, únicamente mediante ejemplos no limitantes, con referencia a las siguientes figuras y ejemplos experimentales.

Figura 1A-I – demuestran que los agonistas del receptor de adenosina activan la expresión del gen reloj en células U2OS.

Figura 1A – muestra células U2OS *Per2::Luc* tratadas con IB-MECA con el momento de aplicación indicado por la flecha.

Figura 1B - demuestra que IB-MECA aumenta el AMPc segundo mensajero intracelular de manera de respuesta a la dosis.

Figura 1C - demuestra que IB-MECA aumenta la transcripción dirigida por CREB, como indica el informador de CRE::Luc.

Figura 1D - demuestra la inducción de AMPc por agonistas del receptor de adenosina.

Figura 1E - demuestra la inducción de CREB por varios agonistas del receptor de adenosina, se incluyó forskolina como control positivo.

Figura 1F - demuestra un alargamiento del período de respuesta a la dosis en células U2OS tratadas con IB-MECA.

Figura 1G - demuestra un alargamiento del período de respuesta a la dosis en células U2OS tratadas con BAY606583.

Figura 1H - demuestra que los niveles de ARNm de *Per1* se elevan después de la aplicación de IB-MECA en células U2OS, según lo medido por qPCR.

Figura 1I - demuestra que los niveles de ARNm de *Per2* se elevan después de la aplicación de IB-MECA en células U2OS, según lo medido por qPCR.

Figura 1J - demuestra que la inactivación mediada por ARNs de receptores de adenosina individuales (*Adoral* - siA1, azul, *Adora2b* - siA2B) altera el período circadiano en direcciones opuestas.

Figura 1K - Aquí se muestran trazas individuales de la inactivación de ARNs, la inactivación de todos los receptores de adenosina (siA) amortigua severamente los ritmos. También se muestra la inactivación de los diferentes subtipos de receptores individualmente y el efecto sobre los ritmos.

Figura 1L - demuestra niveles de expresión de recepción de *Adoral*, *2a* y *2b* en células U2OS.

Figura 1M - demuestra que el alargamiento del período en las células U2OS *Per2::Luc* muestra una estrecha correlación con los niveles de inducción de CRE::Luc.

Figura 2A-C – demuestra *in vivo* la capacidad de los agonistas del receptor de adenosina para cambiar de fase los ritmos circadianos y modular el efecto de la luz en el reloj circadiano central.

Figura 2A - demuestra un cambio de fase normal de la actividad circadiana en respuesta a un pulso de luz temprano en la mañana. Los animales se mantuvieron en un ciclo de 12 h de luz (blanco) y 12 h de oscuridad (gris) y se administró el vehículo justo antes de un pulso de luz de 30 min de 400 lux (barra blanca) en el momento CT 22 (o 10 horas después de apagar las luces). Luego se eliminaron todas las señales de luz para permitir que se expresara en los animales el reloj de operación libre. Un espacio en las líneas el día después de que se administró el pulso de luz indica un cambio de fase.

Figura 2B - demuestra un cambio de fase atenuado de la actividad circadiana en respuesta a un pulso de luz temprano en la mañana. Los animales se mantuvieron en un ciclo de 12 h de luz (blanca) y 12 h de oscuridad (gris) y se administró IB-MECA (1 mg/kg) justo antes de un pulso de luz de 30 min de 400 lux (barra blanca) en

el momento CT 22 (o 10 horas después de apagar las luces).

Figura 2C - demuestra un resumen de los datos de cambio de fase, n=6, IB-MECA atenúa el efecto de cambio de fase de la luz administrada en el momento CT22.

5 **Figura 3A-K** - demuestra que los antagonistas del receptor de adenosina modulan los ritmos circadianos y la expresión del gen del reloj en las células U2OS.

Figura 3A – demuestra células U2OS *Per2::Luc* tratadas con JNJ40255293 con el momento de aplicación indicado por la flecha. Se observó un alargamiento del período.

10 **Figura 3B** - demuestra que ninguno de los antagonistas del receptor de adenosina ensayados induce la expresión de los elementos CRE, como lo indica un informador de CRE::Luc (se utilizó forskolina como control positivo). Fármacos ensayados a 30uM.

Figura 3C - demuestra que ninguno de los antagonistas del receptor de adenosina ensayados induce la producción de AMPc, como lo indica un informador de AMPc-GLO (se utilizó forskolina como control positivo). Fármacos ensayados a 30uM.

15 **Figura 3D** - demuestra un alargamiento del período de respuesta a la dosis en células U2OS tratadas con JNJ40255293.

Figura 3E - demuestra un alargamiento del período de respuesta a la dosis en células U2OS tratadas con istradefilina.

Figura 3F - demuestra un alargamiento del período de respuesta a la dosis en células U2OS tratadas con MRS1220.

20 **Figura 3G** - demuestra un alargamiento del período de respuesta a la dosis en células U2OS tratadas con ZM241385.

Figura 3H - Para ensayar que el efecto de alargamiento del período del antagonismo del receptor de adenosina se debía a la acción sobre los receptores de adenosina, se inactivaron todos los receptores de adenosina expresados en células U2OS y se encontró que se perdió el efecto de CGS15943 (Ax1).

25 **Figura 3I** - Para comprender el factor de transcripción responsable de los cambios observados en el ritmo, se realizó un cribado STAR-PROM y se identificaron firmas de ácido nucleico activadas por JNJ40255293 (dentro del recuadro).

Figura 3J - demuestra que los niveles de ARNm de *Per1* se elevan después de la aplicación de JNJ40255293 en células U2OS, según lo medido por qPCR.

30 **Figura 3K** – demuestra que los niveles de ARNm de *Per2* se elevan después de la aplicación de JNJ40255293 en células U2OS, según lo medido por qPCR.

Figura 4A-K - demuestra que *in vivo* los antagonistas del receptor de adenosina cambian de fase los ritmos circadianos y mejoran el reentrenamiento en un protocolo de desfase horario.

35 **Figura 4A** - demuestra un animal de control liberado de condiciones de arrastre para que corra libremente. Actogramas de ratones macho C57Bl/6 (más de 80 días) alojados en un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (400 lux). Arrastre estable indicado por el inicio de la actividad (negro) durante la parte oscura del ciclo (gris). A los animales se les administró vehículo (A) o JNJ40255293, inyección intraperitoneal de 5 mg/kg (B) (flecha, 6 h después del inicio de la luz).

40 **Figura 4B** - demuestra un animal tratado con JNJ40255293 (estrella) en una configuración idéntica a la de la Figura 4A. JNJ40255293 indujo un avance de fase, indicado por el avance de la actividad (línea diagonal) después de que los animales se alojaron en oscuridad constante (gris).

Figura 4C - demuestra el cambio de fase inducido por la administración del fármaco indicado (IB-MECA 1 mg/kg, JNJ40255293 5 mg/kg y CGS15943 5 mg/kg) en el momento ZT6.

45 **Figura 4D** - demuestra el cambio de fase inducido por la administración del fármaco indicado (IB-MECA 1 mg/kg, JNJ40255293 5 mg/kg y CGS15943 5 mg/kg) en el momento CT16.

50 **Figura 4E** - demuestra el reentrenamiento en un protocolo de desfase horario en un animal tratado con un vehículo de control. Se adoptó el mismo protocolo que el de las Figuras 4A y 4B, excepto que, en lugar de liberar a los animales en una oscuridad constante después de la administración del fármaco, el ciclo de luz-oscuridad se avanzó 6 horas para simular un vuelo hacia el este y un avance de 6 zonas horarias. Los animales tratados con vehículo (E) avanzaron su actividad gradualmente cada día.

- Figura 4F** - demuestra el reentrenamiento en un protocolo de desfase horario en un animal tratado con JNJ40255293 (5 mg/kg). Se adoptó el mismo protocolo que en la Figura 4E. Los animales tratados con fármaco avanzaron en su actividad mucho más rápidamente que los controles.
- 5 **Figura 4G** - demuestra la curva de respuesta a la dosis para el reentrante en un protocolo de desfase horario, la dosis de JNJ40255293 aumentó el reentrenamiento en respuesta a la dosis.
- Figura 4H** - demuestra que los niveles de ARNm de *Per1* están elevados dentro del SCN después de la administración de JNJ40255293 en la periferia (intraperitonealmente).
- Figura 4I** - demuestra que los niveles de ARNm de *Per2* están elevados dentro del SCN después de la administración de JNJ40255293 en la periferia (intraperitonealmente).
- 10 **Figura 4J** - muestra los ritmos *Per2::Luc* de explantes de SCN de animales transgénicos *Per2::Luc*. JNJ40255293 (10uM) añadido en la flecha.
- Figura 4K** - demuestra la administración de 5 mg/kg de JNJ40255293 y se miden los inicios de actividad.
- Figuras 5A a E** muestran que los antagonistas/agonistas inversos del receptor de adenosina regulan los relojes celulares a través de una vía de señalización independiente de CREB, lo que implica otro sistema de señalización. El trabajo experimental aquí se realiza con JNJ40255293.
- 15 **Figura 5A** - demuestra que JNJ40255293 no eleva los niveles de AMPc en células U2OS.
- Figura 5B** - muestra que JNJ40255293 no aumenta las señales del informador *CRE::Luc* en contraste con el control positivo forskolina.
- Figura 5C** - demuestra que se observan fuertes aumentos en el ARNm de *Per1* y *Per2* después del tratamiento con JNJ40255293 10 uM cuando se aplica a cultivos de células U2OS.
- 20 **Figura 5D** - muestra que el tratamiento con JNJ40255293 10 uM conduce a aumentos en la duración del período en las células informadoras U2OS *Bmal1::Luc* que vuelven a los ritmos normales después del lavado del fármaco.
- Figura 5E** - demuestra que se observan aumentos en la duración del período que responden a la dosis.
- Figuras 6A a F** – representa datos que muestran que los antagonistas del receptor de adenosina que se dirigen a dos o más receptores elevan la expresión de ambos *Per1* y *Per2*, los antagonistas que actúan sólo sobre receptores individuales no tienen este efecto.
- 25 **Figura 6(D)** - muestra que el efecto de JNJ40255293 está mediado por receptores de adenosina con un alargamiento del período de respuesta a la dosis en células U2OS *Per2::Luc*;
- Figura 6 (A) a (F)** – demuestran los niveles de *Per1* y *Per2* detectados después del tratamiento con (C,D) JNJ4055213 (E,F) KW3902 y KW6002 y (G,H) PSB0788. Los antagonistas mixtos de A_{2A}/A_1 como JNJ 4055213 inducen la expresión de *Per1* y *Per2* en células U2OS, pero no los antagonistas específicos A_1 (KW3902), A_{2A} (KW6002) o A_{2B} (PSB).
- 30 **Figura 7A a C** - muestra que el enfoque STAR-PROM revela una nueva vía de señalización aguas abajo de la inhibición del receptor de adenosina que converge en el reloj circadiano.
- 35 **Figuras 7A y B** - Demuestre la regulación al alza del ARNm de Fos (7A) y cJun (7B) después del tratamiento con JNJ40255293 10 uM.
- Figura 7C** - muestra la actividad de Seq3 después de la inactivación de AP1 (compuesto de FOS y JUN) en comparación con un ARNsí no dirigido (síNT) y la inducción por JNJ40255293 (10 uM) en comparación con DMSO.
- 40 **Figura 8A-C** – muestran que el SCN es sensible a los antagonistas del receptor de adenosina.
- Figura 8A y B** – muestran que los niveles de ARNm de *Per1*(A) y *Per2*(B) aumentan dentro del SCN 4 h después de la inyección intraperitoneal de JNJ40255293.
- Figura 8C** - es un registro *in vivo* de animales con electrodos implantados en SCN que muestran un marcado cambio de fase de la actividad eléctrica del SCN en la inyección intraperitoneal de JNJ40255293 (5 mg/kg).
- 45 **Figura 9A a C** - demuestran que los ensayos de comportamiento circadiano muestran eficacia de los antagonistas duales A_1/A_2A para modificar los ritmos circadianos.
- Figura 9A** - esta representa los cambios de fase, que se midieron por la diferencia entre las dos medidas de inicio (antes y después de la inyección del agente relevante) JNJ40255293 (antagonista de A_1/A_2A) causa los cambios

de fase más grandes en comparación con la cafeína, KW6002 o el agonista IB-MECA.

Figura 9B - demuestra que JNJ40255293 es más eficiente en el re-arrastre que el estándar de atención actual (Hetlioz).

5 **Figura 9C** - demuestra que JNJ40255293 es más eficiente que un antagonista específico de A_{2A} KW6002 o un antagonista específico de A₁ KW3902.

Figura 10A-C - demuestra que la señalización de adenosina regula la sensibilidad del reloj circadiano a la luz.

Figura 10A - demuestra que la privación de sueño aumenta paradójicamente la expresión de *Per2* dentro de la corteza.

10 **Figura 10B** – estos son actogramas individuales que respaldan los datos mostrados en las Figuras 5A a H. Los distintos agentes aplicados a los animales están etiquetados.

Figura 10C - esto demuestra que el antagonista de A₁/A_{2A} JNJ40255293 también mejora los cambios de fase en respuesta a la luz en CT16, a diferencia del agonista no específico IB-MECA.

Ejemplos

Materiales y métodos

15 Estudios con animales

Los animales se alojaron en un ciclo LD inverso de 12:12 (400 lux de lámparas LED blancas) con comida y agua *ad libitum*. Para los estudios de cambio de fase, se mantuvieron ratones C57Bl/6 sobre ruedas giratorias en cámaras herméticas de luz en un ciclo LD de 12:12 (400 lux de lámparas LED blancas) y se les inyectó el fármaco en los puntos de tiempo indicados. Los fármacos se formularon en un vehículo que consistía en 5 % de Koliphor-HS15 (Sigma-Aldrich, Reino Unido), 5 % de ciclodextrano (Sigma-Aldrich, Reino Unido) en solución salina al 0,9 %. Este vehículo se calentó a 37 °C y los fármacos indicados se mantuvieron en una preparación madre de 100x en DMSO y se mezclaron a la concentración apropiada para administrarse en aproximadamente 300 ul de inyección intraperitoneal (n=6 a 10). Cuando el punto de tiempo de la inyección estaba en la oscuridad, el procedimiento se llevó a cabo bajo una luz roja tenue. Cuando se midió el cambio de fase, los ratones se colocaron en DD y se les permitió correr libremente durante 14 días en DD, los datos de la actividad de la rueda giratoria se recopilaron y analizaron en Clocklab (Actimetrics, Wilmette, IL). Para los estudios de desfase horario, los ratones se mantuvieron sobre ruedas giratorias en cámaras herméticas a la luz en un ciclo de LD de 12:12 (400 lux de lámparas LED blancas) y se les inyectaron fármacos como se indicó anteriormente en ZT6 y el ciclo de LD se cambió con 6 horas de anticipación. El inicio de la actividad cada día se utilizó para medir la fase relativa al ciclo de LD.

30 Recogida de tejidos

Los animales se sacrificaron bajo una luz roja tenue mediante dislocación cervical a los 30, 60 y 120 minutos después del inicio del pulso de luz. Los ojos se retiraron inmediatamente para evitar cualquier estimulación fótica del SCN. Se diseccionaron ratones tratados de forma simulada a los que no se les dio un pulso de luz en cada punto de tiempo. Se extrajeron los cerebros y se colocaron en una matriz cerebral (Kent Scientific, Torrington CT, EE. UU.). Todos los procedimientos se realizaron según la Ley de Animales (Procedimientos Científicos) del Ministerio del Interior del Reino Unido de 1986 y la Política de la Universidad de Oxford sobre el Uso de Animales en la Investigación Científica. (PPL 70/6382 y 30/2812). Los animales se sacrificaron mediante métodos del Programa 1 según la Ley de Animales (Procedimientos Científicos) del Ministerio del Interior del Reino Unido de 1986.

40 **Recogida de tejidos del SCN:** Los animales se alojaron en un ciclo LD de 12:12 durante 2 semanas con comida y agua *ad libitum*. Luego, los animales recibieron una inyección de fármaco con una alteración en el ciclo de luz y oscuridad como se describe en el experimento y en los puntos establecidos después de la administración del fármaco se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se diseccionaron ratones tratados de forma simulada a los que no se les dio un pulso de luz en cada punto de tiempo. Se extrajeron los cerebros y se colocaron en una matriz cerebral (Kent Scientific, Torrington CT, EE. UU.). Los animales transgénicos *Per2::Luc* (como se informa en Yoo et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 13 de abril de 2004; 101(15): 5339-46) se obtuvieron del Prof. Joseph Takahashi, de la Universidad Northwestern.

50 Para punzones para análisis de ARNm/proteínas: se colocó una cuchilla de injerto de piel (Swann-Morton, Sheffield, Reino Unido) en Bregma -0,10 mm. Se colocó una segunda cuchilla a 1 mm (Bregma - 1,10) caudal de la primera y se diseccionó un corte de cerebro de 1 mm de espesor. Se tomaron punzones de SCN utilizando un descorazonador de muestras (1 mm de diámetro interno, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Alemania) del corte de cerebro (n = 4), se congelaron instantáneamente en hielo seco y se almacenaron a -80 °C antes de la extracción de ARN.

Para el cultivo de cortes de SCN: el cerebro se cortó suavemente en un cubo preservando la integridad del SCN y se cortó en rodajas de 200 uM en una solución salina equilibrada de Hanks oxigenada y enfriada en hielo que contenía MK801 100 nM (Sigma-Aldrich). El SCN se microdisseccionó y se transfirió a un filtro de membrana (Millicell Cell Culture

Insert, 30 mm, PTFE hidrofílico, 0,4 µm, Millipore) y se cultivó en 300 uL de DMEM preparado como se detalla en el ensayo Per2::Luc.

5 **Cambio de fase:** Se mantuvieron ratones macho C57Bl/6 (80 días o más) sobre ruedas giratorias en cámaras herméticas a la luz en un ciclo LD de 12:12 (100 lux de lámparas LED blancas) en arrastre estable y se liberaron en completa oscuridad. En tiempos establecidos como se indica en los experimentos, los animales recibieron una inyección intraperitoneal (300 ul) de fármaco constituido en solución salina estéril con 5 % de ciclodextrina (Sigma-Aldrich) y 5 % de Koliphor (Sigma-Aldrich) y luego se les permitió correr libremente en DD, los datos de la actividad de la rueda giratoria se recopilaron y analizaron en Clocklab (Actimetrics, Wilmette, IL).

10 **Re-arrastre:** Se mantuvieron ratones macho C57Bl/6 (80 días o más) sobre ruedas giratorias en cámaras herméticas a la luz en un ciclo LD de 12:12 (100 lux de lámparas LED blancas) y se les inyectaron fármacos como se indicó anteriormente en ZT6. El ciclo de LD se avanzó inmediatamente 6 h. El inicio de la actividad cada día se utilizó para medir la fase relativa al ciclo de LD, datos analizados en Clocklab.

Extracción de ARN y preparación de muestras

15 El ARN total se extrajo utilizando el método de columna microRNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). La calidad y la cantidad de ARN se midieron utilizando un bioanalizador Agilent y un Nanodrop1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA EE. UU.), respectivamente.

PCR cuantitativa (qPCR)

20 Las muestras de ARN se prepararon como se describe para la hibridación de micromatrices. El ADNc se sintetizó con un kit de síntesis de ADNc qScript (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD) y la PCR cuantitativa (qPCR) se realizó con Sybr green I y un ciclador térmico SDS7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La cuantificación relativa de los niveles de transcritos se realizó como se describió anteriormente (Peirson et al., Nucleic Acids Res. 15 de julio de 2003; 31(14): e73.). Para la normalización se utilizó la media geométrica de un mínimo de tres genes constitutivos (Gapdh, ActB, GusB y Rps9, por ejemplo).

Secuencias de cebadores a continuación y de Jagannath et al., Cell. 29 de agosto de 2013; 154(5): 1100-11.

25 Tabla 1: Secuencias de cebadores

Adora1 Dir	TGCCAGCTTTGGTGACCTTG
Adora1 Inv	GCCTGGAAAGCTGAGATGGA
Adora2a Dir	GGACTGTGACATGGAGCAGG
Adora2a Inv	TTCTGGCAGCAGCATCATGG
Adora3 Dir	TCGCTGTGGACCGATACTTG
Adora3 Inv	AGAGCCACATGACTGGAAGG

ARNi

Las secuencias de ARNsi son las siguientes; ARNsi no dirigido: 5' CUUACGCUGAGUACUUCGA 3'.

Tabla 2: secuencias de ARNs:

ADORA3	NM_000677	GGUCACCACUCACAGAAGA
ADORA3	NM_000677	CUACUUUAAUGGUGAGGUA
ADORA1	NM_001048230	GGUAGGUGCUGGCCUCAAA
ADORA1	NM_001048230	GGAGUCUGCUUGUCUUAGA
ADORA1	NM_001048230	CAAGAUCCCUCUCCGGUAC
ADORA2B	NM_000676	UGAGCUACAUGGUAUUAUUU
ADORA2B	NM_000676	GGGAUGGAACCACGAAUGA
ADORA2B	NM_000676	GAUGGAACCACGAAUGAAA
ADORA2A	NM_000675	GAACGUCACCAACUACUUU
ADORA2A	NM_000675	CAUGCUGGGUGUCUUAUUUG

Líneas celulares y cultivo

Se obtuvieron, ensayaron e identificaron células de la línea U2OS (HTB-96). Las células se cultivaron en matraces T-75, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) y 1 % de penicilina-estreptomina (P/S) a 37 °C en una atmósfera humidificada con el 5 % de CO₂. Las células se subcultivaron cada 2 a 4 días en una proporción de 1:2 a 1:6, según las recomendaciones de la ATCC. Las células se contaron usando un hemocitómetro y su viabilidad en un cultivo se mantuvo por encima del 95 %, medida con un ensayo de exclusión Presto Blue según las especificaciones del fabricante. Las células se transfectaron con ARNs (típicamente en concentraciones de 50 nM, secuencias como las enumeradas anteriormente), el vector CRE::Luc (pGL4.29[luc2P/CRE/Hygro], que codifica la luciferina Luc2P bajo el control de un fuerte promotor de elemento de respuesta a AMPc (CRE) que contiene 3 elementos CRE dentro de su secuencia; Promega) vector informador o plásmido cAMP-GLOSensor (Promega) según las instrucciones del fabricante usando Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen) o Lipofectamina3000 (Invitrogen).

15 Ensayos circadianos basados en células Per2::Luc

Las células U2OS transfectadas de forma estable con un informador Per2::Luc se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10 %. Para experimentos basados en ARNs y fármacos, las células se sembraron a 5.000 por pocillo en placas blancas de 384 pocillos y se transfectaron con ARNs 20 nM al día siguiente. 2 días después, las células se sincronizaron con dexametasona 100 nM y el medio se reemplazó con DMEM libre de rojo fenol suplementado con B-27 y sal potásica de luciferina 100 µM, se añadieron los fármacos necesarios formulados en DMSO como una solución madre de 1.000x y luego se sellaron. Los ritmos Per2::Luc se registraron desde un lector de placas BMG Labtech Fluostar Omega mantenido a 36 °C y se tomaron lecturas de cada pocillo cada hora. Luego, los datos se analizaron utilizando el software de análisis de ritmo Multicycle o Brass.

Ensayos circadianos de Per2:: Luc:

25 Se cultivaron transfectos de U2OS estables de Period2::Luciferasa (Per2::Luc), como se describió anteriormente. Luego, se sembró una placa Greiner Bio-One de 384 pocillos (poliestireno, parte inferior en F) a 6.000 células por pocillo de 50 µl. Después de un período de 24 horas, las células se trataron con dexametasona al 0,1 %, un análogo de la hormona glucocorticoide conocido por restablecer los ritmos circadianos intracelulares, durante 1 hora. Posteriormente, se eliminó el medio que contenía dexametasona, las células se lavaron con PBS y se añadió medio que contenía luciferina y el fármaco de ensayo. Luego, se analizó la luminiscencia de las células durante un período de 96 horas en el lector de microplacas BMG FLUOstar OPTIMA para observar la periodicidad y amplitud de los valores de luminiscencia.

Ensayo STAR-PROM

35 Esto se llevó a cabo como se informó anteriormente en Gerber et al., Cell. 31 de enero de 2013; 152(3): 492-503. Brevemente, se cultivaron células U2OS en placas de 6 pocillos y se transfectaron con 1 µg de la biblioteca de plásmidos STAR-PROM (estructura de la biblioteca como en la referencia anterior). El ARN se extrajo en puntos de tiempo establecidos y se secuenció para las construcciones de luciferasa con código de barras y se analizó con Galaxy (<https://use.galaxy.org>).

Transfección de vectores CRE-Luc

5 Con una confluencia del 60-80 % y una viabilidad >90 %, las células U2OS en el matraz T-75 se lavaron dos veces con 6 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y posteriormente se trataron con 4 ml de la solución de reemplazo de tripsina TrypLE™ Express durante 10 minutos. Luego, se sembró una placa Greiner Bio-One de 96 pocillos (blanca, tratada con TC) a 8.000 células por pocillo. Después de 24 horas, las células se transfectaron con una confluencia del 50-70 % con el vector CRE-Luc generado internamente con el reactivo de transfección Viafect en una proporción de 1:4 (100 ng de ADN/pocillo) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Ensayo de luciferasa en CRE-Luc

10 24 horas después de la transfección, el medio en la placa de 96 pocillos se cambió a un medio libre de suero con luciferina 1 mM. Luego, las células se incubaron en condiciones de privación de suero durante 6-8 horas; esto se optimizó para producir la mayor intensidad de señal y el menor ruido cuando se analizaron con control de forskolina. Después del período de incubación, las células CRE-Luc se trataron con el fármaco apropiado y sus valores de luminiscencia se midieron después de 6 horas en el lector de microplacas BMG FLUOstar OPTIMA. Para experimentos comparativos, se utilizaron concentraciones de fármaco de 10 µM, ya que se consideró que eran óptimas para mantener la toxicidad celular por debajo del 5 %, medida con el ensayo de exclusión Presto Blue. A menos que se indique lo contrario, se usó forskolina como control positivo y DMSO al 1 % como control negativo.

Ensayo de AMPc GloSensor

20 Se usó el ensayo de AMPc GloSensor™ (Promega) para detectar cambios en los niveles intracelulares de AMPc. Inicialmente, se sembró una placa Greiner Bio-One de 96 pocillos (blanca, tratada con TC) a 8.000 células por pocillo de 100 µl, como se describió anteriormente. Después de 24 horas, las células se transfectaron con el plásmido de AMPc pGloSensor™ utilizando el reactivo de transfección Viafect como se indicó anteriormente. Entre 24 y 48 horas después, permitiendo la acumulación del biosensor, el medio en la placa de 96 pocillos se cambió a medio independiente de CO2 suplementado con GlutaMAX™ (Life Technologies), 10 % de suero fetal bovino y 2 % de reactivo de AMPc GloSensor™. Luego, la placa se dejó reposar durante 2 horas a temperatura ambiente para equilibrarla.

25 Después del período de incubación, las células se trataron con los fármacos relevantes y sus valores de luminiscencia se midieron después de 20 minutos en el lector de microplacas BMG FLUOstar OPTIMA, con forskolina como control positivo y DMSO como control negativo.

Estadísticas

30 Los análisis estadísticos y las curvas de respuesta a la dosis se realizaron mediante el uso del software Graph Pad Prism 5.0. Se utilizó la prueba t de Student de dos colas para calcular los valores de P para comparaciones homocedásticas no apareadas, considerándose los valores de $P < 0,05$ estadísticamente significativos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Se utilizaron ANOVA para realizar comparaciones múltiples. Las barras de error en los gráficos indican un error estándar de la media (SEM). Además, todos los resultados se presentan en forma de promedio \pm SEM.

Resultados y discusión

35 Los agonistas del receptor de adenosina activan la expresión del reloj génico en células U2OS

Las líneas celulares U2OS tratadas con el agonista del receptor de adenosina IB-MECA muestran aumentos en el período y la amplitud del reloj celular según lo informado por la construcción Per2::Luciferasa (Figura 1A). Además de un aumento dependiente de la dosis en el período circadiano, IB-MECA provocó un aumento simultáneo en los niveles del segundo mensajero AMP cíclico (AMPc) (Figura 1B) y la activación del factor de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB), como lo indica la construcción informadora CRE::Luc (Figura 1C). Estos experimentos se repitieron con otros agonistas del receptor de adenosina (1-5 como se detalla en la Figura 1D y E) y se observaron aumentos similares en los niveles de AMPc y CRE::Luc (Figura 1D y 1E). Los aumentos de la duración del período dependiente de la dosis inducidos por IB-MECA (Figura 1F), dieron como resultado una expresión rápida de la expresión de los genes del reloj *Per1/2* (Figura 1H). Se observaron aumentos similares en la duración del período con BAY606583 (Figura 1G).

Los agonistas del receptor de adenosina cambian de fase los ritmos circadianos y modulan el efecto de la luz en el reloj circadiano central

50 Se alojaron ratones macho C57Bl/6 (más de 80 días) en un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (400 lux). El arrastre estable estuvo indicado por el inicio de la actividad (verde) durante la parte oscura del ciclo (gris). A los animales se les administró vehículo (Figura 2A) o IB-MECA, 1 mg/kg por vía intraperitoneal (Figura 2B) seguido de un pulso de luz en ZT22 (indicado por la flecha, 22 h después del inicio de la luz). Los resultados mostrados en la Figura 2A demuestran que un pulso de luz en CT22 normalmente indujo un avance de fase, indicado por el avance en la actividad (el punto de intersección de las dos líneas negras avanza) después de que los animales fueron alojados en oscuridad constante (gris). Los resultados mostrados en la Figura 2B muestran que el avance de fase se perdió cuando se administró IB-MECA (el punto de intersección de las líneas negras permanece en el día en que los animales fueron liberados en DD, lo que indica que no hay cambio de fase). Datos resumidos en (Figura 2C). Los resultados mostrados

en la Figura 2D demuestran que, en ausencia de un pulso de luz, IB-MECA provocó un retraso de fase cuando se administró en CT22, mientras que el vehículo y el antagonista no indujeron ningún cambio significativo de fase.

Los antagonistas del receptor de adenosina modulan los ritmos circadianos y la expresión del gen del reloj en las células U2OS

5 Como los agonistas del receptor de adenosina activaron la expresión del gen circadiano *Per1/2*, planteamos la hipótesis de que estos efectos fueron el resultado de la activación del receptor de adenosina. Por extensión, anticipamos que estos efectos serían bloqueados por el antagonista del receptor de adenosina general CGS15943(9-cloro-2-(furan-2-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolin-5-amina). Sin embargo, múltiples antagonistas del receptor de adenosina (Istradefilina, JNJ40255293, MRS1220 y ZM241385) aumentaron sorprendente e inesperadamente la duración del período circadiano de una manera dependiente de la dosis (Figura 3A-G)). La Figura 3A muestra que se observó un alargamiento del período en células U2OS *Per2::Luc* tratadas con JNJ40255293 (estando indicado el tiempo de aplicación mediante la flecha y las dosis según se indica). Como el AMPc podría haber aumentado como consecuencia del antagonismo del receptor A1 (acoplado a Gi), se evaluaron las alteraciones en el AMPc como consecuencia del bloqueo del receptor A1 en células U2OS. Los resultados mostrados en las Figuras 3B y 3C demuestran que ninguno de los antagonistas del receptor de adenosina aumentó la activación intracelular de AMPc o CREB en células U2OS. Sin embargo, se observó un alargamiento del período de respuesta a la dosis como se muestra en las Figuras 3D-H en células U2OS tratadas con JNJ40255293, istradefilina, MRS1220 y ZM241385, respectivamente. Con el fin de verificar que los efectos observados se debían a la acción sobre los receptores de adenosina, los receptores de adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} en células U2OS se inactivaron utilizando ARNs i y se evaluaron los efectos de los antagonistas. La Figura 3H muestra que los efectos de los antagonistas fueron suprimidos, lo que confirma que el efecto observado en el período se debe de hecho a la acción sobre los receptores de adenosina.

La ausencia de la respuesta *CRE::Luc* indica una vía transcripcional alternativa que culmina en la expresión del gen del reloj. Para identificar esta vía, se realizó un cribado STAR-PROM (como se describe en Gerber *et al*, 2013, Cell y en colaboración con el Prof. Ulrich Schibler, Ginebra). Este sistema comprende una biblioteca de elementos promotores sintéticos que dirigen la expresión de luciferasa y puede usarse para identificar nuevos elementos transcripcionales activados por fármacos o tratamientos. JNJ40255293 activó la expresión de varias construcciones informadoras como se resalta en el cuadro gris en la Figura 3I.

Los resultados mostrados en las Figuras 3J y 3K muestran que los niveles de ARNm de *Per1* y *Per2* respectivamente se elevaron después de la aplicación de JNJ40255293 (30 μ M) en células U2OS.

Los antagonistas del receptor de adenosina cambian de fase los ritmos circadianos y mejoran el arrastre en un protocolo de desfase horario.

Se alojaron ratones macho C57Bl/6 (más de 80 días) en un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (400 lux). El arrastre estable estuvo indicado por el inicio de la actividad (negro) durante la parte oscura del ciclo (gris). A los animales se les administró vehículo (Figura 4A) o JNJ40255293, inyección intraperitoneal de 5 mg/kg (Figura 4B) (indicada por la flecha, 6 h después del inicio de la luz). JNJ40255293 indujo un avance de fase, indicado por el avance en la actividad (línea diagonal) después de que los animales fueron alojados en oscuridad constante (gris). Datos resumidos en (C). De manera similar, se administró JNJ40255293 en CT16 (tiempo circadiano 16 o 16 h después del inicio de la luz) y provocó un retraso de fase, lo que indica que el mismo fármaco tendría diferentes efectos en la fase circadiana en diferentes momentos, similar a la luz (Figura 4E). Se siguió el mismo protocolo anterior que para las Figuras 4A y 4B, con la excepción de que, en lugar de liberar a los animales en una oscuridad constante después de la administración del fármaco, el ciclo de luz-oscuridad se avanzó 6 h para simular un vuelo hacia el este y un avance de 6 zonas horarias. Los animales tratados con vehículo (Figura 4E) avanzaron su actividad gradualmente cada día y, en contraste, los animales tratados con JNJ40255293 (Figura 4F) cambiaron rápidamente. Los resultados que se muestran en la Figura 4G muestran que se observó una mejora del re-arrastre tanto para JNJ40255293 (Figura 4G). Los resultados mostrados en las Figuras 4H y 4I muestran que los niveles de ARNm de *Per1* y *Per2* respectivamente se elevaron dentro del SCN después de la administración de JNJ40255293 en la periferia (intraperitonealmente), lo que indica el efecto central del fármaco. Los resultados que se muestran en las Figuras 4J y 4K provienen de experimentos en donde los animales se alojaron en oscuridad constante y en CT16 o 4 horas después del anochecer subjetivo recibieron vehículo o 5 mg/kg de JNJ40255293 o 1 mg/kg de IB-MECA (datos no mostrados) y se midieron los inicios de la actividad. Los cambios de fase se midieron mediante la diferencia entre las dos medidas de inicio (antes y después de la inyección) y se representaron. JNJ40255293 en este momento provoca un retraso de fase.

Los antagonistas/agonistas inversos del receptor de adenosina regulan los relojes celulares a través de una nueva vía de señalización.

Las Figuras 5A-E y 6A a H detallan el efecto de los antagonistas del receptor de adenosina sobre el reloj celular. Si bien esperábamos lo contrario de los antagonistas que de los agonistas, nos sorprendió descubrir que los antagonistas de los receptores A₁/A_{2A} como JNJ40255293 produjeron grandes aumentos dependientes de la dosis en la duración del período. Observamos poco o ningún aumento en el AMPc (aumento del 50 % a 30 μ M), ciertamente no a los niveles necesarios para provocar cambios en el período circadiano. En consecuencia, no vimos cambios en la fosforilación de CREB o en la señal para los informadores de *CRE::Luc*, pero observamos un aumento significativo de

la transcripción de *Per1/2* a las 4 h después del tratamiento con el fármaco (por lo tanto, con un transcurso de tiempo significativamente diferente al de los agonistas) y cambios en la duración del período. Estos hallazgos implican un nuevo eje transcripcional independiente de CREB aguas abajo de los receptores de adenosina que provoca una inducción retardada de la transcripción de *Per1/2*. Los antagonistas mixtos de A_1/A_{2A} lograron este efecto (p. ej., JNJ40255293) pero ni los antagonistas específicos de A_1 ni específicos de A_{2A}/A_{2B} pudieron replicar este efecto. Con el fin de identificar el nuevo eje transcripcional aguas abajo del antagonismo de A_1/A_{2A} que convergió en el reloj, empleamos el enfoque de cribado imparcial del factor de transcripción BC-STARPROM/JNJ40255293 30uM aumentó significativamente la señal informadora de 8 clones, de los cuales se predijo que 7 contendrían un sitio de unión del factor de transcripción relacionado con Fos. Aislamos el clon3, que descubrimos que respondía a un panel de diferentes antagonistas, incluido JNJ40255293. La secuencia de ADN que contiene la región promotora del clon 3 se usó para eliminar las parejas de unión a proteínas de un extracto nuclear de células tratadas con JNJ40255293 y las proteínas aisladas se secuenciaron mediante espectrometría de masas. Algunos factores de transcripción se enriquecieron en las muestras tratadas con CGS, incluidos JunD y Fos12. En consecuencia, el silenciamiento de Fos mediado por ARNsi redujo significativamente la respuesta del clon3 a CGS15943. El análisis de los promotores de *Per1* y *Per2* reveló un sitio de unión Fos:Jun conservado dentro de sus promotores (datos no mostrados). Fig. 5: (A) JNJ40255293 no eleva los niveles de AMPc en células U2OS o (B) aumenta la fosforilación de CREB, en contraste con los controles positivos de forskolina de IB-MECA. (C) Se observan aumentos sólidos en el ARNm de *Per1* y *Per2* después del tratamiento con JNJ40255293 10 uM, lo que provoca (D) aumentos en la duración del período en las células U2OS informadoras Bmal1::Luc que vuelven a los ritmos normales después del lavado del fármaco. (E) Se observan aumentos en la duración del período en respuesta a la dosis. Las Figuras 6A a H muestran que múltiples antagonistas del receptor de adenosina perturban los ritmos circadianos en las células U2OS de una manera independiente de CREB.

El enfoque STAR-PROM revela una nueva vía de señalización aguas abajo de la inhibición del receptor de adenosina que converge en el reloj circadiano.

Esto se demuestra en las Figuras 7A a E y 31. La Figura 7C muestra la actividad de Seq3 después de la inactivación de Fos (siFos) en comparación con un ARNsi no dirigido (siNT) y la inducción por JNJ40255293 en comparación con DMSO. Esto demuestra una vía alternativa que va desde los antagonistas mixtos hasta *Per1/2*. La expresión específica de un informador que contiene el mismo elemento de unión transcripcional que se encuentra en *Per2*. La línea superior representa la inducción de expresión del clon en tratamiento con JNJ40255293 y las líneas inferiores representan lo mismo después del silenciamiento del factor de transcripción candidato AP1 (que consiste en las subunidades Fos y Jun). Estos datos confirman que AP1 es responsable de la transcripción de *Per1/2* después del tratamiento con JNJ40255293.

El SCN expresa receptores de adenosina y es sensible a los antagonistas/agonistas inversos del receptor de adenosina.

Luego, ampliamos nuestro trabajo al marcapasos central y descubrimos que JNJ40255293 aumentaba la duración del período en cultivos de cortes aislados de SCN *Per2::Luc*. Las inyecciones intraperitoneales de JNJ40255293 aumentaron la expresión de *Per1* y *Per2*. Las Figuras 8A a C representan estos resultados.

Los ensayos de comportamiento circadiano muestran la eficacia de los antagonistas duales de A_1/A_{2A} para modificar los ritmos circadianos.

Las Figuras 9 A a C muestran gráficos que representan la velocidad de arrastre de ratones tratados con una única inyección intraperitoneal de los fármacos JNJ40255293 (5 mg/kg), Tasimelteon (5 mg/kg), KW6002 (1 mg/kg) y KW3902 (1 mg/kg). El ciclo de luz y oscuridad se avanzó seis horas después de la inyección en ZT6 y se representó la fase de inicio de actividad (que marca el tiempo circadiano en los animales). Los animales tratados con vehículo tardaron típicamente 5-6 días en volver a la línea base, mientras que JNJ40255293 avanzó claramente el arrastre de manera más potente que Tasimelteon, KW6002 (antagonista específico de A_{2A}) o KW3902 (antagonista específico de A_1).

La señalización de adenosina regula la sensibilidad del reloj circadiano a la luz.

Investigamos la relevancia fisiológica de nuestros hallazgos para el eje del sueño. Predijimos que la privación de sueño aumentaría los niveles de adenosina extracelular y que esto disminuiría la expresión del gen del reloj. Descubrimos que, como se predijo, la privación de sueño disminuye la expresión de *Per1/2* dentro del SCN, consistente con un aumento de la señalización de adenosina A_1 y que esta disminución se revirtió mediante la administración de JNJ40255293 y se imitó mediante la administración de un agonista de A_1 . Un agonista específico de A_{2A} CGS21680 tuvo el efecto opuesto y aumentó la expresión de *Per1/2* (datos no mostrados). También encontramos, como se informó anteriormente, que la privación de sueño aumentó *Per1/2* dentro de la corteza, y que este aumento se debió más al eje de señalización estrés-glucocorticoides, ya que la administración de mifepristona mitigó esta respuesta (datos no mostrados). La implicación de estos hallazgos es que los niveles de adenosina (presumiblemente influenciados por los antecedentes del sueño) pueden influir en las respuestas circadianas. Ensayamos esto en el contexto de los cambios de fase circadiana hacia la luz. Nuestra hipótesis es que los antagonistas de A_1 mejorarían los efectos de la luz, mientras que los agonistas de A_1 inhibirían el efecto de cambio de fase de la luz. De hecho, esto es lo que encontramos: pudimos alterar las profundidades de los dos brazos de la luz PRC modulando la señalización de adenosina. Las implicaciones de este hallazgo podrían explicar las diferentes PRC de luz en animales nocturnos

frente a diurnos.

5 Los datos de las figuras 10 A a 10 C muestran que la privación de sueño aumenta paradójicamente la expresión de *Per2* dentro de la corteza. Los actogramas individuales (10B) respaldan la afirmación de que la señalización de adenosina regula la sensibilidad del reloj circadiano a la luz. 10C muestra que el antagonista de A_1/A_{2A} JNJ40255293 también mejora los cambios de fase en respuesta a la luz en CT16, a diferencia del agonista no específico IB-MECA.

10 Los experimentos detallados en las Figuras 1-10 describen el efecto de los moduladores del receptor de adenosina y la señalización de adenosina sobre la función del reloj circadiano. A través de vías tanto canónicas (basadas en CREB) como novedosas, los fármacos dirigidos al sistema receptor de adenosina activan la expresión del gen del reloj y proporcionan un zeitgeber o mensaje de tiempo al reloj circadiano. Esto se puede utilizar para restablecer, es decir, adelantar o retrasar la fase y el período del reloj circadiano *in vitro* y también *in vivo*. Estos resultados respaldan el uso de moduladores del receptor de adenosina como compuestos cronomoduladores, particularmente cuando al menos dos receptores de adenosina se modulan en tándem.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende al menos un modulador selectivo del receptor de adenosina, en donde dicha composición antagoniza los subtipos del receptor de adenosina A₁ y A_{2A}, para su uso en el tratamiento de trastornos del ritmo circadiano o para su uso en la modulación de un reloj biológico.
- 5 2. La composición para su uso en la reivindicación 1, en donde dicho trastorno del ritmo circadiano es una disfunción del ritmo circadiano.
3. Una composición que comprende al menos un modulador selectivo del receptor de adenosina, en donde dicha composición antagoniza los subtipos del receptor de adenosina A₁ y A_{2A} para su uso en la realineación circadiana.
- 10 4. Una composición que comprende al menos un modulador selectivo del receptor de adenosina, en donde dicha composición antagoniza los subtipos del receptor de adenosina A₁ y A_{2A} para su uso en la realineación o ajuste circadiano mediante administración una vez al día.
5. La composición para su uso en la reivindicación 4, en donde la administración es en el tiempo circadiano 4 a 8, preferiblemente en el tiempo circadiano 6, o la administración es en el tiempo circadiano 14 a 18, preferiblemente en el tiempo circadiano 16.
- 15 6. La composición para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha composición comprende un único modulador del receptor de adenosina que antagoniza selectivamente ambos subtipos del receptor de adenosina A₁ y A_{2A}.
7. Una composición para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el modulador del receptor de adenosina es una molécula pequeña, un péptido, una proteína, un aptámero, un ARN no codificante o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- 20 8. Una composición para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el modulador del receptor de adenosina o el modulador selectivo del receptor de adenosina se selecciona de:
 - 2-amino-8-[2-(4-morfolinil)etoxi]-4-fenil-5H-indeno[1,2-d]pirimidin-5-ona;
 - 8-[(E)-2-(3,4-dimetoxifenil)vinil]-1,3-dietil-7-metil-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona;
 - 25 - 4-(2-(7-amino-2-(furan-2-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-5-ilamino)etil)fenol;
 - 3-[(4-amino-3-metilfenil)metil]-7-furan-2-iltriazolo[5,4-d]pirimidin-5-amina;
 - 2-(2-Furanil)-7-[2-[4-[4-(2-metoxietoxi)fenil]-1-piperazinil]etil]7H-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pirimidin-5-amina;
 - 4-hidroxi-N-(4-metoxi-7-morfolinobenzo[d]tiazol-2-il)-4-metilpiperidin-1-carboxamida;
 - 30 - 2-butil-9-metil-8-(triazol-2-il)purin-6-amina; o
 - (6-Amino-9-metil-8-(2H-1,2,3-triazol-2-il)-9H-purin-2-il)butan-2-ona.
9. Una composición para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el modulador específico del receptor de adenosina tiene al menos un 30 % de afinidad, o al menos un 40 % de afinidad, o al menos un 50 % de afinidad o más por uno o dos de los subtipos de receptores de adenosina A₁ y A_{2A} preferiblemente en donde el modulador específico del receptor de adenosina tiene al menos un 60 % de afinidad o más por uno o dos de los subtipos de receptores de adenosina A₁ y A_{2A}.
- 35 10. Una composición para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el modulador da como resultado un aumento en la expresión génica de *Per1* o *Per2* después de la administración a un sujeto, opcionalmente en donde el aumento en la expresión génica de *Per1* o *Per2* se observa al menos de 2 a 6 horas después de la administración, preferiblemente en donde el aumento en la expresión génica de *Per1* o *Per2* se observa al menos 4 horas después de la administración.
- 40 11. Una composición para su uso según la reivindicación 10, en donde el aumento en la expresión génica de *Per1* o *Per2* es un aumento de aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 100 % o más en la expresión en comparación con un sujeto sin la administración del modulador.
- 45 12. Una composición farmacéutica para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4.

13. La composición para su uso en la reivindicación 2, en donde dicha disfunción del ritmo circadiano ocurre en tejidos periféricos, o alternativamente, en donde dicha disfunción del ritmo circadiano ocurre en el sistema cardiovascular, pulmones, corazón, sistema circulatorio, sistema inmunológico o linfático, estómago, páncreas, hígado, bazo, intestino delgado o grueso, tejidos reproductivos, riñones, vejiga o sistema urinario, músculo, médula ósea, piel, sistema endocrino o sistema nervioso periférico.
- 5

Figura 1

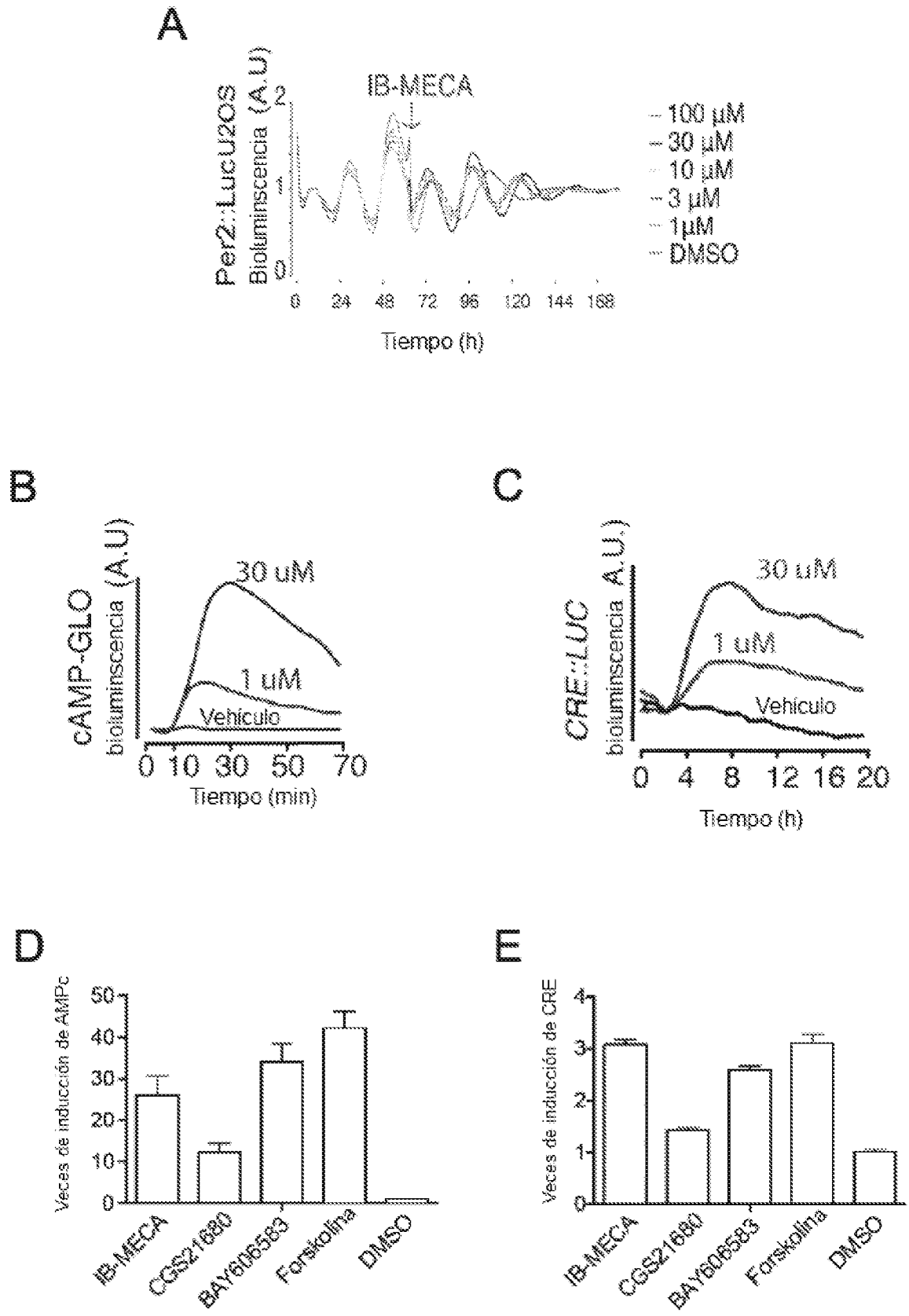


Figura 1 continuación

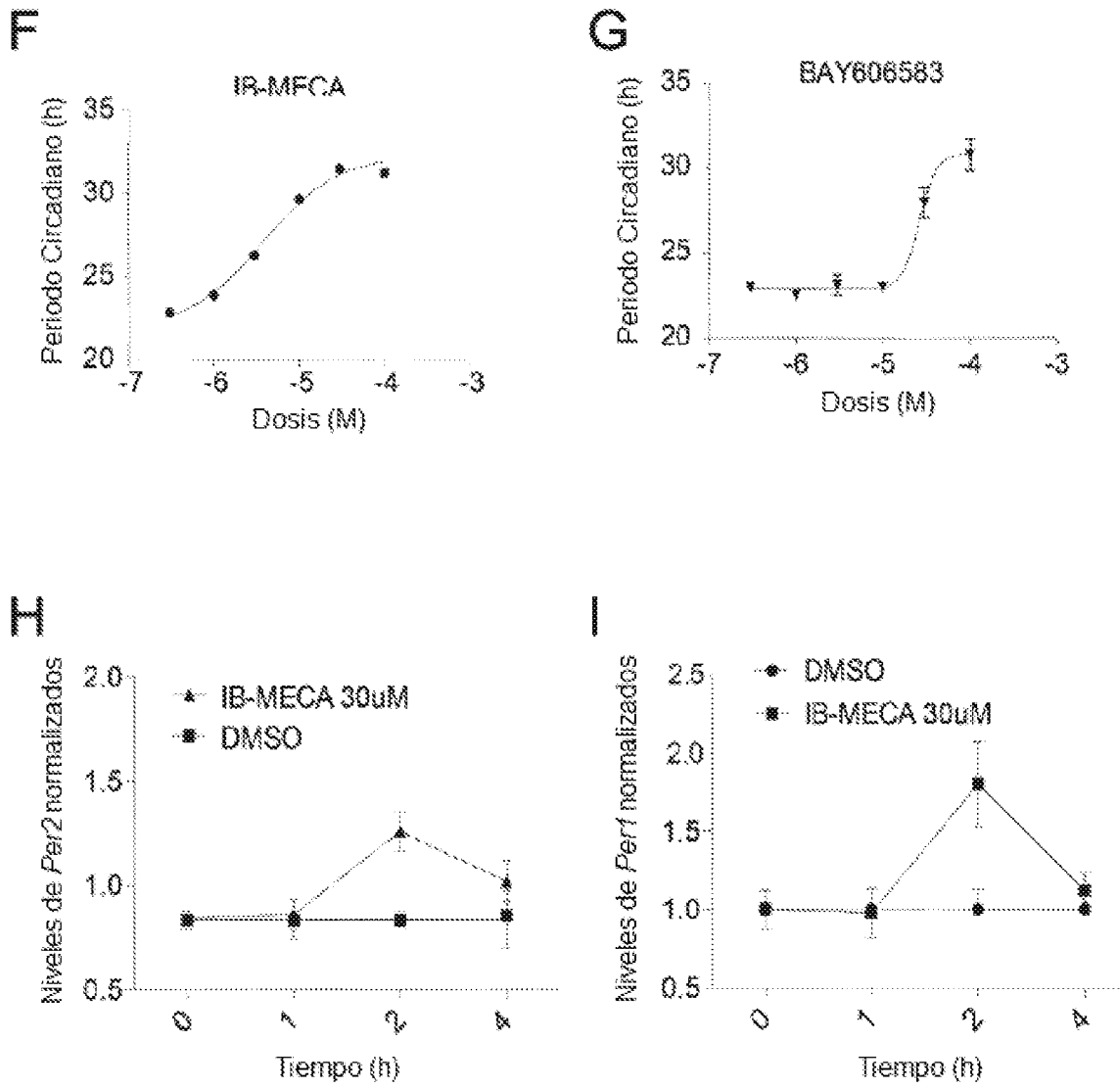
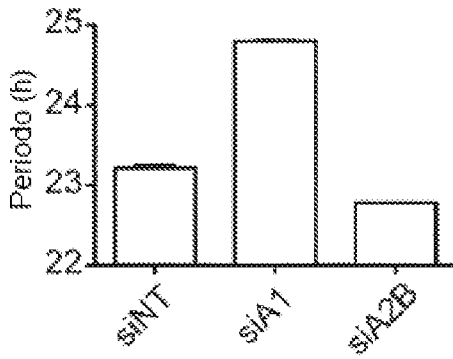
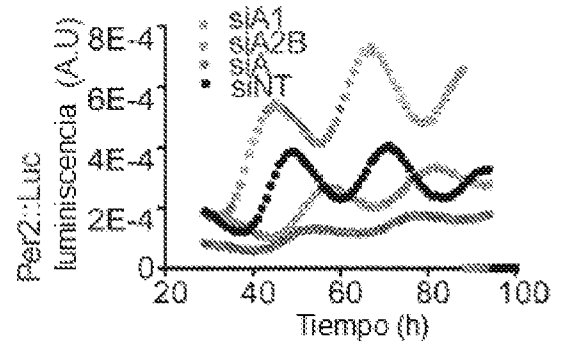


Figura 1 continuación

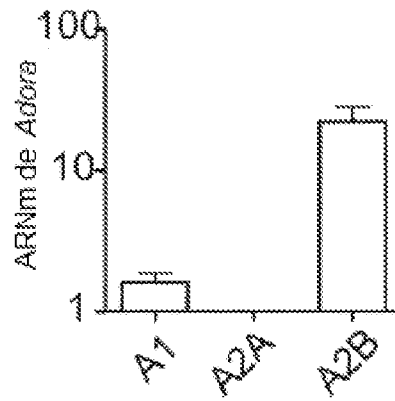
J



K



L



M

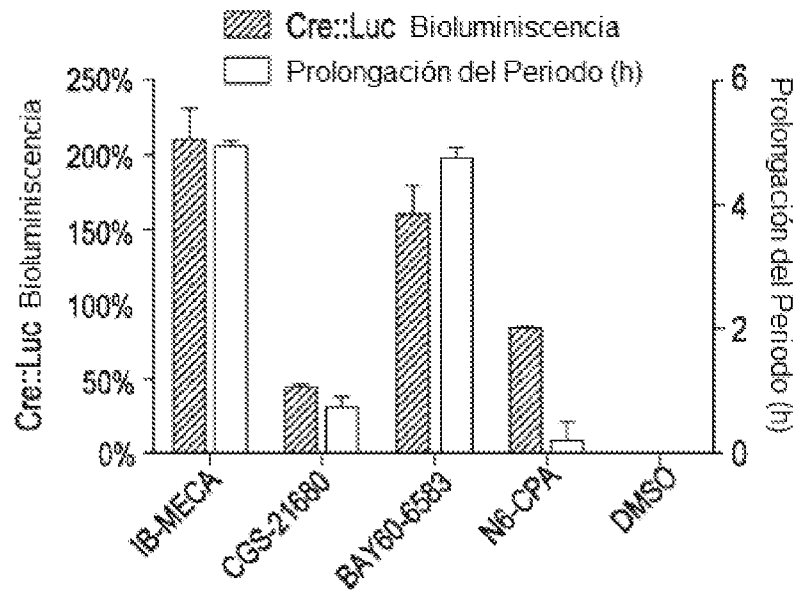


Figura 2

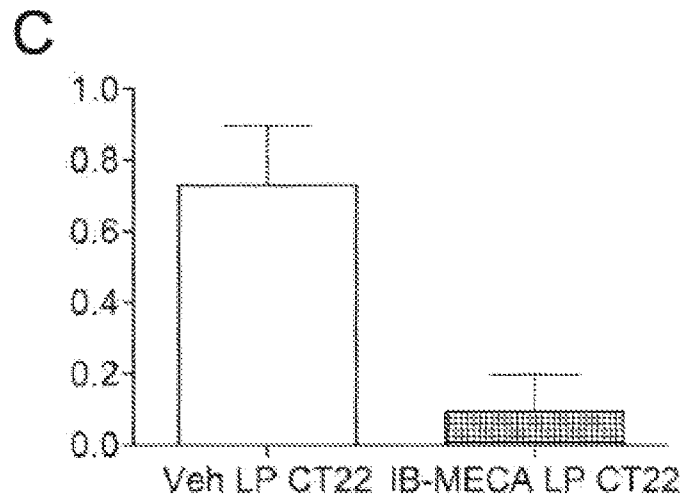
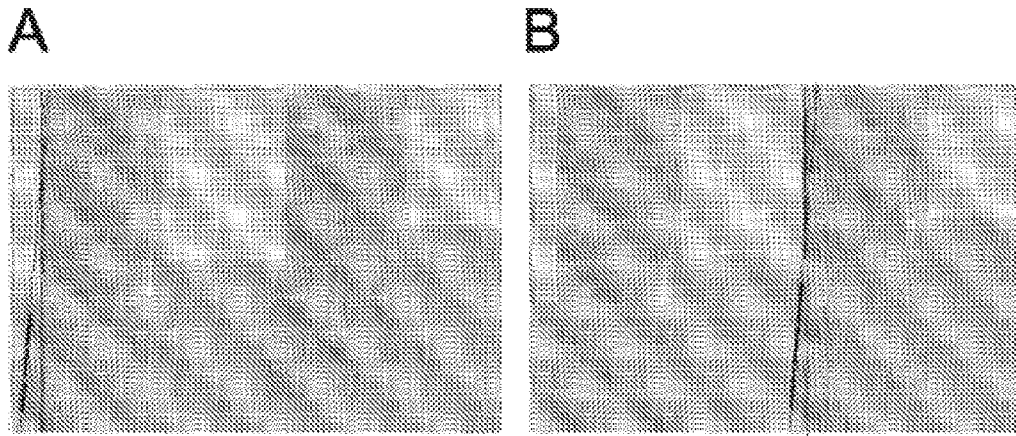


Figura 3

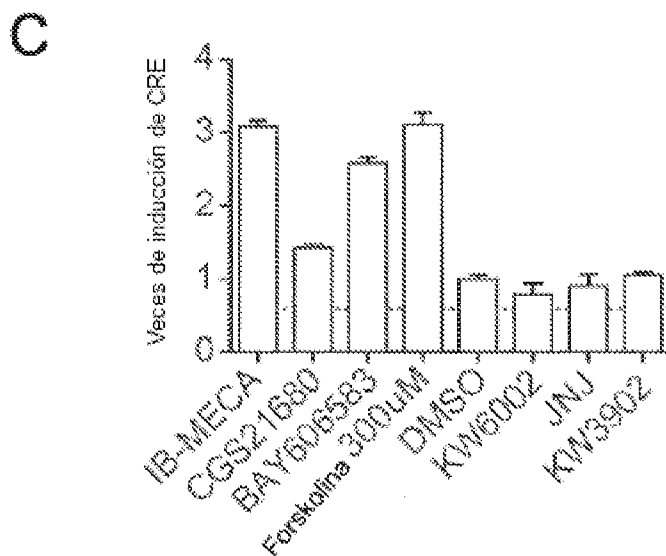
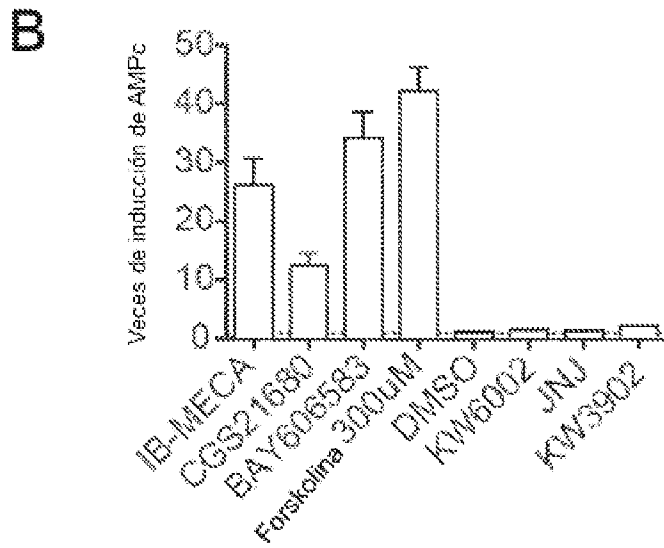
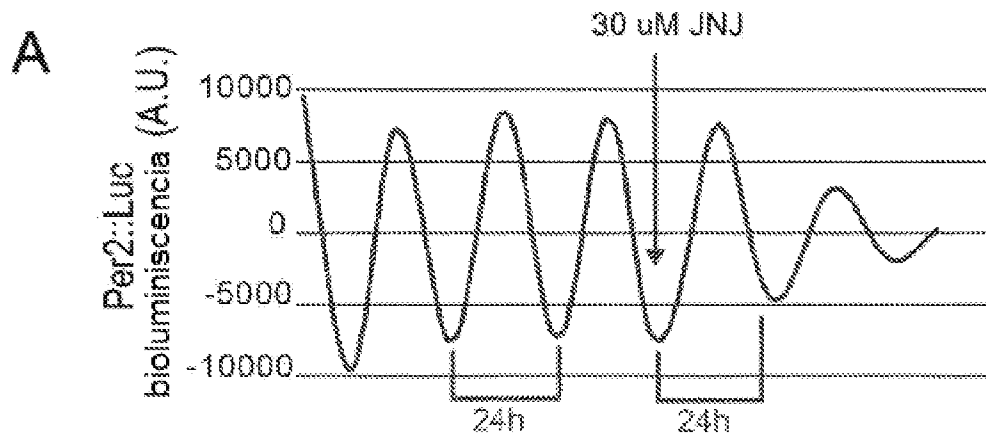


Figura 3
continuación

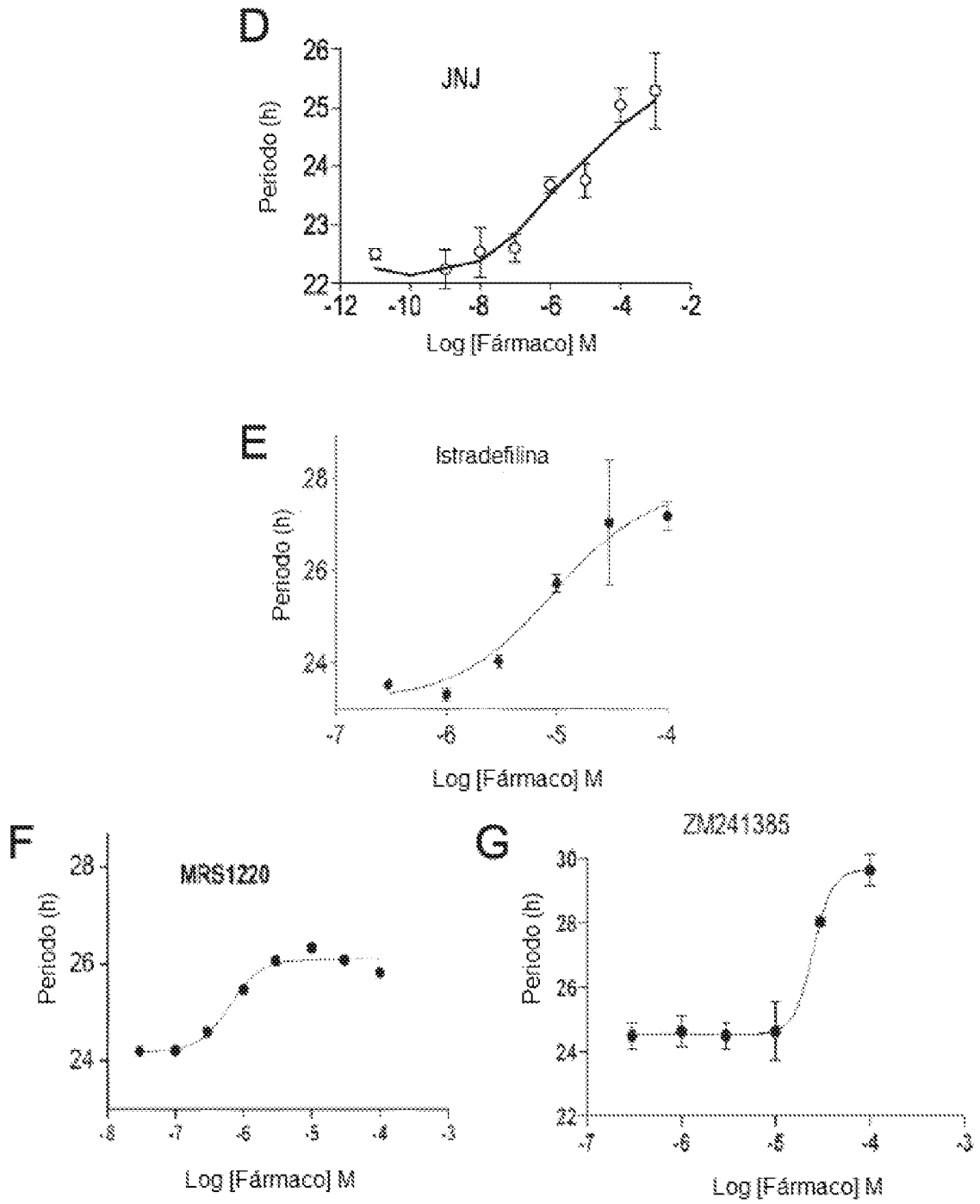


Figura 3 continuación

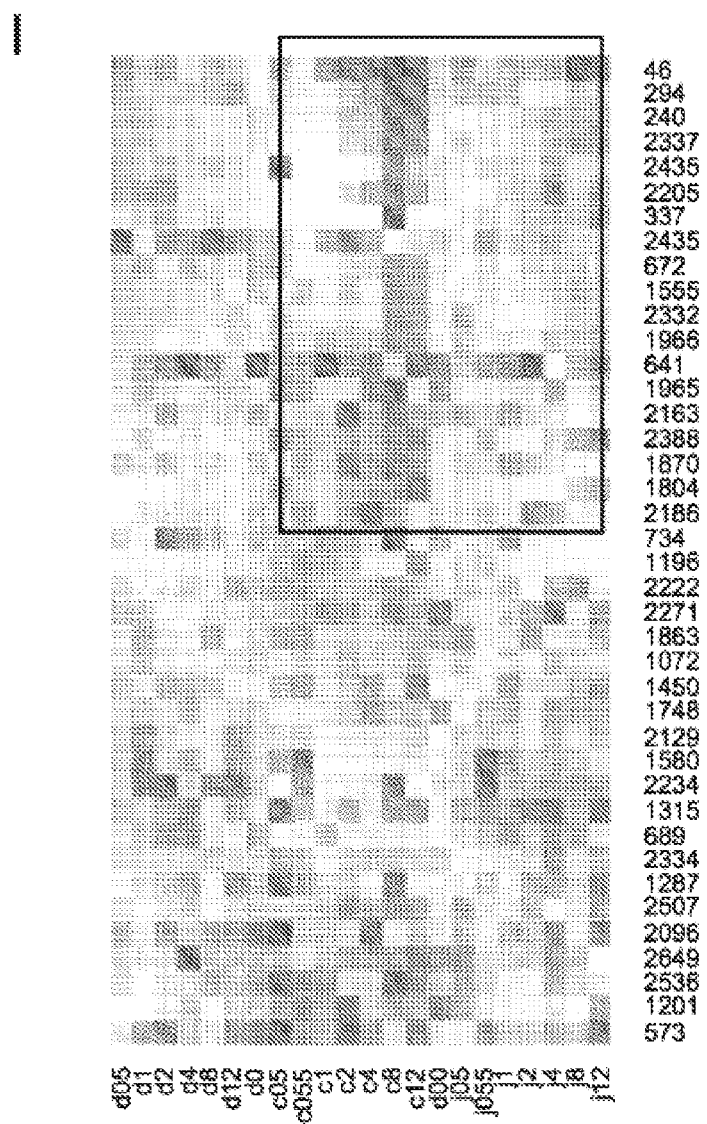
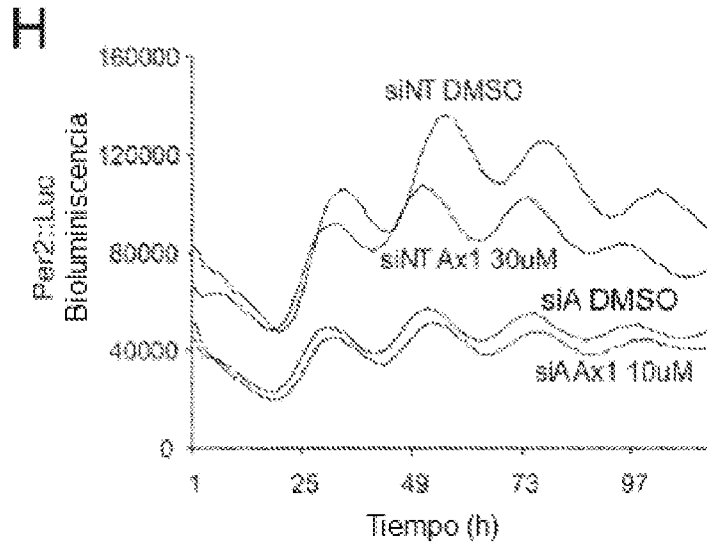


Figura 3
continuación

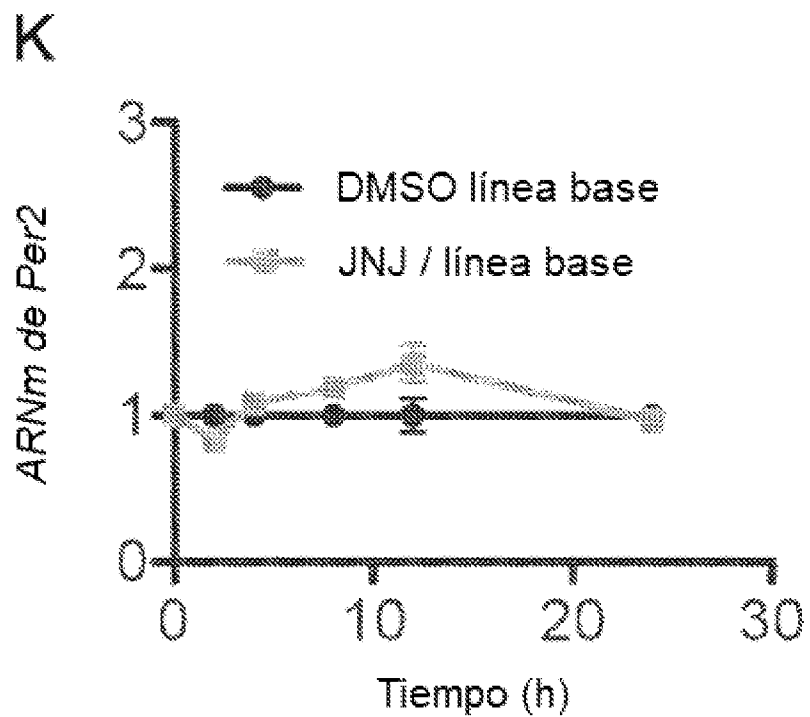
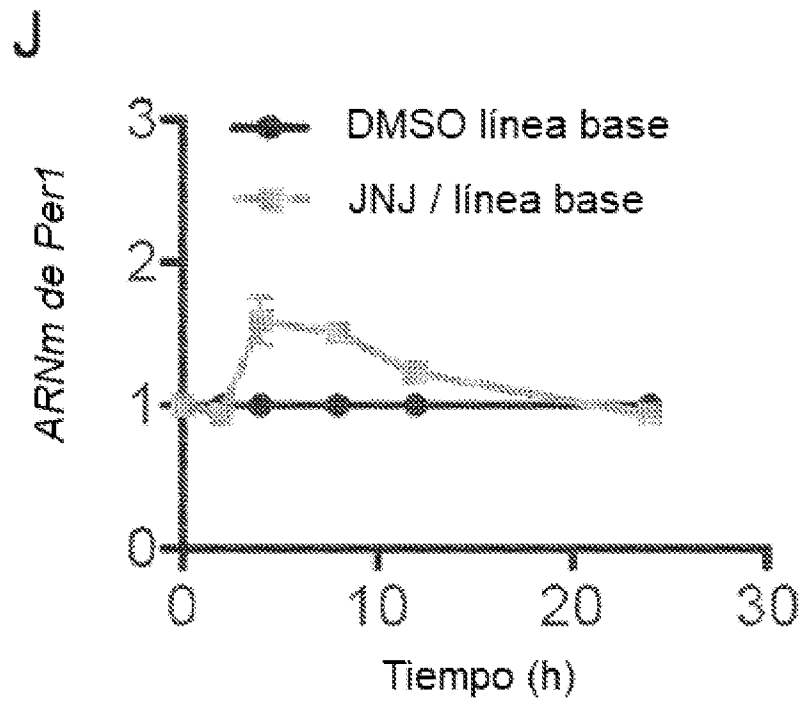


Figura 4

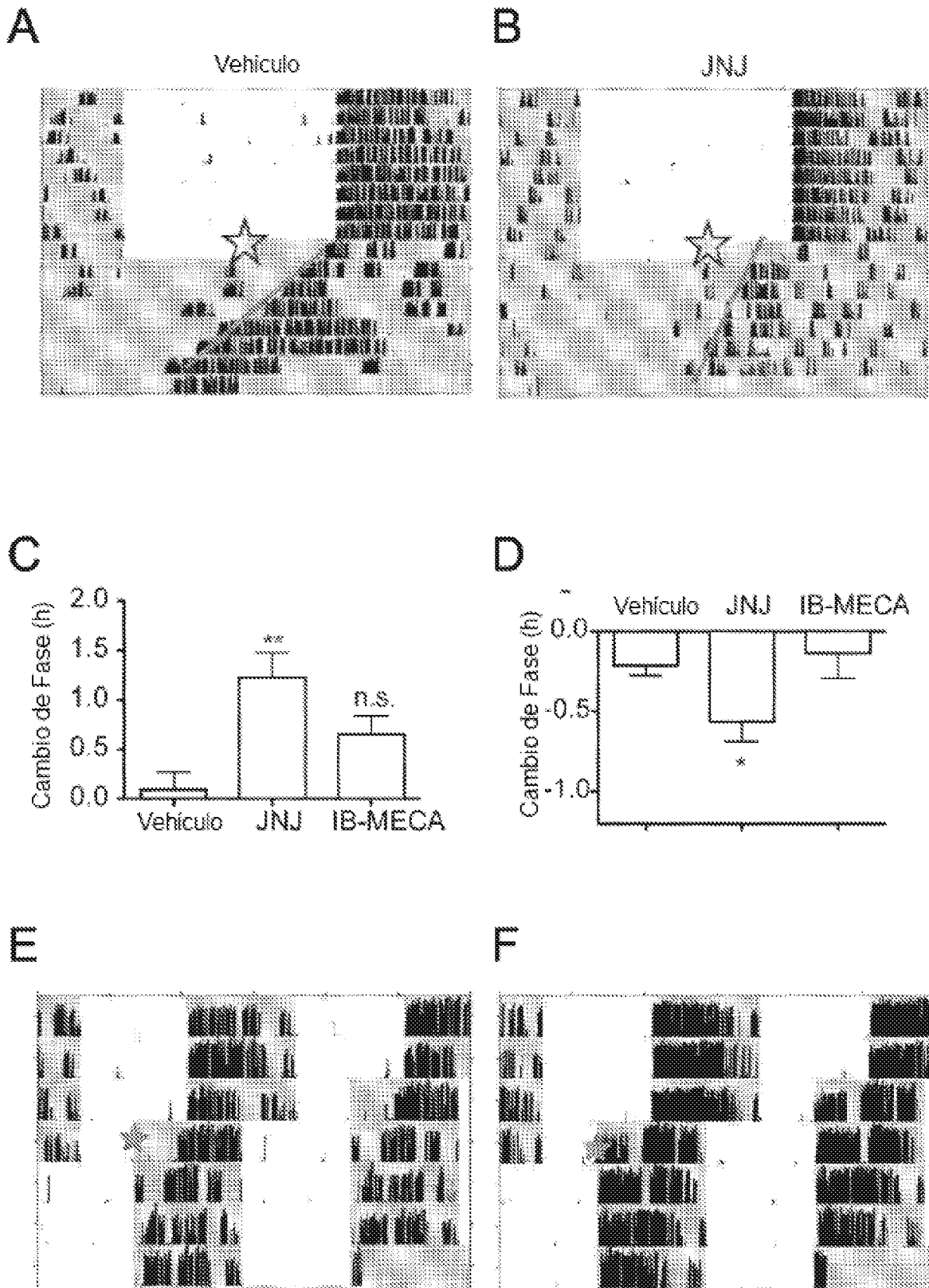


Figura 4 continuación

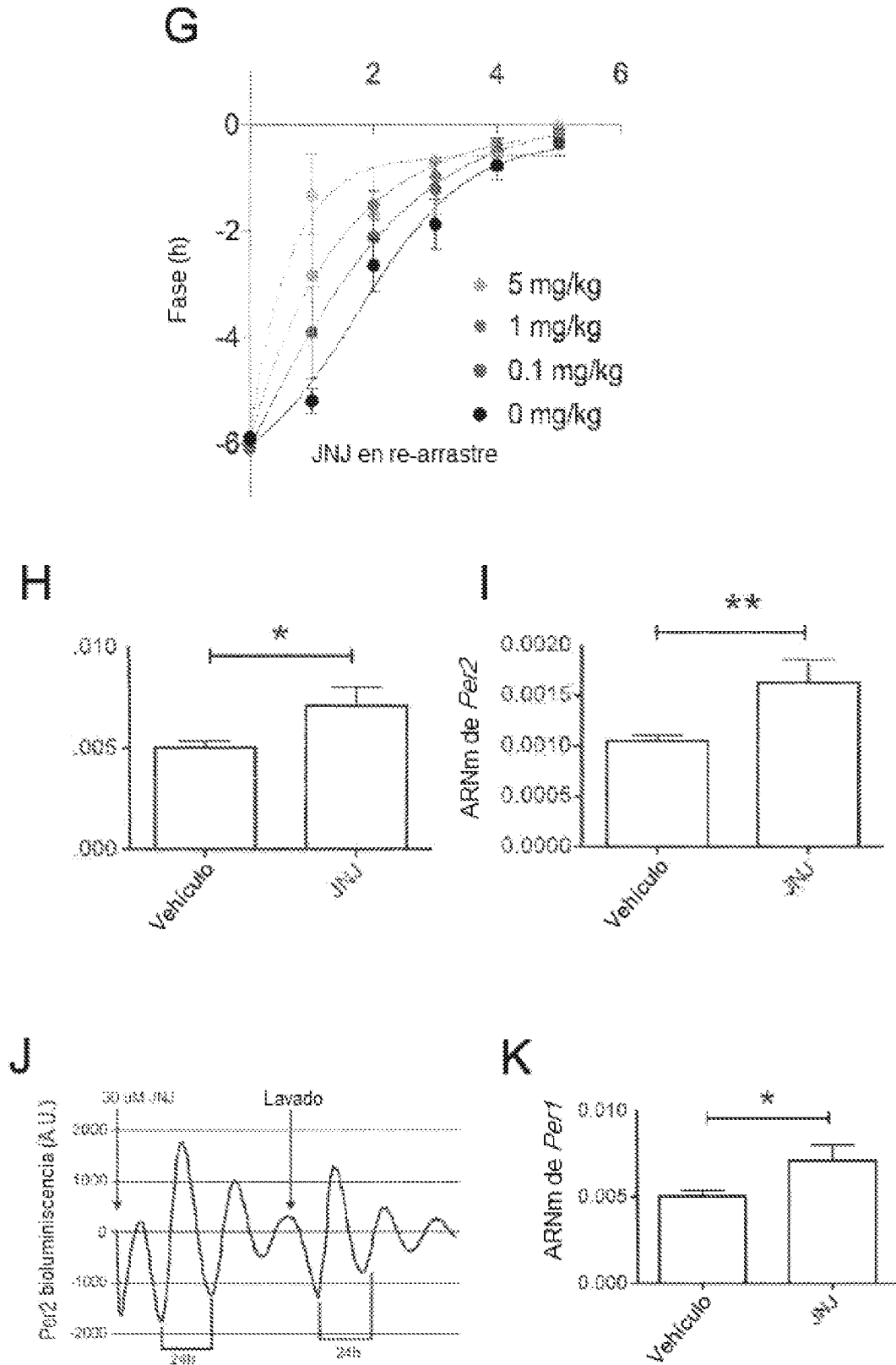


Figura 5

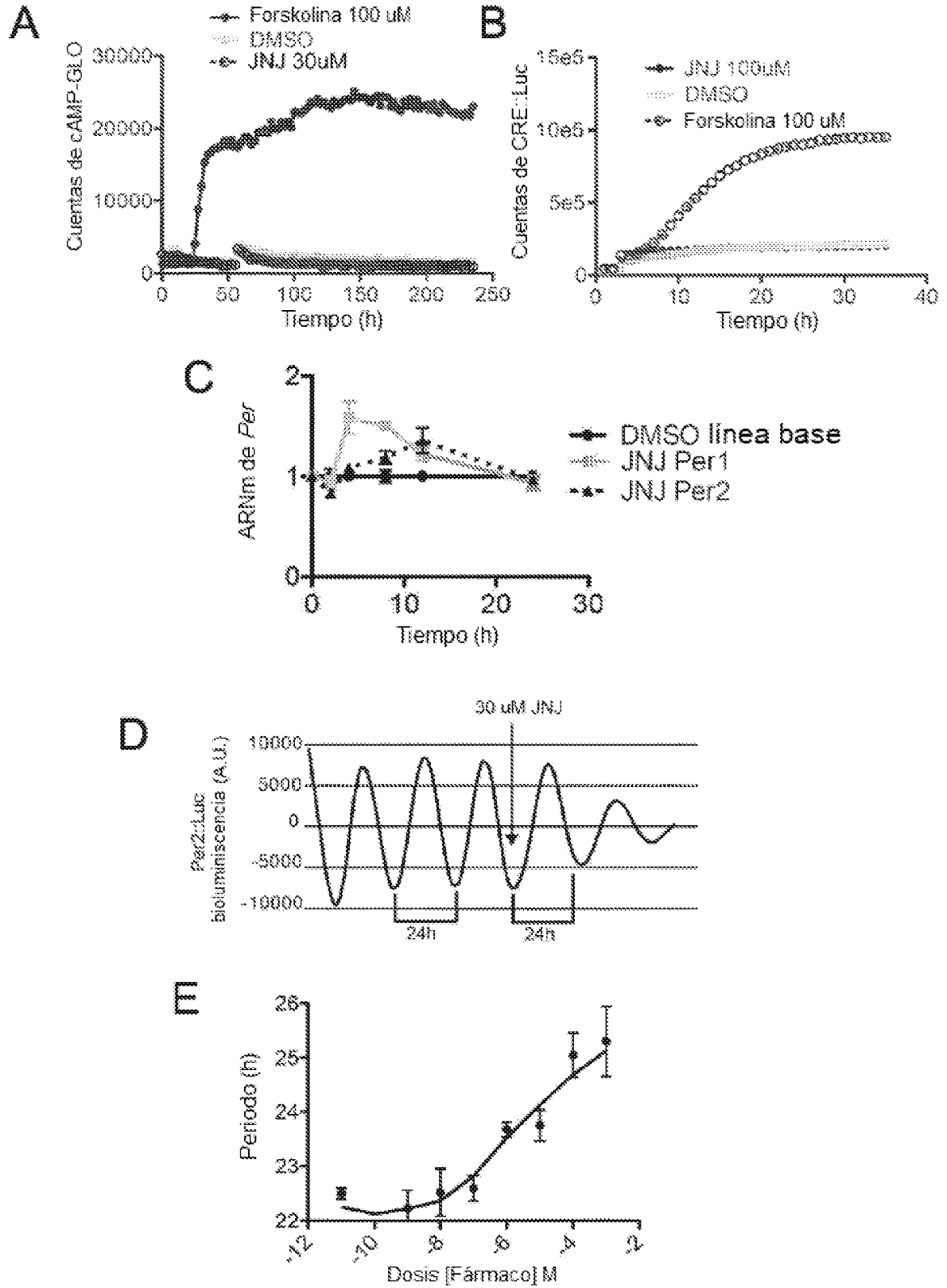


Figura 6

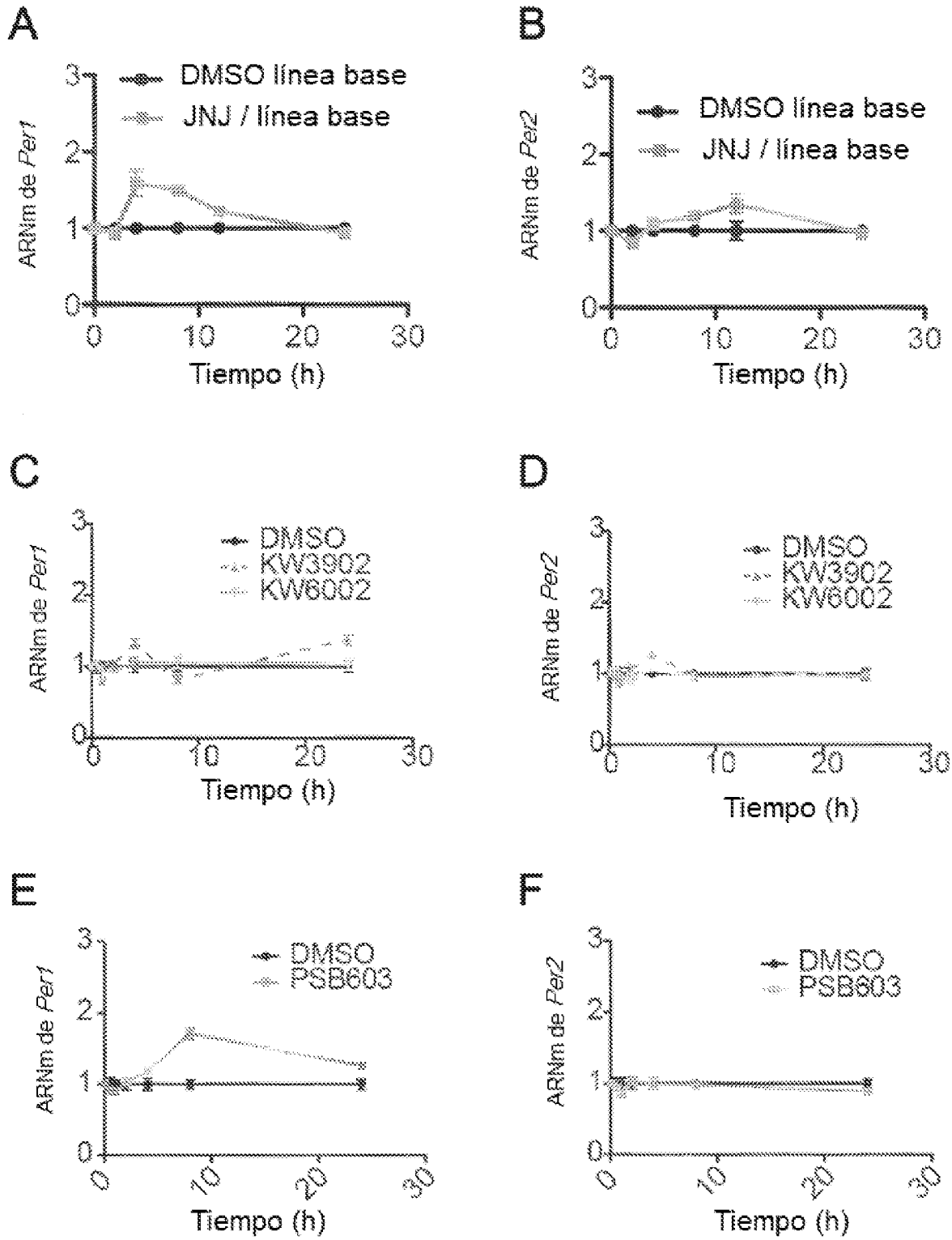


Figura 7

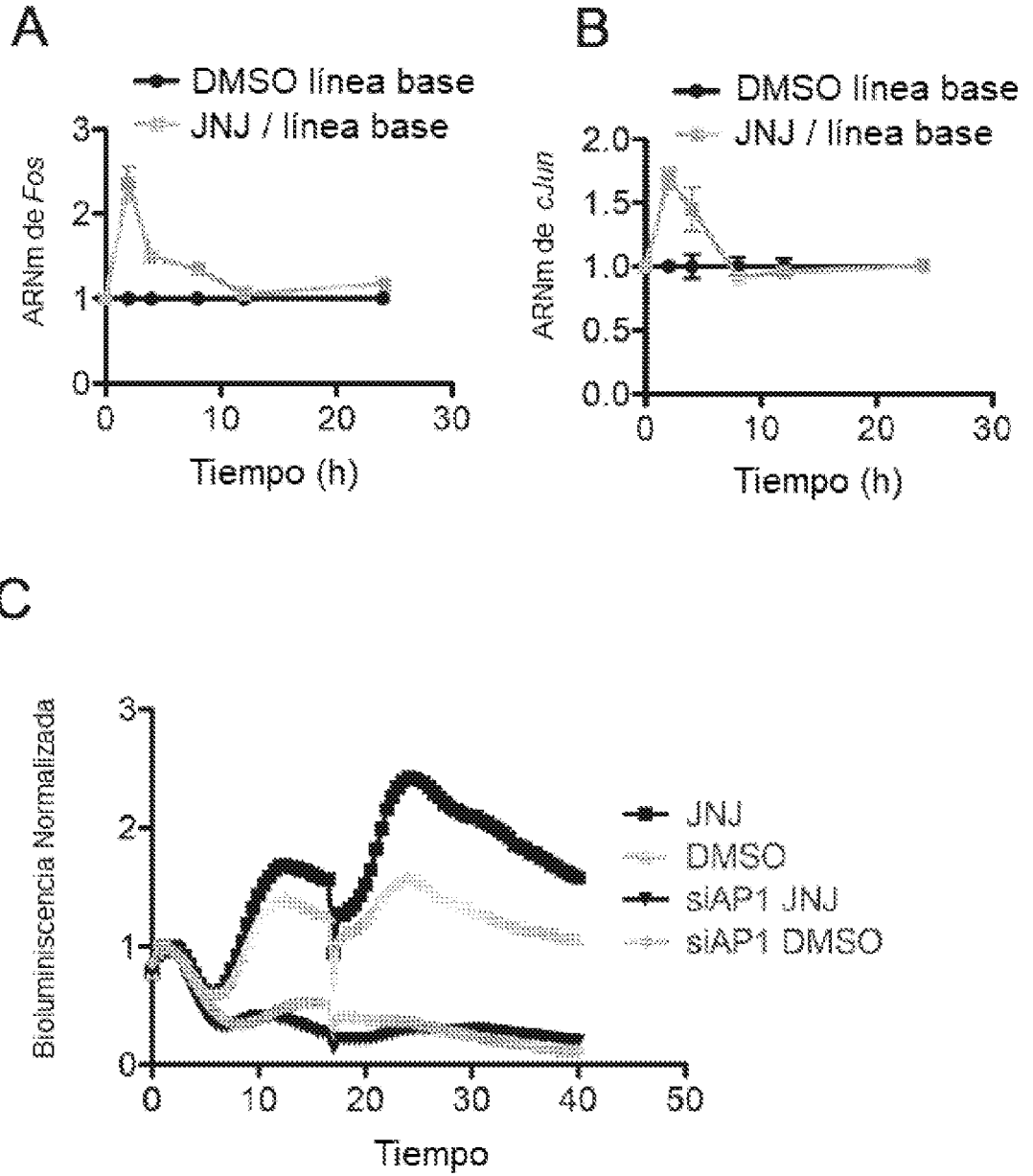


Figura 8

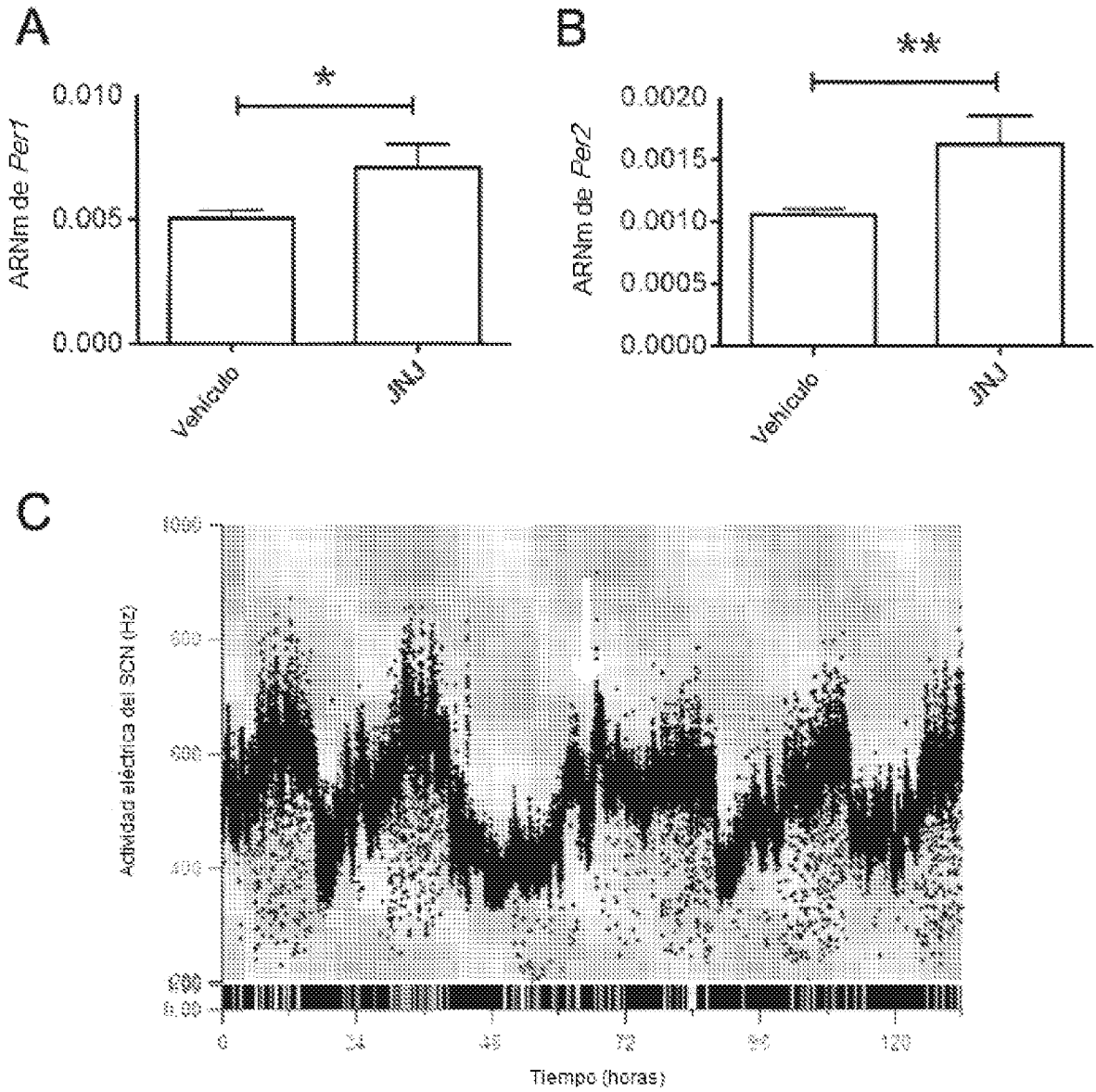
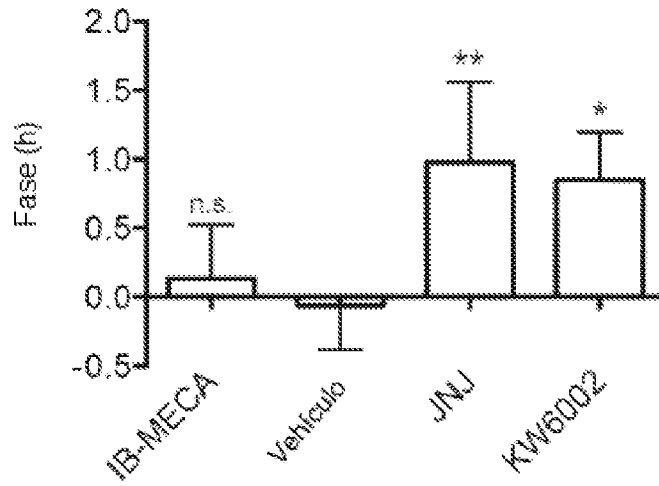
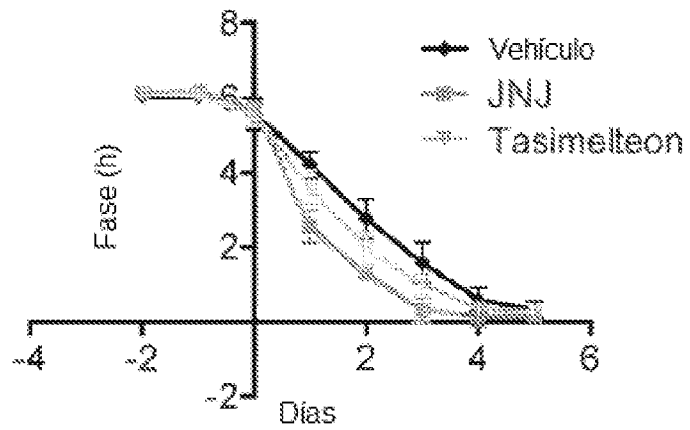


Figura 9

A



B



C

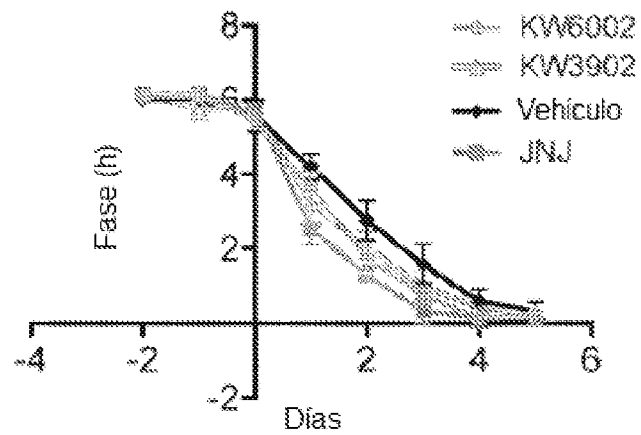
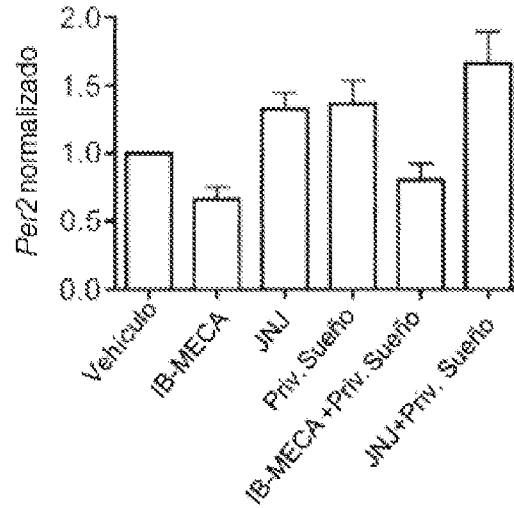
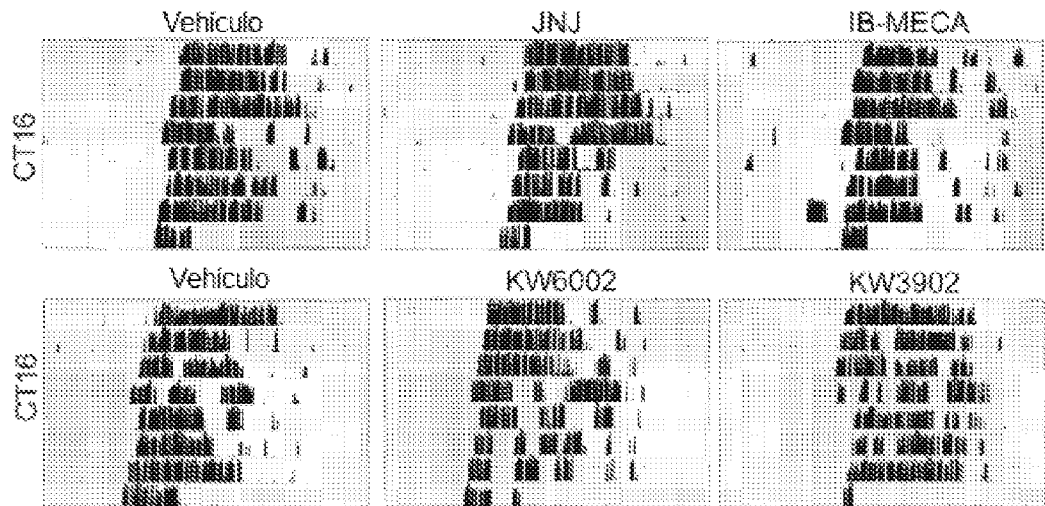


Figura 10

A



B



C

