

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/142827 A1

(43) Fecha de publicación internacional
16 de diciembre de 2010 (16.12.2010)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 31/7076 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2010/070374

(22) Fecha de presentación internacional:

7 de junio de 2010 (07.06.2010)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P200930298 11 de junio de 2009 (11.06.2009) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S. L.** [ES/ES]; Avda. Pío XII 22, Oficina 1, E-31008 Pamplona (ES).

(72) Inventor; e

(75) Inventor/Solicitante (para US solamente): **VILLOSLADA DÍAZ, Pablo** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII 53, E-31008 Pamplona (ES).

(74) Mandatario: **PONTI SALES, Adelaida**; C. Consell de Cent, 322, E-08007 Barcelona (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR,

BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i))
- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: 5'-METHYLTHIOADENOSINE NEUROPROTECTIVE PROPERTIES

(54) Título : PROPIEDADES NEUROPROTECTORAS DE 5'-METILTIOADENOSINA

(57) Abstract: The present invention relates to the use of MTA, the pharmaceutically acceptable salts thereof and/or prodrugs thereof as active principle in the production of a medicament for preventing or treating nerve-cell damage or death, a neuroprotective medicament, a medicament for regenerating nerve cells, and a medicament for preventing or treating a neurological or psychiatric disorder. The present invention likewise relates to a method for preventing or treating nerve-cell damage or death, to a neuroprotection method, to a nerve-cell regeneration method and to a method for preventing or treating a neurological or psychiatric disorder.

(57) Resumen: La presente invención se refiere al uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas como principio activo en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la muerte o el daño de células nerviosas, un medicamento neuroprotector, un medicamento para la regeneración de células nerviosas, y un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica. La presente invención también se refiere a un método de prevención o tratamiento de la muerte o daño de células nerviosas, a un método de neuroprotección, a un método de regeneración de células nerviosas y a un método de prevención o tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica



WO 2010/142827 A1

PROPIEDADES NEUROPROTECTORAS DE 5'-METILTIOADENOSINA

Campo de la invención

La presente invención se aplica en el área de agentes terapéuticos para trastornos neurológicos, psiquiátricos y para el envejecimiento. En particular, se refiere al efecto neuroprotector de la pequeña molécula 5'-metiltioadenosina.

Antecedentes de la invención

El envejecimiento y los trastornos neurológicos y psiquiátricos provocan el daño y la muerte a las células nerviosas. Entre las lesiones frecuentes y relevantes del sistema nervioso se incluyen, entre otras, la degeneración neuronal, isquemia, inflamación, respuestas inmunes, traumatismos y cáncer. Como consecuencia de éstas, las células nerviosas pueden morir en unos minutos u horas o sobreviven a esta lesión inicial en un estado dañado que activa la neurodegeneración, finalizando igualmente en la muerte celular.

Dada la importancia del sistema nervioso al posibilitar las habilidades motoras básicas y la sensibilidad, existe un interés por encontrar armas terapéuticas para proteger el sistema nervioso.

La neuroprotección está dirigida a la conservación, recuperación, cura o regeneración del sistema nervioso, sus células, estructura y función (Vajda et al. 2002, J Clin Neurosci 9:4-8). Un objetivo de la neuroprotección es prevenir o minimizar los efectos de una lesión original en el sistema nervioso, o prevenir o minimizar las consecuencias de procesos nocivos endógenos u exógenos que provocan el daño en los axones, neuronas, sinapsis y dendritas.

En general, las estrategias de tratamiento se basan frecuentemente en la modulación de un único factor de lesión propuesto. Aunque se puede observar que dichos tratamientos son beneficiosos en modelos animales muy limitados, es menos probable que se muestren eficaces en el trastorno humano más complejo que implica grados más variables de severidad de la lesión en una población genéticamente diversa (Faden and Stoica 2007, Arch Neurol.; 64:794-800). En gran medida, dado que los presuntos mecanismos de muerte neuronal tales como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la agregación de proteínas, la apoptosis y la inflamación (Youdim et al. 2005, TIPS 26:27-35), son tanto complejos como variados, se desean compuestos únicos que tengan efectos multipotenciales sobre los múltiples mecanismos de la lesión.

Se encuentran bajo investigación varios fármacos neuroprotectores que incluyen las siguientes clases: agentes antiinflamatorios, antagonistas de N-metil D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA), daxanabinol, bloqueadores de los canales de sodio, hormona liberadora de tirotrópina (TRH), factores de crecimiento, glucocorticoides, cafeinol, antagonistas opioides, inhibidores de apoptosis,

atrapadores/secuestradores de radicales libres, eritropoyetina, bloqueadores de los canales de calcio, sulfato de magnesio, estatinas.

La capacidad de estos agentes farmacológicos para limitar el daño bioquímico secundario y la muerte celular ha quedado bien establecida en numerosos modelos animales de apoplejía, traumatismo craneal y lesión de la médula espinal, aunque los resultados de dichas estrategias de tratamiento neuroprotector en lesiones en humanos ha sido decepcionante (Faden and Stoica 2007, Arch Neurol.; 64:794-800). Por tanto, existe una actual necesidad vigente de proporcionar fármacos con propiedades neuroprotectoras que tengan preferiblemente efectos multipotenciales.

La 5⁺-metiltioadenosina (MTA) es un nucleósido de adenina lipofílico que contiene azufre, producido a partir de S-adenosilmetionina (SAM) durante la síntesis de las poliaminas espermina y espermidina. La MTA es un fármaco adecuado para formulaciones orales debido a su pequeño tamaño y su carácter hidrofílico.

Se ha descrito que la MTA presenta actividad inmunomoduladora mediante la supresión de la producción de genes y citoquinas proinflamatorias (interferón- γ , factor de necrosis tumoral α y óxido nítrico sintasa inducible) y el aumento de la producción de citoquinas antiinflamatorias (interleuquina-10); y la inversión de la enfermedad autoinmune cerebral; sugiriendo así efectos beneficiosos para la esclerosis múltiple y otras enfermedades autoinmunes (Moreno et al. Diss. Abstr. Int., C 2007, 68(1), 111; Ann Neurol 2006; 60: 323–334). En este aspecto, el documento WO2006097547 describe la MTA para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tales como la esclerosis múltiple (MS) y en la prevención y/o el tratamiento del rechazo de trasplantes. Además, el documento US 4.454.122 (Bioresearch S.r.l.) describe el uso de MTA como compuesto antiinflamatorio, antipirético y analgésico.

En dos estudios por Kang et al. (Zhongguo Shenjing Kexue Zazhi 1999, 15(4), 289-296; Yike Daxue Xuebao 1999, 26(5), 318-320), se ha sugerido que la MTA podría inhibir parcialmente la astrogliosis reactiva. La astrogliosis (astrocitosis) es un incremento anormal en el número de astrocitos debido a la destrucción de neuronas próximas, habitualmente debido a hipoglucemia o falta de oxígeno (hipoxia). La astrogliosis es un descubrimiento patológico principal en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS).

El documento EP 526866 (Bioresearch S.p.A.) describe que los compuestos de adenosina son adecuados para su uso terapéutico en diversas situaciones de isquemia, tales como casos de isquemia cerebral o miocárdica o para isquemia de cualquier tipo de órgano o tejido.

En la revisión por Ávila et al. (Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36(11):2125-30), los autores sugieren que la MTA puede realizar procesos celulares de muchas maneras, influyendo en numerosas respuestas críticas de la células, incluyendo la regulación de la expresión génica, la

proliferación, la diferenciación y la apoptosis. Proponen un potencial terapéutico para MTA debido a las observaciones en modelos de daño hepático y cáncer.

En un amplio esfuerzo por explorar el potencial neuroprotector de MTA, se ha observado sorprendentemente que la MTA de hecho es eficaz en la protección de astrocitos y neuronas del córtex cerebral privado de oxígeno y glucosa; en la protección de neuronas del hipocampo *Cornu Ammonis* (CA1) con respecto a la muerte celular después de una isquemia global; en la protección de oligodendrocitos con respecto a la excitotoxicidad y el daño en el tejido de los nervios ópticos después de isquemia; en la protección de un cultivo de células gliales-neuronales sometido a excitotoxicidad; en la disminución del número de axones distróficos y en la prevención de la pérdida de mielina y axones.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere al uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas como principio activo en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la muerte o el daño de células nerviosas. En otras palabras, la presente invención se refiere a MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso en la prevención o el tratamiento de la muerte o el daño de células nerviosas. De manera similar, la presente invención también se refiere a un método de prevención o tratamiento de la muerte o daño de células nerviosas que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas.

La presente invención también se refiere al uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas como principio activo en la fabricación de un medicamento neuroprotector. En otras palabras, la presente invención también se refiere a MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso como fármaco neuroprotector. De manera similar, la presente invención se refiere a un método de neuroprotección que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas.

La presente invención se refiere además al uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas como principio activo en la fabricación de un medicamento para la regeneración de células nerviosas. En otras palabras, la presente invención también se refiere a MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso en la regeneración de células nerviosas. De manera similar, la presente invención también se refiere a un método de regeneración de células nerviosas que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de MTA de

una de sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas.

La presente invención se refiere además al uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas como principio activo en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica. En otras palabras, la presente invención también se refiere a MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica. De manera similar, la presente invención también se refiere a un método de prevención o tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de MTA de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas.

Descripción de las figuras

Figura 1: Perfil de toxicidad de MTA en cultivos mixtos de neuronas y astrocitos del córtex cerebral. El perfil de toxicidad de MTA muestra que el compuesto es inocuo a las concentraciones analizadas en los cultivos mixtos de neuronas y astrocitos del córtex cerebral. (A) Ensayos de viabilidad utilizando calceína-AM. (B) Ensayos de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). En ambos casos, la MTA es no tóxica para los co-cultivos de neurona-astrocito a las concentraciones analizadas.

Figura 2: La MTA protege de la isquemia simulada en cultivos mixtos de neuronas y astrocitos obtenidos del córtex cerebral. Daño inducido por la privación de oxígeno y glucosa (OGD) y protección por MTA en cultivos mixtos de neuronas y astrocitos obtenidos del córtex cerebral. Se ensayaron dos casos de isquemia utilizando yodoacetato (IAA) a 20 ó 50 μM (Fig. 2A ó 2B, respectivamente). En ambos casos, la MTA era altamente protectora. Para fines comparativos, también se ensayó el ácido (2R)-amino-5-fosfonovalérico (APV), un antagonista del receptor de NMDA. MTA a 10 μM que era incluso más protector que APV (50 μM). * o # $p < 0,05$; ** o ## $p < 0,01$.

Figura 3: Tratamiento con MTA de ratas después de isquemia focal. La MTA no protege del daño tisular cerebral después de 90 minutos de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). El tratamiento con MTA se inició a los 30 minutos desde el inicio de la isquemia (i.p., dos veces diaria). Las ratas se sacrificaron a los tres días de reperfusión, se cortaron en láminas y se tiñeron con cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio (TTC) para observar la región dañada. Los valores representan la media \pm Error Estándar de la media (SEM) del área dañada.

Figura 4: Tratamiento con MTA de ratas después de isquemia global. La MTA protege las neuronas del hipocampo CA1 con respecto a la muerte celular después de 10 minutos de isquemia global. EL tratamiento con MTA se inició 30 minutos después de la isquemia (i.p,

dos veces diaria). Las ratas se sacrificaron a los 7 días de la reperfusión, se seccionaron y se tiñeron con Fluoro-jade para observar las células moribundas. Los valores representan la media \pm SEM de fluorescencia en unidades arbitrarias (AU), $P < 0,01$.

Figura 5: Perfil de toxicidad de MTA en oligodendrocitos y protección de lesiones excitotóxicas. Perfil de toxicidad de MTA en oligodendrocitos cultivados derivados del nervio óptico (A). (B) La MTA protege los oligodendrocitos de lesiones excitotóxicas de baja intensidad con AMPA (10 μ M). Sin embargo, no protege los oligodendrocitos de la muerte a dosis elevada de AMPA (100 μ M).

Figura 6: La MTA protege de la isquemia simulada en nervios ópticos. El daño inducido por OGD en el nervio óptico aislado fue atenuado por los antagonistas de receptores de AMPA/kainato y NMDA 6-ciano-7-nitro-quinoxalin-2,3-diona (CNQX) y APV, solos o juntos (parte superior). Además, la MTA también era protectora (parte inferior). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 7: Evolución con el tiempo de la neurotoxicidad mediada por NMDA en un cultivo neuronal puro. Los datos representan la media + s.e. de 12 experimentos. *** $p < 0,01$ en comparación con el vehículo.

Figura 8: Curva concentración-respuesta de neurotoxicidad mediada por NMDA en un cultivo neuronal puro. Los datos representan la media + s.e. de 12 experimentos. *** $p < 0,01$ en comparación con el vehículo.

Figura 9: Evolución con el tiempo del incremento en actividad de caspasa 3 mediada por NMDA en un cultivo neuronal puro. Los datos representan la media + s.e. de 12 experimentos. ** $p < 0,05$ en comparación con el vehículo.

Figura 10: Ausencia de efecto de la MTA (100 a 500 μ M) en la toxicidad mediada por NMDA en un cultivo neuronal puro. Los datos representan la media + s.e. de 12 experimentos. MK (MK-801, 10 μ M) *** $p < 0,001$ en comparación con NMDA.

Figura 11: Ausencia de efecto de la MTA (100 a 500 μ M) en el incremento en la actividad de caspasa 3 mediada por NMDA en un cultivo neuronal puro. Los datos representan la media + s.e. de 12 experimentos. MK (MK-801, 10 μ M) *** $p < 0,001$ en comparación con el vehículo y NMDA.

Figura 12: Efecto de la MTA (250 μ M) el incremento en la actividad de caspasa 3 mediada por NMDA en un cultivo mixto de células neuronales y gliales. Los datos representan la media + s.e. de 12 experimentos. MK (MK-801, 10 μ M) *** $p < 0,001$ en comparación con el vehículo y NMDA.

Figura 13a: Modelo de neuroinflamación en cultivos organotípicos cerebelares.

A) Inmunotinción para proteína básica de la mielina (MBP) (verde) y subunidad de neurofilamento (NFL) (rojo) obtenidos mediante microscopía confocal. Los cultivos de control

muestran vainas de mielina (en verde) que se alinean a menudo con axones (panel a y d). La inmunotinción después del tratamiento con lipopolisacáridos (LPS) 15 $\mu\text{g/ml}$ muestra sólo unos pocos neurofilamentos mielinados (panel c y f), mientras que los cultivos organotípicos tratados con 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS muestra una mielinación más conservada y menos hinchamiento axonal (panel b y e). En los paneles g-i se muestra la tinción de neurofilamentos ligeros. Los cultivos organotípicos cerebelares tratados con 15 $\mu\text{g/ml}$ de LPS mostraban hinchamiento axonal (flechas en el panel i) y transección axonal (cabezas de flecha en el panel i) ausentes en el control y en cultivos organotípicos tratados con 5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS. Cultivos organotípicos teñidos después de 24 horas de tratamiento. Escala de la barra 50 μm (en los paneles a-c), 10 μm (en los paneles d-f) y 20 μm (en los paneles g-i). B) Concentración de TNF-alfa medida mediante ELISA. Los tratamientos con LPS (5 $\mu\text{g/ml}$ y 15 $\mu\text{g/ml}$) inducen una liberación en el medio alcanzando el máximo de TNF-alfa a las 3 horas. C) Análisis de transferencia por Western-blot para CNPasa, APP, iNOS y GAPDH. 15 $\mu\text{g/ml}$ de LPS inducen la desmielinación (primer panel superior), el daño axonal (segundo panel superior), y el estrés oxidativo (iNOS en el tercer panel superior) a las 24 horas de tratamiento y el incremento de GAPDH empieza desde 1 hora hasta 96 horas. 5 $\mu\text{g/ml}$ inducen menos desmielinación (primer panel inferior) y un ligero daño axonal a las 12 horas (segundo panel inferior). El estrés oxidativo (iNOS y GAPDH) mostró el mismo incremento (tercer panel inferior y cuarto panel inferior) que en el cultivo organotípico tratado con 15 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 13b: Activación de microglia en cultivo organotípico de cerebelo de ratón.

A) Marcaje para MHCII visualizado al microscopio confocal. En el panel 2 se puede observar un número mayor de células positivas para MHCII respecto al control no tratado con LPS (panel 1). En el panel 3 se muestra un aumento del panel 2. B) El gráfico muestra como el tratamiento con LPS induce activación de MHCII a las tres horas tras el tratamiento.

Figura 14: MTA como neuroprotector en un modelo de neuroinflamación.

A) Inmunotinción para MBP (verde) y NFL (rojo) obtenidos mediante microscopía confocal. Los cultivos de control muestran vainas de mielina (en verde) que se alinean a menudo con axones (panel a y d). La inmunotinción después del tratamiento con LPS 15 $\mu\text{g/ml}$ muestra sólo unos pocos neurofilamentos mielinados (panel b y e), mientras que los cultivos organotípicos tratados con 192 μM de MTA muestran vainas de mielina que se alinean a menudo con axones (panel c y f). En los paneles g-i se muestra la tinción de neurofilamentos ligeros. Los cultivos organotípicos cerebelares tratados con 15 $\mu\text{g/ml}$ de LPS mostraban hinchamiento axonal (flechas en el panel h) y transección axonal (cabezas de flecha en el panel h) ausentes en el control y en cultivos organotípicos tratados con MTA (paneles g, i). Cultivos organotípicos teñidos después de 24 horas de tratamiento. Escala de la barra 50 μm (en los

paneles a-c), 5 μm (en los paneles d-f) y 20 μm (en los paneles g-i). B) Concentración de IL1-beta Medida mediante ELISA. Los tratamientos con LPS inducen una liberación en el medio que alcanza el máximo a las 3 horas. El tratamiento con MTA induce una liberación de menor cantidad de IL1-beta a las 3 horas. C) Análisis de transferencia Western para CNPasa y APP. En el modelo de neuroinflamación, 15 $\mu\text{g/ml}$ de LPS inducen la desmielinización (primer panel superior) y el daño axonal (segundo panel superior) a las 24 horas de tratamiento, ausentes en cultivos organotípicos tratados con MTA (primer y segundo panel inferior).

Figura 15: Valoración clínica de ratones C57B6 que padecen EAE crónica y tratados con MTA después del inicio de la enfermedad. Día 1: primer día con una valoración de EAE de 2 o superior; Placebo (cuadros negros), MTA 96 $\mu\text{Mol/Kg}$ (cuadros blancos).

Figura 16: Cuantificación de la densidad axonal (tal como se describe en los métodos) en animales tratados con placebo (negro) o MTA (blanco) en las dos localizaciones de la médula espinal (médula espinal cervical y lumbar).

Figura 17. Ejemplos representativos de inmunorreactividad NeuN del hipocampo a los 30 días después de estatus epiléptico (SE) inducido por pilocarpina en ratas adultas tratadas con las pautas de MTA pre-SE (A), MTA post-SE (B) o vehículo (C). A, el sujeto con MTA pre-SE muestra una buena conservación de las neuronas en el giro dentado y la capa de células piramidales, mientras que la rata en el grupo MTA post-SE muestra sólo una leve pérdida celular en el giro dentado (flecha en B). El control muestra una pérdida celular severa tanto en el giro dentado como en la capa de células piramidales del área CA1 (C).

Figura 18. Efecto de MTA post-SE en la región del hipocampo CA1 de rata. Se indujo un episodio de 90 minutos en ratas adultas con tratamiento con pilocarpina y se terminó con diazepam. Inmediatamente después de la terminación de SE, se inició el tratamiento con MTA diariamente durante 3 días. Las ratas se sacrificaron 28 días después del final del tratamiento con MTA. Las ratas de control recibieron tampón Tris en lugar de MTA. Se muestran las medias \pm SEM. Se observó una tendencia no significativa hacia un incremento en el número de células en el grupo con MTA ($p=0,057$).

Figura 19. Efecto de MTA en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas (células TH) en el modelo de animal de la enfermedad de Parkinson, los ratones C57B6 tratados con MPTP. Los animales de control presentan una densidad normal de células TH en su sustancia negra. Los animales tratados con MPTP presentan un descenso en el número de neuronas TH de un 40% en comparación con los controles. En cambio, los animales tratados con MTA (96 μM) después de ser expuestos a MPTP presentan una reducción no significativa en el número de neuronas TH en comparación con los controles (10%) y un número significativamente superior de neuronas TH que los animales con MPTP.

Figura 20. Efecto de MTA en la diferenciación neuronal. A) Células PC12 tratadas durante 4 días con NGF (100 ng/ml) o MTA a diferentes concentraciones. Se observan las diferencias en el desarrollo de neuritas con los distintos tratamientos. B) Cuantificación de neuritas en células PC12 tratadas con NGF (100 ng/ml) o diferentes concentraciones de MTA durante 4 días. Los resultados se expresan en porcentaje de diferenciación respecto al control con NGF.

Figuras 21A, 21B, 21C. Cuantificación del porcentaje de fosforilación de diferentes proteínas intracelulares en células PC12 tratadas con NGF (100 ng/ml) o MTA a diferentes concentraciones durante 4 días mediante tecnología Luminex.

Figura 22. Porcentaje de viabilidad celular (ensayo MTT) en células RN22 expuestas a estrés con sulfato de cobre (150 μ M) y tratadas con NGF (100 ng/ml) o MTA a diferentes concentraciones durante 24 horas.

Figura 23. Determinación de niveles de ROS en células RN22 expuestas a estrés con sulfato de cobre (150 μ M) y tratadas con NGF (100 ng/ml) o MTA a diferentes concentraciones durante distintos tiempos.

Figura 24. Porcentaje de viabilidad celular (ensayo MTT) en células RN22 expuestas a estrés con peróxido de hidrógeno (100 μ M) y tratadas con MTA a diferentes concentraciones durante 24 horas.

Figura 25. Determinación de niveles de ROS en células RN22 expuestas a estrés con peróxido de hidrógeno (100 μ M) y tratadas con MTA a diferentes concentraciones durante distintos tiempos.

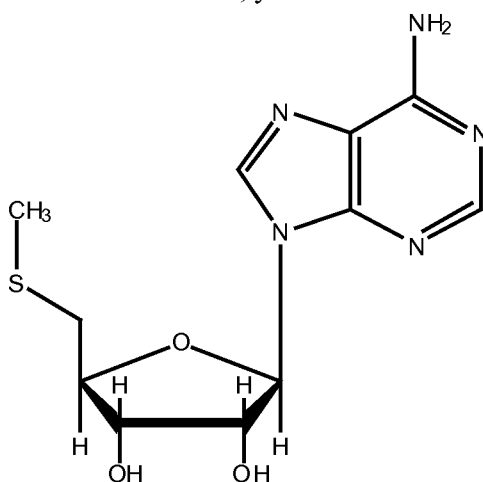
Descripción de la invención

La presente invención se refiere al uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas como principio activo en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la muerte o el daño de células nerviosas. En otras palabras, la presente invención se refiere a MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso en la prevención o el tratamiento de la muerte o el daño de células nerviosas. De manera similar, la presente invención también se refiere a un método de neuroprotección que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas.

La presente invención también se refiere al uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas como principio activo en la fabricación de un medicamento neuroprotector. En otras palabras, la presente invención también se refiere a MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso como fármaco neuroprotector. De manera similar, la presente invención también se refiere a un método de prevención o tratamiento de la muerte o el daño de células nerviosas que

comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas.

MTA, a la que también se hace referencia aquí como 5'-metiltioadenosina, es un producto comercial que puede ser proporcionado, por ejemplo por la compañía Sigma. Alternativamente, este compuesto se puede obtener mediante métodos conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, a partir de S-adenosil-metionina (SAM) según el procedimiento descrito por Schlenk F. et al., Arch. Biochem. Biophys., 1964, 106:95-100. El número de registro CAS de MTA es 2457-80-9, y su fórmula estructural es:



El término “profármaco”, tal como se utiliza en la presente invención, incluye cualquier compuesto derivado de MTA, por ejemplo, éster, amida, fosfato, etc., que, tras ser administrado a un individuo, es capaz de proporcionar MTA o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma, directa o indirectamente, a dicho individuo. Preferiblemente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad de MTA cuando se administra a un individuo o que induce la liberación de MTA en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica, siempre y cuando se pueda administrar a un individuo y que proporcione MTA en un compartimento biológico del individuo. La preparación de dicho profármaco se puede realizar mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Los profármacos de MTA se pueden preparar de manera práctica, por ejemplo, mediante la unión de un progrupo a uno o ambos grupos hidroxilo del anillo de ribosa. Un ejemplo de un profármaco de MTA es 2'-[(2Z)-3-(4-hidroxifenil)-2-metoxi-2-propenoato]-3'-[(2E)-3-(1H-imidazol-4-il)-2-propenoato]-5'-S-metil-5'-tio-adenosina (Journal of Medicinal Chemistry, 47(9):2243–2255, 2004). Otro ejemplo de un profármaco o precursor de MTA es S-adenosilmetionina (SAM).

El término “farmacéuticamente aceptable” significa que un compuesto o combinación de

compuestos es suficientemente compatible con los otros componentes de una formulación, y no son perjudiciales para el paciente hasta los niveles aceptables por los estándares de la industria.

Para uso terapéutico, las sales de 5'-metiltioadenosina son aquellas en las que el contraión es farmacéuticamente aceptable.

El término “sal” tal como se menciona en la presente invención pretende comprender cualquier sal estable que la MTA es capaz de formar. Las sales farmacéuticamente aceptables son las preferidas. Las sales que no son farmacéuticamente aceptables también están comprendidas en el alcance de la presente invención, ya que se refieren a intermedios que pueden ser útiles en la preparación de compuestos con actividad farmacológica.

La sales se pueden obtener de manera práctica mediante el tratamiento de la forma básica de MTA con dichos ácidos apropiados, tales como ácidos inorgánicos, tales como hidrácidos, por ejemplo, ácido clorhídrico o bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir, etanodioico), malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico (es decir, ácido hidroxibutanodioico), tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, p-aminosalicílico, pamoico y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden obtener mediante el tratamiento de la forma básica de MTA con dichos ácidos apropiados farmacéuticamente aceptables, tales como ácidos inorgánicos, por ejemplo, hidrácidos, incluyendo clorhídrico, bromhídrico y similares; ácido sulfúrico; ácido nítrico; ácido fosfórico y similares; o ácidos orgánicos, por ejemplo, acético, propanoico, hidroxiacético, 2-hidroxiopropanoico, 2-oxopropanoico, oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, málico, tartárico, 2-hidroxi-1,2,3-propano-tricarboxílico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, 4-metilbencenosulfónico, ciclohexanosulfámico, 2-hidroxibenzoico, 4-amino-2-hidroxibenzoico u ácidos similares.

A la inversa, la forma de sal se puede convertir mediante el tratamiento con álcali en la forma básica libre.

El término “prevenir” se refiere a evitar que ocurra, que exista o alternativamente se retrase la aparición o reaparición de una enfermedad, trastorno o afección a la que se aplica dicho término, o de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o afección. El término “prevención” se refiere al hecho de prevenir, tal como se define “prevenir” inmediatamente antes.

El término “tratar”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a invertir, aliviar, o inhibir el progreso del trastorno o la afección a la que se aplica dicho término, o uno o más

síntomas de dichos trastornos o afecciones. El término “tratamiento” se refiere al hecho de tratar, tal como se define “tratar” inmediatamente antes.

El término “sujeto” significa animales, en particular mamíferos, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, gansos y humanos. Los sujetos particularmente preferidos son mamíferos, incluyendo humanos de ambos sexos.

Una “cantidad eficaz” de MTA y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, pueden estar en el intervalo de 0,01 mg a 50 g por día, de 0,02 mg a 40 g por día, de 0,05 mg a 30 g por día, de 0,1 mg a 20 g por día, de 0,2 mg a 10 g por día, de 0,5 mg a 5 g por día, de 1 mg a 3 g por día, de 2 mg a 2 g por día, de 5 mg a 1,5 g por día, de 10 mg a 1 g por día, de 10 mg a 500 mg por día.

Las células nerviosas incluyen aquellas células de cualquier región del cerebro, médula espinal, nervio óptico, retina y ganglios periféricos. Las neuronas incluyen las de un tejido neuronal embrionario, fetal o adulto humano, incluyendo tejido del hipocampo, cerebelo, médula espinal, incluyendo tejido del hipocampo, cerebelo, médula espinal, córtex (por ejemplo, córtex motor o somatosensorial), estriatum, prosencéfalo (neuronas colinérgicas), mesencéfalo ventral (células de la sustancia negra) y el locus ceruleus (células de neuroadrenalina del sistema nervioso central).

En una realización de la presente invención, MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas se pueden utilizar para la prevención o el tratamiento de una o más, preferiblemente dos o más, afecciones patológicas o perjudiciales relacionadas con la muerte o el daño de las células nerviosas seleccionadas entre, pero sin limitación, sustancias químicas, tales como condiciones de estrés oxidativo, sustancias tóxicas, organismos infecciosos, radiación, lesiones traumáticas, hipoxia, isquemia, proteínas anormales mal plegadas, excitotoxinas, radicales libres, estresantes del retículo endoplasmático, estresantes mitocondriales, incluyendo, pero sin limitación, inhibidores del cadena de transporte de electrones, antagonistas del aparato de Golgi, daño o pérdida axonal, desmielinación, inflamación, estallido patológico neuronal (ataques). También preferiblemente, los usos y métodos de la presente invención están dirigidos a prevenir o tratar la muerte o el daño de las células nerviosas independientemente de la causa.

Los términos “neuroprotección”, “neuroprotector/a”, o “efecto neuroprotector” se refieren a la capacidad de prevenir o reducir la muerte o daño a las células nerviosas, incluyendo neuronas y células gliales, o el rescate, reanimación o reactivación de células nerviosas, por ejemplo, después de afecciones patológicas o dañinas en el cerebro, sistema nervioso central o sistema nervioso periférico. Por tanto, este efecto neuroprotector comprende la capacidad conferida de las células neuronales de mantener o recuperar sus funciones neuronales. Estabiliza la

membrana celular de una célula neuronal o ayuda en la normalización de las funciones de las células neuronales. Evita la pérdida de viabilidad o funciones de las células neuronales. Comprende la inhibición del deterioro progresivo de las neuronas que conduce a la muerte celular. Se refiere también a cualquier protección detectable de las neuronas con respecto al estrés. La neuroprotección incluye la regeneración de células nerviosas, es decir el recrecimiento de una población de células nerviosas después de la enfermedad o el trauma.

Actualmente, la mayoría de las enfermedades neurológicas y psiquiátricas carecen de tratamientos específicos dirigidos a parar o mejorar la evolución de la enfermedad, los cuales se denominan “fármacos modificadores de la enfermedad”. Estos fármacos modificadores de la enfermedad contrastan con la terapia sintomática que se utiliza habitualmente para dichas enfermedades, pero no cambia la evolución de la enfermedad. Un fármaco neuroprotector es un Fármaco Modificador de la Enfermedad (DMD) para el tratamiento de las enfermedades cerebrales.

Por tanto, en una realización, la presente invención se refiere al uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas como principio activo en la fabricación de un medicamento para la regeneración de células nerviosas. En otras palabras, la presente invención se refiere a MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso para la regeneración de células nerviosas. De manera similar, la presente invención se refiere a un método de regeneración de células nerviosas que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas.

La neuroprotección se puede determinar directamente, por ejemplo, midiendo el retraso o la prevención de la muerte neuronal, tal como, por ejemplo, mediante la reducción en el número de neuronas apoptóticas en cultivos cerebrocorticales después de estrés. La neuroprotección también se puede determinar directamente, por ejemplo, midiendo la gravedad o extensión del daño en un tejido u órgano del sistema nervioso, o la pérdida funcional del mismo, después de dicho estrés, tal como, por ejemplo, midiendo la disminución en el tamaño de los infartos cerebrales después de la oclusión de la arterial cerebral media (MCAO) o la lesión por reperfusión. Además, la neuroprotección se puede identificar mediante la obtención de imágenes por resonancia magnética (medición del volumen del cerebro, tractografía, niveles de N-acetil-asparto por espectroscopía) o mediante la obtención de imágenes retinales con obtención de imágenes ópticas coherentes (adelgazamiento de la capa de fibras nerviosas retinales) o espectroscopía retinal (niveles de citocromo c, oxihemoglobina, lactato, glutamato, iNOS). Alternativamente, la neuroprotección se puede determinar indirectamente detectando la activación de uno o más mecanismos biológicos para la protección de neuronas, incluyendo,

sin limitación, la detección de la activación del mecanismo Keap1/Nrf2 o la inducción de una o más enzimas de la fase 2, incluyendo, pero sin limitación, la hemooxigenasa-1 (HO-1). Los métodos de detección y medición de la protección neuronal se proporcionan en los Ejemplos siguientes y existen otros métodos conocidos en la técnica.

Los diversos usos y métodos que utilizan MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de los mismos en la presente invención comprenden la administración aguda es decir, que tiene lugar desde varios minutos hasta aproximadamente varias horas desde la lesión, o la administración crónica, adecuada para trastornos neurológicos o psiquiátricos crónicos.

En una realización de la presente invención, en los diversos usos y métodos de neuroprotección o de prevención o tratamiento de la muerte o el daño de las células nerviosas, o la regeneración de células nerviosas, MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas se administran a un sujeto con una enfermedad neurológica o psiquiátrica.

Las enfermedades neurológicas son aquellos trastornos del sistema nervios central y el sistema nervioso periférico, que incluyen trastornos del cerebro, médula espinal, nervios craneales, nervios periféricos, raíces nerviosas, sistema nervioso autónomo, uniones neuromusculares y músculo.

Entre las enfermedades del sistema nervioso central y periférico se incluyen, sin limitación, como conocimiento en los avances de manifestaciones clínicas, Ausencia del Septum Pellucidum, Enfermedad de Lipasa ácida, Deficiencia de Maltasa Ácida, Afasia Epileptiforme Adquirida, Encefalomiелitis Diseminada Aguda, Pupila de Adie, Síndrome de Adie, Adrenoleucodistrofia, Agénesis del Corpus Callosum, Agnosia, Síndrome de Aicardi, Síndrome de Aicardi-Goutieres, SIDA – Complicaciones Neurológicas, Enfermedad de Alexander, Enfermedad de Alpers, Hemiplejía Alternante, Enfermedad de Alzheimer, Esclerosis lateral amiotrófica, Anencefalia, Aneurisma, Síndrome de Angelman, Angiomatosis, Anoxia, Síndrome Antifosfolípido, Afasia, Apraxia, Quistes aracnoideos, Aracnoiditis, Malformación de Arnold-Chiari, Malformación Arteriovenosa, Síndrome de Asperger, Ataxia, Ataxia Telangiectasia, Ataxias y Degeneración Cerebelosa o Espinocerebelosa, Fibrilación atrial y apoplejía, Trastorno de hiperactividad con déficit de atención (ADHD), Autismo, Disfunción Autonómica, Dolor de espalda, Síndrome de Barth, Enfermedad de Batten, Miotonía de Becker, Enfermedad de Behcet, Parálisis de Bell, Blefarospasmo Esencial Benigno, Amiotrofia focal benigna, Hipertensión Intracraneal Benigna, Síndrome de Bernhardt-Roth, Enfermedad de Binswanger, Blefarospasmo, Síndrome de Bloch-Sulzberger, Lesiones del Plexus Braquial durante el nacimiento Síndrome de

Bradbury-Eggleston, Tumores cerebrales y Espinales, Aneurisma cerebral, Infarto cerebral, Isquemia cerebral, Lesión cerebral, Síndrome de Brown-Sequard, Bulboatrofia muscular espinal, CADASIL, Enfermedad de Canavan, Síndrome del Túnel Carpiano, Causalgia, Cavernomas, Angioma Cavernoso, Malformación Cavernosa, Síndrome de Columna Cervical Central, Síndrome de Columna Central, Síndrome del dolor central, Mielinosis Central Pontina, Trastornos cefálicos, Deficiencia de Ceramidasa, Degeneración cerebelosa, Hipoplasia Cerebelosa, Aneurisma Cerebral, Arteriosclerosis Cerebral, Atrofia Cerebral, Beriberi Cerebral, Malformación Cavernosa Cerebral, Gigantismo Cerebral, Hipoxia Cerebral, Parálisis Cerebral, Síndrome Cerebro-Oculo-Facio-Esquelético, Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, Malformación de Chiari, Enfermedad del almacenamiento de éster de colesterol, Corea, Coreoacantocitosis, Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica (CIDP), Intolerancia Ortostática Crónica, Dolor crónico, Síndrome de Cockayne Tipo II, Síndrome de Coffin Lowry, COFS, Colpocefalia, Coma, Síndrome de dolor Regional Complejo, Diplejia Facial Congénita, Miastenia Congénita, Miopatía Congénita, Malformaciones Cavernosas Vasculares Congénitas, Degeneración corticobasal, Arteritis Craneal, Craniosinostosis, Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, Trastornos Traumáticos Acumulados, Síndrome de Cushing, Enfermedad por Cuerpos de Inclusión Citomegálicos, Infección por Citomegalovirus, Síndrome de los Ojos y Pies Danzantes, Síndrome de Dandy-Walker, Enfermedad de Dawson, Síndrome de Morsier, Estimulación Cerebral Profunda para la Enfermedad de Parkinson, Parálisis de Dejerine-Klumpke, Demencia, Demencia - Multi-Infarto, Demencia Semántica, Demencia - Subcortical, Demencia con cuerpos de Lewy, Ataxia Cerebelosa Dentada, Atrofia Dentatorubral, Dermatomiositis, Dispraxia del desarrollo, Síndrome de Devic, Neuropatía Diabética, Esclerosis Difusa, Síndrome de Dravet, Disautonomía, Disgrafía, Dislexia, Disfagia, Dispraxia, Disinergia Cerebelosa Mioclónica, Disinergia Cerebelosa Progresiva, Distonias, Encefalopatía Epiléptica Infantil Precoz, Síndrome de la silla Vacía, Encefalitis, Encefalitis Letárgica, Encefaloceles, Encefalopatía, Encefalopatía, familiar infantil, con calcificación intracraneal y linfocitosis crónica del fluido cerebroespinal; Encefalitis de Cree; Síndrome de Pseudo-Torch; Síndrome de Pseudotoxoplasmosis, Angiomatosis Encefalotrigeminal, Epilepsia, Hemiplejía epiléptica, Parálisis de Erb-Duchenne y Dejerine-Klumpke, Parálisis de Erb, Tremor Esencial, Mielinolisis Extrapontina, Enfermedad de Fabry, Síndrome de Fahr, Desmayo, Disautonomía Familiar, Hemangioma Familiar, Calcificación Idiopática Familiar de los Ganglios Basales, Parálisis Periódica Familiar, Parálisis Espástica Familiar, Enfermedad de Farber, Ataques febriles, Displasia Fibromuscular, Síndrome de Fisher, Síndrome Infantil de los Párpados Flexibles, Gota del pie, Ataxia de Friedreich, Demencia Frontotemporal, Gangliosidosis, Enfermedad de Gaucher, Síndrome de Gerstmann,

Enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, Neuropatía Axonal gigante, Arteritis de Células Gigantes, Enfermedad de Inclusión de Células gigantes, Leucodistrofia de Células globoides, Neuralgia Glossofaríngea, Enfermedad de almacenamiento de glicógeno, Síndrome de Guillain-Barré, Enfermedad de Hallervorden-Spatz, Lesión cerebral, Dolor de cabeza, Hemicrania Continua, Espasmo Hemifacial, Hemiplejía Alterans, Neuropatías hereditarias, Paraplejía Espástica Hereditaria, Heredopatía atáctica Polineuritiforme, Herpes Zoster, Herpes Zoster Oticus, Síndrome de Hirayama, Síndrome de Holmes-Adie, Holoprosencefalia, Mielopatía asociada a HTLV-1, Síndrome de Hughes, Enfermedad de Huntington, Hidranencefalia, Hidrocéfalo, Hidrocéfalo de presión normal, Hidromielia, Hiperkortisolismo, Hipersomnio, Hipertonía, Hipotonía, Hipoxia, Encefalomielitis mediada por el sistema inmune, Miositis por Cuerpos de Inclusión, Incontinencia Pigmenti, Hipotonía Infantil, Distrofia Neuroaxonal infantil, Enfermedad de Almacenamiento de Ácido Fitánico Infantil, Enfermedad de Refsum Infantil, Espasmos Infantiles, Miopatías Inflammatorias, Iniencefalia, Lipodistrofia Intestinal, Quistes Intracraneales, Hipertensión Intracraneal, Síndrome de Isaac, Síndrome de Joubert, Síndrome de Kearns-Sayre, Enfermedad de Kennedy, Síndrome de Kinsbourne, Síndrome de Kleine-Levin, Síndrome de Klippel-Feil, Síndrome de Klippel-Trenaunay (KTS), Síndrome de Klüver-Bucy, Síndrome Amnésico de Korsakoff, Enfermedad de Krabbe, Enfermedad de Kugelberg-Welander, Kuru, Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton, Síndrome de Landau-Kleffner, Compresión del Nervio Cutáneo Femoral Lateral, Síndrome Medular Lateral, Discapacidades de aprendizaje, Enfermedad de Leigh, Síndrome de Lennox-Gastaut, Síndrome de Lesch-Nyhan, Leucodistrofia, Síndrome de Levine-Critchley, Demencia con Cuerpos de Lewy, Enfermedades del Almacenamiento de Lípidos, Proteinosis Lipoide, Lisencefalia, Síndrome Locked-In, enfermedad de Lou Gehrig, Secuelas Neurológicas de Lupus, Complicaciones Neurológicas de Enfermedad de Lyme, Enfermedad de Machado-Joseph, Macroencefalia, Megaloencefalia, Síndrome de Melkersson-Rosenthal, Meningitis, Meningitis y Encefalitis, Enfermedad de Menkes, Meralgia Parestética, Leukodistrofia Metacromática, Microcefalia, Migraña, Síndrome de Miller Fisher, Deterioro Cognitivo Leve, Mini-Apoplejías, Miopatías Mitocondriales, Síndrome de Moebius, Amiotrofia Monomérica, Enfermedades de las Neuronas Motoras, Enfermedad de Moyamoya, Mucopolisacaridosis, Mucopolisacaridosis, Neuropatía Multifocal Motora, Demencia Multi-Infarto, Esclerosis Múltiple, Atrofia de Múltiples Sistemas, Atrofia de Múltiples Sistemas con Hipotensión Ortostática, Distrofia Muscular, Miastenia Congénita, Miastenia Gravis, Esclerosis Mielinoelástica Difusa, Encefalopatía Mioclónica de Bebés, Mioclonus, Miopatía, Miopatía Congénita, Miopatía Tirotóxica, Miotonia, Miotonia Congénita, Narcolepsia, Neuroacantocitosis, Neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro,

Neurofibromatosis, Síndrome Neuroléptico Maligno, Complicaciones Neurológicas del SIDA, Complicaciones Neurológicas de la Enfermedad de Lyme, Consecuencias Neurológicas de la Infección de Cytomegalovirus, Manifestaciones neurológicas de la Enfermedad de Pompe, Secuelas Neurológicas de Lupus, Neuromielitis óptica, Neuromiotonía, Lipofuscinosis Neuronal Ceroidea, Trastornos de Migración Neuronal, Neuropatía Hereditaria, Neurosarcoidosis, Neurotoxicidad, Nevus Cavernosus, Enfermedad de Niemann-Pick, Hidrocéfalo de Presión Normal, Neuralgia Occipital, Síndrome de Ohtahara, Atrofia Olivopontocerebelosa, Opsoclonus Mioclonus, Hipotensión Ortostática, Síndrome de O'Sullivan-McLeod, Síndrome por Uso Excesivo, Dolor crónico, Neurodegeneración asociada a Pantotenato Quinasa, Síndromes Paraneoplásicos, Parestesia, Enfermedad de Parkinson, Coreoatetosis Paroxismal, Hemicrania Paroxismal, Parry-Romberg, Enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, síndrome de Pena Shokeir II, Quistes Perineurales, Parálisis Periódicas, Neuropatía Periférica, Leucomalacia Periventricular, Estado Vegetativo Persistente, Trastorno Pervasivo del Desarrollo, Enfermedad del Almacenamiento de Ácido Fitánico, Enfermedad de Pick, Pinzamiento, Síndrome Piriforme, Tumores Pituitarios, Polimiositis, Enfermedad de Pompe, Porencefalia, Neuralgia Post-herpética, Encefalomiелitis Postinfecciosa, Síndrome Post-Polio, Hipotensión Postural, Síndrome de la Taquicardia Ortostática Postural, síndrome de Taquicardia Postural, Atrofia Primaria Dentatum, Esclerosis Primaria Lateral, Afasia Primaria Progresiva, Enfermedades por Priones, Atrofia Hemifacial Progresiva, Ataxia Locomotora Progresiva, Leucoencefalopatía multifocal Progresiva, Poliodistrofia Esclerosante Progresiva, Parálisis Supranuclear Progresiva, Prosopagnosia, Pseudotumor Cerebri, Síndrome de Ramsay Hunt I (inicialmente conocido así), Síndrome de Ramsay Hunt II (inicialmente conocido así), Encefalitis de Rasmussen, Síndrome de la Distrofia Simpático Refleja, enfermedad de Refsum, Enfermedad de Refsum Infantil, Trastornos por Movimientos Repetitivos, Lesiones por Estrés Repetitivo, Síndrome de Piernas Inquietas, Mielopatía asociada a Retrovirus, Síndrome de Rette, Síndrome de Reye, Encefalitis Reumática, Síndrome de Riley-Day, Quistes de la Raíz Nerviosa del Sacro, Baile de San Vito, Enfermedad de las glándulas salivares, Enfermedad de Sandhoff, Enfermedad de Schilder, Esquizoencefalia, Enfermedad de Seitelberger, Culebrilla, Síndrome de Shy-Drager, Síndrome de Sjögren, Apnea del sueño, Enfermedad del Sueño, Síndrome de Sotos, Espasticidad, Espina Bífida, Infarto de la Médula Espinal, Lesión de la médula espinal, Tumores de la Médula espinal, Atrofia muscular espinal, Atrofia Espinocerebelosa, Degeneración Espinocerebelosa, Síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, Síndrome de Stiff-Person, Degeneración Estriatonigral, Apoplejía, Síndrome de Sturge-Weber, Panencefalitis Esclerosante Subaguda, Encefalopatía Arteriosclerótica Subcortical, Dolor de cabeza SUNCT, Trastornos de la

Deglución, Corea de Sydenham, Síncopa, Esclerosis Espinal Sifilítica, Siringohidromielia, Siringomielia, Lupus Eritematoso Sistémico, Tabes Dorsal, Disquinesia Tardiva, Quistes de Tarlov, Enfermedad de Tay-Sachs, Arteritis Temporal, Síndrome de la Médula Espinal Anclada, Miotonía de Thomsen, Síndrome de la Salida Torácica, Miopatía Tirotóxica, Tic de Douloureux, Parálisis de Todd, Síndrome de Tourette, Ataque Isquémico transitorio, Encefalopatías Espongiformes Transmisibles, Mielitis transversa, Lesión cerebral traumática, Tremor, Neuralgia Trigeminal, Paraparesis Tropical Espástica, Síndrome de Troyer, Esclerosis Tuberosa, Tumor Vascular Eréctil, Síndromes de Vasculitis de los Sistemas Nerviosos Central y Periférico, Enfermedad de Von Economo, Enfermedad de Von Hippel-Lindau (VHL), Enfermedad de Von Recklinghausen, Síndrome de Wallenberg, Enfermedad de Werdnig-Hoffman, Síndrome de Wernicke-Korsakoff, Síndrome de West, latigazo vertical, Enfermedad de Whipple, Síndrome de Williams, Enfermedad de Wilson, Enfermedad de Wolman, Atrofia Muscular Espinal y Bulbar unida a X, síndrome de Zellweger, neuritis óptica, síndrome de la fatiga crónica, fibromialgia, enfermedades psiquiátricas tales como trastornos del humor, depresión mayor, síndrome bipolar, psicosis, esquizofrenia, síndrome obsesivo-compulsivo, etc., Enfermedades por el abuso de productos tóxicos o fármacos, tales como alcoholismo y abuso de fármacos, Encefalopatía tipo encefalopatía hepática.

Los trastornos psiquiátricos incluyen aquellos indicados por el Manual de Diagnóstico y Estadística de los Trastornos Mentales, Cuarta Edición (DSM-IV) publicada por la American Psychiatric Association, y cubre todos los trastornos de la salud mental para niños y adultos. En particular, los trastornos psiquiátricos incluyen un trastorno seleccionado entre Trastorno de Estrés Agudo; Trastorno de Adaptación No especificado; Trastorno de Adaptación con Ansiedad; Trastorno de Adaptación con Humor Depresivo; Trastorno de Adaptación con alteración de la conducta; Trastorno de Adaptación con Ansiedad Mixta y Humor Depresivo; Trastorno de Adaptación con Alteración Mixta de Emociones y Conducta; Agorafobia sin Historial de Trastorno del Pánico; Anorexia Nerviosa; Trastorno de Personalidad Antisocial; Trastorno de Ansiedad Debido a una afección médica; Trastorno de Ansiedad, NOS; Trastorno de Personalidad Evitante; Trastorno bipolar NOS; Trastorno Bipolar I, Episodio Depresivo más Reciente, En Remisión Total; Trastorno Bipolar I, Episodio Depresivo más Reciente, En Remisión Parcial; Trastorno Bipolar I, Episodio Depresivo más Reciente, Leve; Trastorno Bipolar I, Episodio Depresivo más Reciente, Moderado; Trastorno Bipolar I, Episodio Depresivo más Reciente, Severo Con Características Psicóticas; Trastorno Bipolar I, Episodio Depresivo más Reciente, Severo Sin Características Psicóticas; Trastorno Bipolar I, Episodio Depresivo más Reciente, No especificado; Trastorno Bipolar I, Episodio Maníaco más Reciente, En Remisión Total; Trastorno Bipolar I, Episodio Maníaco más Reciente, En

Remisión Parcial; Trastorno Bipolar I, Episodio Maníaco más Reciente, Leve; Trastorno Bipolar I, Episodio Maníaco más Reciente, Moderado; Trastorno Bipolar I, Episodio Maníaco más Reciente, Severo Con Características Psicóticas; Trastorno Bipolar I, Episodio Maníaco más Reciente, Severo Sin Características Psicóticas; Trastorno Bipolar I, Episodio Maníaco más Reciente, No especificado; Trastorno Bipolar I, Episodio Mixto más Reciente, En Remisión Total; Trastorno Bipolar I, Episodio Mixto más Reciente, En Remisión Parcial; Trastorno Bipolar I, Episodio Mixto más Reciente, Leve; Trastorno Bipolar I, Episodio Mixto más Reciente, Moderado; Trastorno Bipolar I, Episodio Mixto más Reciente, Severo Con Características Psicóticas; Trastorno Bipolar I, Episodio Mixto más Reciente, Severo Sin Características Psicóticas; Trastorno Bipolar I, Episodio Mixto más Reciente, No especificado; Trastorno Bipolar I, Episodio más Reciente No especificado; Trastorno Bipolar I, Episodio más Reciente Hipomaniaco; Trastorno Bipolar I, Único Episodio Maniaco, En Remisión Total; Trastorno Bipolar I, Único Episodio Maniaco, En Remisión Parcial; Trastorno Bipolar I, Único Episodio Maniaco, Leve; Trastorno Bipolar I, Único Episodio Maniaco, Moderado; Trastorno Bipolar I, Único Episodio Maniaco, Severo Con Características Psicóticas; Trastorno Bipolar I, Único Episodio Maniaco, Severo Sin Características Psicóticas; Trastorno Bipolar I, Único Episodio Maniaco, No especificado; Trastorno Bipolar II; Trastorno Dismórfico Corporal; Trastorno Límite de la Personalidad; Trastorno del sueño relacionado con la respiración; Trastorno Psicótico Breve; Bulimia Nerviosa; Trastorno del sueño del Ritmo Circadiano; Trastorno de Conversión; Trastorno Ciclotímico; Trastorno delirante; Trastorno de la personalidad Dependiente; Trastorno de Despersonalización; Trastorno Depresivo NOS; Amnesia Disociativa; Trastorno Disociativo NOS; Fuga Disociativa; Trastorno de la Identidad Disociativo; Dispareunia; Disomnio NOS; Disomnio relacionado con (otro trastorno); Trastorno Distímico; Trastorno alimentario NOS; Exhibicionismo; Dispareunia femenina Debido a una afección médica; Trastorno del Deseo Sexual Hipoactivo Femenino Trastorno debido a una afección médica; Trastorno orgásmico Femenino; Trastorno de la Excitación sexual femenina; Fetichismo; Frotteurismo; Trastorno en la Identidad de Género en Adolescentes o Adultos; Trastorno en la Identidad de Género en Niños; Trastorno en la Identidad de Género NOS; Trastorno de la Ansiedad Generalizado; Trastorno Histriónico de la Personalidad; Trastorno del Deseo Sexual Hipoactivo; Hipocondriasis; Trastorno del control de los impulsos NOS; Insomnio Relacionado con (otro trastorno); Trastorno Explosivo Intermitente; Cleptomanía; Trastorno Depresivo Mayor, Recurrente, en Remisión total; Trastorno Depresivo Mayor, Recurrente, en Remisión parcial; Trastorno Depresivo Mayor, Recurrente, Leve; Trastorno Depresivo Mayor, Recurrente, Moderado; Trastorno Depresivo Mayor, Recurrente, Severo con Características Psicóticas; Trastorno Depresivo Mayor,

Recurrente, Severo sin Características Psicóticas; Trastorno Depresivo Mayor, Recurrente, No especificado; Trastorno Depresivo Mayor, Episodio Único, en Remisión total; Trastorno Depresivo Mayor, Episodio Único, en Remisión parcial; Trastorno Depresivo Mayor, Episodio Único, Leve; Trastorno Depresivo Mayor, Episodio Único, Moderado; Trastorno Depresivo Mayor, Episodio Único, Severo con Características Psicóticas; Trastorno Depresivo Mayor, Episodio Único, Severo sin Características Psicóticas; Trastorno Depresivo Mayor, Episodio Único, No Especificado; Dispareunia Masculina Debido a una afección médica; Trastorno Eréctil Masculino; Trastorno Eréctil Masculino Debido a una afección médica; Trastorno del Deseo Sexual Hipoactivo Masculino Debido a una afección médica; Trastorno Orgásmico Masculino; Trastorno del humor Debido a una afección médica; Trastorno de la Personalidad Narcisista; Narcolepsia; Trastorno de la Pesadilla; Trastorno Obsesivo Compulsivo; Trastorno de la personalidad Obsesivo-Compulsivo; Otras Disfunciones Sexuales Femeninas Debido a una afección médica; Otra Disfunción Sexual Masculina Debido a una afección médica; Trastorno del dolor Asociado con tanto factores Psicológicos como Afecciones Médicas; Trastorno del dolor asociado con Características Psicológicas; Trastorno del Pánico con Agorafobia; Trastorno del Pánico sin Agorafobia; Trastorno paranoide de la Personalidad; Parafilia, NOS; Parasomnio NOS; Juego patológico; Pedofilia; Trastorno de la personalidad NOS; Trastorno por estrés Posttraumático; Eyaculación precoz; Hipersomnio Primario; Insomnio Primario; Trastorno Psicótico Debido a una afección médica, with Delirios; Trastorno Psicótico Debido a una afección médica, with Alucinationes; Trastorno Psicótico, NOS; Piromanía; Trastorno Esquizoafectivo; Trastorno de la Personalidad Esquizoide; Esquizofrenia, Tipo Catatónica; Esquizofrenia, Tipo Desorganizada; Esquizofrenia, Tipo Paranoide; Esquizofrenia, tipo Residual; Esquizofrenia, Tipo no deiferenciada; Trastorno Esquizofreniforme; Trastorno de la Personalidad Esquizotipal; Trastorno de la Aversión Sexual; Trastorno Sexual NOS; Disfunción sexual NOS; masoquismo sexual; Sadismo sexual; Trastorno Psicótico Compartido; Trastorno del sueño Debido a una afección médica, Tipo Hipersomnia; Trastorno del sueño Debido a una afección médica, Tipo Insomnio; Trastorno del sueño Debido a una afección médica, Tipo mixto; Trastorno del sueño Debido a una afección médica, Tipo Parasomnia; Trastorno de de Terror en el Sueño; Trastorno del Sonambulismo; Fobia social; Trastorno de Somatización; Trastorno Somatoforme NOS; Fobia específica; Fetichismo Transvéstico; Tricotilomanía; Trastorno Somatoforme No diferenciado; Vaginismo; y Voyerismo.

Preferiblemente, en los usos y métodos de prevención o tratamiento de la muerte o el daño a las células nerviosas o la ejecución de la neuroprotección o la regeneración de células nerviosas mediante la administración de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o

profármacos de los mismos, el sujeto padece una enfermedad neurológica (seleccionada entre esclerosis múltiple, esclerosis múltiple progresiva, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, neuromielitis óptica, neuroinflamación, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), Ataxia de Friedreich, Enfermedad de Huntington, Demencia con cuerpos de Lewy, atrofia muscular espinal, isquemia cerebral, isquemia cerebral global, isquemia del nervio óptico, neuritis óptica, tumor cerebral, traumatismo craneal y epilepsia, encefalopatía, encefalitis, meningitis, dolor crónico, migraña, dolor de cabeza, fátiga crónica y fibromialgia) o una enfermedad psiquiátrica (seleccionada entre depresión, trastorno bipolar, esquizofrenia, enfermedad obsesivo compulsiva, abuso del alcohol, abuso de fármacos).

La MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas se pueden utilizar como una primera línea o terapia inicial para prevenir o tratar la muerte o el daño de células nerviosas. Alternativamente, la MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas se pueden utilizar como adyuvante o como una terapia de adición a otros fármacos en un sujeto que ya está siendo tratado para una enfermedad neurológica o psiquiátrica concreta, por ejemplo, como una adición a un tratamiento existente contra la epilepsia en pacientes que presentan ataques parciales (convulsiones epilépticas que empiezan en una parte específica del cerebro). Se puede utilizar en pacientes con y sin generalización secundaria (donde el ataque se extiende posteriormente a todo el cerebro). También se puede utilizar en pacientes tratados para la isquemia cerebral, la esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, Ataxia de Friedreich, Enfermedad de Huntington, Demencia con cuerpos de Lewy, o atrofia muscular espinal.

Por tanto, en otra realización de la presente invención, en los usos y métodos de neuroprotección o de prevención o tratamiento de la muerte o el daño de las células nerviosas o regeneración de células nerviosas, la MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas se usan como adyuvantes o terapia adicional a un sujeto con una enfermedad neurológica o psiquiátrica.

En una realización de la presente invención, en los diversos usos y métodos de neuroprotección o de prevención o tratamiento de la muerte o el daño de las células nerviosas o regeneración de células nerviosas, la MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de los mismos se administran a un sujeto sano, preferiblemente un sujeto sano mayor de 18 años, más preferiblemente un sujeto sano mayor de 45 años, incluso más preferiblemente un sujeto sano mayor de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, ó 100 años.

El término "sujeto sano" pretende comprender su significado común, así como a los sujetos que pueden padecer una o más afecciones patológicas diferentes de una enfermedad

nerológica o psiquiátrica.

En una realización adicional, en los diversos usos y métodos de neuroprotección o de prevención o tratamiento de la muerte o el daño de las células nerviosas o regeneración de células nerviosas, la MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de los mismos se utilizan como adyuvantes o terapia adicional para un sujeto en tratamiento con uno o más fármacos neuropotenciadores.

Los fármacos neuropotenciadores incluyen aquellos que mejoran el aprendizaje y la memoria, la atención, el humor, las habilidades comunicativas y el rendimiento sexual. Ejemplos de fármacos neuropotenciadores son aquellos que dirigen la potenciación sináptica a largo plazo (LTP) o la depresión a largo plazo (LTD), la modulación de los canales de calcio, o la proteína de unión al elemento de respuesta AMPc (CREB). AMPc es el acrónimo para adenosín monofosfato cíclico. Ejemplos particulares de fármacos neuropotenciadores son inhibidores de fosfodiesterasa, tales como rolipram; donepezil; agonistas del receptor NMDA para glutamato, tales como D-cicloserina; ampaquinas; modafinil; metilfenidato.

Las propiedades neuroprotectoras de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas presentan como consecuencia la prevención o el tratamiento parcial o total de los distintos trastornos en las funciones del sistema nervioso provocadas por la muerte o el daño de las células neuronales. Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas como principio activo en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica. En otras palabras, la presente invención también se refiere a MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica. De manera similar, la presente invención también se refiere a un método de prevención o tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas. La enfermedad neurológica o psiquiátrica puede ser cualquiera de las indicadas anteriormente. Preferiblemente, la enfermedad neurológica o psiquiátrica se selecciona entre isquemia del nervio óptico, esclerosis múltiple progresiva, neuromielitis óptica, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, Ataxia de Friedreich, Enfermedad de Huntington, Demencia con cuerpos de Lewy, atrofia muscular espinal, epilepsia, neuritis óptica, traumatismo craneal, tumor cerebral, depresión, trastorno bipolar, esquizofrenia, enfermedad obsesivo compulsiva, abuso del alcohol, abuso de fármacos, encefalopatía, encefalitis, meningitis, fatiga crónica, fibromialgia, dolor crónico, migraña, y dolor de cabeza.

La MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas se pueden formular de varias formas farmacéuticas para los objetivos de administración. Como composiciones apropiadas se pueden citar todas las composiciones utilizadas habitualmente para la administración sistemática de fármacos, por ejemplo, cualquier composición sólida (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, gránulos, etc.) o composición líquida (por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). Para preparar las composiciones farmacéuticas de MTA, una cantidad eficaz de MTA, opcionalmente en forma de sal o un profármaco, como principio activo, se combinan en una mezcla íntima con un portador farmacéuticamente aceptable, el cual puede tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de la preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas son deseables en forma de dosis unitarias adecuadas, particularmente, para la administración oral, rectal, percutánea, intratecal, intravenosa o mediante inyección parenteral. Por ejemplo, al preparar las composiciones en forma de dosificación oral, se puede utilizar cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales, tales como suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones y soluciones; o portadores sólidos, tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de polvos, pastillas, cápsulas y comprimidos. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas unitarias de dosificación oral más ventajosas, en cuyo caso obviamente se utilizan portadores farmacéuticos sólidos. Para composiciones parenterales, el portador comprende habitualmente agua estéril, por lo menos en gran parte, aunque se pueden incluir otros ingredientes, por ejemplo, para ayudar en la solubilidad. Las soluciones inyectables se pueden preparar, por ejemplo, donde el portador comprende solución salina, solución de glucosa o una mezcla de solución salina y solución de glucosa. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden utilizar portadores líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. También se incluyen preparaciones en forma sólida, que pretenden convertirse, poco antes de su uso, en preparaciones en forma líquida. En las composiciones adecuadas para la administración percutánea, el portador comprende opcionalmente un agente potenciador de la penetración o un agente humectante adecuado, o ambos, opcionalmente combinados con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones menores, cuyos aditivos no introducen un efecto perjudicial significativo en la piel. Una revisión de las diferentes formas farmacéuticas para la administración de fármacos y su preparación se puede encontrar en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí y Trillo, 10th Edition, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas antes mencionadas en

forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria tal como se utiliza en la presente invención se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el portador farmacéutico requerido. Ejemplos de dichas formas de dosificación unitaria son los comprimidos (incluyendo comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, pastillas, supositorios, paquetes en polvo, obleas, soluciones o suspensiones inyectables y similares, y múltiples de los mismos de forma segregada.

Las composiciones según la presente invención, incluyendo las formas de dosificación unitaria, pueden contener el principio activo en una cantidad que se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,1% a 70%, o aproximadamente 0,5% a 50%, o aproximadamente 1% a 25%, o aproximadamente 5% a 20%, comprendiendo el resto el portador, donde los porcentajes anteriores son en p/p frente al peso total de la composición o la forma de dosificación.

La dosis de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas a administrar depende del caso individual y, como es habitual, debe adaptarse a las condiciones del caso individual para un efecto óptimo. Por lo tanto, depende, naturalmente, de la frecuencia de administración y de la potencia y la duración de la acción del compuesto utilizado en cada caso para terapia o profilaxis, pero también de la naturaleza y gravedad de la enfermedad y los síntomas, y del sexo, edad, peso, co-medicación y sensibilidad individual del sujeto a tratar y de si la terapia es aguda o profiláctica. Las dosis se pueden adaptar en función del peso y para aplicaciones pediátricas. Las dosis diarias se pueden administrar q.d. o en cantidades múltiples, tales como b.i.d., t.i.d. o q.i.d.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la presente invención y no limitarse a los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto de MTA en un modelo de isquemia en cultivo neuronal

Resumen

Se exploró el potencial neuroprotector de MTA en un modelo neuronal de isquemia en el que se co-cultivaron astrocitos y neuronas.

Cultivos: se utilizaron astrocitos y neuronas del córtex cerebral de ratas. Las células se privaron de oxígeno y glucosa y se midieron los efectos protectores de MTA.

Introducción

Co-cultivos neurona-astrocito

Se obtuvieron cultivos primarios de neuronas de los lóbulos corticales de embriones de rata Sprague-Dawley E18 según los procedimientos descritos previamente (Cheung et al., 1998,

Neuropharmacology 37:1419-1429). Las células se resuspendieron en medio Neurobasal B27 más FBS al 10% y, a continuación, se sembraron en placas de 24 pocillos a razón de $1-2 \times 10^5$ células por pocillo sobre una monocapa de astrocitos que se prepararon previamente tal como se ha descrito anteriormente (Vallejo-Illarramendi et al., 2005, *Glia* 50:276-279). Un día después, el medio se sustituyó por medio Neurobasal complementado con B27 y suero bovino fetal al 10%, y se mantuvo a 37°C y CO₂ al 5%. Los cultivos se utilizaron 8-9 días después de la siembra. Las neuronas y astrocitos cultivados se identificaron utilizando anticuerpos para proteína 2 asociada a microtúbulos y proteína gliofibrilar ácida, respectivamente.

Toxicidad celular y ensayos de viabilidad

La muerte celular y la viabilidad celular en co-cultivos de neurona-astrocito se ensayaron después de 24 horas de exposición a MTA (10 µM a 1 mM) utilizando ensayos de lactato deshidrogenasa y calceína-AM respectivamente seguido de mediciones de fluorimetría (Synergy-HT). Los resultados se expresan como el porcentaje de células viables o la liberación de LDH frente a los controles, como la media ± SEM de por lo menos cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

Privación de oxígeno-glucosa

Se indujo daño isquémico mediante la incubación de cultivos celulares en una cámara hiperbárica durante 1 hora en tampón saturado de nitrógeno que contenía NaCl 130 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 0,1323 mM, NaHCO₃ 0,26 mM, MgCl₂ 0,8 mM, NaH₂PO₄ 1,18 mM, 10 mM sacarosa como sustituto de la glucosa, y el bloqueador glicolítico yodoacetato (20 ó 50 µM). Después de la lesión, se incubaron las células en normoxia, se añadió glucosa y se extrajo el yodoacetato durante un periodo adicional de 24 horas. La MTA o el antagonista del receptor de NMDA APV (50 µM) se añadieron durante la isquemia para evaluar su actividad neuroprotectora. Se analizó la viabilidad celular y la muerte celular de los cultivos tal como se ha indicado anteriormente. Los resultados se expresan como la media ± SEM de por lo menos cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

Tratamiento

La muerte celular y la viabilidad celular en co-cultivos de neurona-astrocito se ensayaron después de 24 horas de exposición a MTA (10 µM a 1 mM) utilizando ensayos de lactato deshidrogenasa y calceína-AM respectivamente seguido de mediciones de fluorimetría (Synergy-HT).

Material y métodos

Componentes de prueba

5'-desoxi-5'-metiltioadenosina (MTA)

Animales

Especie	Ratas Sprague-Dawley
Sexo	Hembra
Edad	Adultas preñadas 8-16 semanas para la reproducción
Rango de peso corporal	Se utilizaron embriones E18 y animales recién nacidos
Suministrador	Harlan
Método de identificación	Cultivos marcados con tinta permanente
Aclimatación	7 días después de la llegada a la instalación para animales
Condiciones del hábitat	1 rata hembra en jaulas ventiladas
Dieta	Chow de laboratorio (Harlan)
Agua	Agua corriente
Cama	Maderas taladas
Dosis	Vehículo 10 μ M-1 mM MTA
Volumen o volúmenes de administración	Diluido por lo menos 1 a 100
Tiempo de inyección	No disponible
Ruta y frecuencia de administración sistémica	Añadido al cultivo
Duración del tratamiento	24 horas
Elección de la dosis y rutas de administración	Las dosis se seleccionaron en base a experimentos anteriores previos
Número/grupo	5-10 animales/grupo
Número de grupos	3-5 cultivos por grupos experimental
Identificación individual de animales	No disponible

Dosis y Grupos

Se probaron dos grupos de cultivos por modelo de enfermedad, consistiendo cada uno en 8-14 ratas.

Grupos:

1. Vehículo
2. Tratado: 10 μ M a 1 mM

Procedimientos experimentales

1. Producción de MTA: MTA fue suministrada por ENANTIA S.L. (Barcelona, España).
2. Análisis de los datos: El análisis estadístico se realizó utilizando el test t-Student, dos colas.

Resultados

La adición de MTA (10 μ M-1 mM) durante 24 horas a cultivos de neuronas mostró que la toxicidad de este compuesto es muy baja (figura 1), tal como se demuestra utilizando ensayos para la viabilidad celular (fluorescencia de calceína en células viables; izquierda) o muerte celular (liberación de LDH en células muertas; derecha). A su vez, los astrocitos eran resistentes y viables a MTA en las condiciones ensayadas.

Después de saber que MTA era inocua en las condiciones empleadas, se exploró su potencial neuroprotector en isquemia simulada. De este modo, la isquemia se mimetizó mediante la eliminación de oxígeno y glucosa (OGD) del medio de cultivo y la adición de yodoacetato (un bloqueo glicolítico; IAA). El daño inducido por isquemia fue reducido por MTA en cultivos mixtos de neuronas y astrocitos obtenidos del córtex cerebral (figura 2). Se ensayaron dos condiciones de isquemia utilizando IAA a 20 ó 50 μ M (izquierda y derecha, respectivamente). En ambas condiciones, la MTA era muy protectora. Para la comparación, también se ensayó APV, un antagonista del receptor de NMDA. La MTA a 10 μ M era incluso más protectora que APV (50 μ M).

Conclusión

MTA protege de la isquemia simulada en cultivos mixtos de neuronas y astrocitos obtenidos del córtex cerebral.

Ejemplo 2: Efecto de MTA en un modelo de rata de isquemia global

Resumen

Debido a los resultados obtenidos en un modelo celular de isquemia con MTA, se consideró el estudio de sus efectos en modelos animales de isquemia. Éstos incluían un modelo de isquemia focal mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) y otra de la isquemia global (modelo de oclusión de cuatro vasos).

Animales: Se utilizaron ratas Wistar macho jóvenes (200-250 g). Después de la isquemia, los animales se trataron con MTA tal como se describe a continuación.

Introducción

Cirugía e isquemia

Antes de los procedimientos quirúrgicos, los animales estuvieron en ayunas toda la noche. Las ratas se sometieron a la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) durante 90 minutos utilizando el modelo de filamento intraluminal tal como se ha descrito previamente (Rickhag et al, 2006; J Neurochem 96:14-29). Se monitorizó el flujo de sangre de manera transcraneal con un láser doppler (Perimed). Todos los parámetros fisiológicos de los animales incluidos en el estudio se encontraban en los límites normales e incluían animales que mostraban déficits habituales en el comportamiento inducidos por una isquemia, asimetría

rotacional y colocación de un miembro disfuncional. La temperatura rectal y corporal se mantuvo a 37°C durante la cirugía y la isquemia con una almohadilla de calor. Se indujo isquemia cerebral transitoria mediante la oclusión de las arterias vertebrales y carótidas comunes durante 10 minutos según el método descrito por Pulsinelli y Brierley (1979; Stroke 10, 267–272.). Los criterios para la isquemia del lóbulo frontal fueron la pérdida bilateral de reflejo de enderezamiento, extensión de la pata y midriasis. La temperatura rectal y corporal se mantuvo a 37°C durante la cirugía y la isquemia con una almohadilla de calor. Los animales que no perdieron completamente sus reflejos de enderezamiento o que desarrollaron ataques después de la oclusión de la arteria carótida se excluyeron del estudio.

Tratamiento

Los animales se trataron con MTA (30 ó 100 mg/kg i.p.), dos veces diarias reconstituida en Tris 300 mM, o placebo (Tris 300 mM) empezando a los 30 min desde el inicio de la isquemia.

Material y métodos

Componentes de prueba

5'-desoxi-5'-metiltioadenosina (MTA)

Animales

Especie	Ratas Wistar
Sexo	Macho
Edad	8-10 semanas
Rango de peso corporal	200-250 g
Suministrador	Harlan
Método de identificación	Marcaje de la cola con tinta permanente
Aclimatación	7 días después de la llegada a la instalación para animales
Condiciones del hábitat	2-3 ratas en jaulas ventiladas
Dieta	Chow de laboratorio (Harlan)
Agua	Agua corriente
Cama	Maderas taladas
Dosis	Vehículo 30-100 mg/kg MTA * i.p Tris 300mM
Volumen o volúmenes de administración	0,5-2 ml/inyección
Tiempo de inyección	< 5 s
Ruta y frecuencia de la administración sistémica	Intraperitonealmente (i.p) con una jeringa de 1 ml dos veces cada 24 horas

Duración del tratamiento	3-7 días
Elección de la dosis y rutas de administración	Las dosis se seleccionaron en base a experimentos previos
Número/grupo	8-14 ratas
Número de grupos	2 por cada modelo
Identificación individual de animales	Ratas enumeradas

Dosis y grupos

Se probaron dos grupos de animales por modelo de enfermedad, consistiendo cada uno en 8-14 ratas.

Grupos:

1. Vehículo: Tris 300mM i.p
2. Tratado: MTA i.p.

Procedimientos experimentales

1. Producción de MTA: MTA fue suministrada por ENANTIA S.L. (Barcelona, España).
2. Análisis de datos: El análisis estadístico se realizó utilizando Test t-Student, dos colas.

Resultados

Isquemia focal

A la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO; 90 min) le siguió la reperfusion durante 3 días y el tratamiento con MTA (i.p. dos veces diarias a 30 ó 100 mg/kg) empezando después de 30 min desde el inicio de la isquemia. Las ratas que se trataron con MTA (30 mg/kg) no mostraron una reducción en el área dañada en comparación con las tratadas con vehículo, tal como se valora con tinción TTC (Figura 3). A su vez, dosis más elevadas de MTA (100 mg/kg, dos veces diarias) eran tóxicas para las ratas después de la isquemia y no se pudieron evaluar de manera exhaustiva.

Isquemia global

A la oclusión de las arterias vertebral y carótida común (modelo de oclusión de 4 vasos) durante 10 minutos le siguió la reperfusion durante 7 días y tratamiento con MTA (i.p. dos veces diarias a 30 mg/kg, empezando 20 minutos después de la recirculación (o 30 minutos después del inicio de la isquemia). Las ratas tratadas con MTA mostraron niveles inferiores de células moribundas (aproximadamente el 50%; $P < 0,01$) en la región CA1 de la formación hipocampal en comparación con los animales tratados con vehículo (figura 4), tal como se valora con tinción Fluoro-jade.

Conclusión

La MTA protege las neuronas hipocampales CA1 de la muerte celular después de 10 min de isquemia global.

Ejemplo 3: Efecto de MTA en la excitotoxicidad de oligodendrocitos e isquemia del nervio óptico

Resumen

Se exploró el potencial neuroprotector de MTA en un modelo de oligodendrocito de excitotoxicidad y un modelo de isquemia en sustancia blanca

Cultivos: Los oligodendrocitos se cultivaron a partir de nervios ópticos de ratas perinatales. Las células se expusieron a excitotoxinas y se midieron los efectos protectores de MTA.

Nervios ópticos: Se aislaron los nervios ópticos completos de ratas jóvenes y se sometieron a isquemia experimental.

Métodos

Cultivos de oligodendrocitos

Los cultivos primarios de oligodendrocitos derivados de nervios ópticos de ratas Sprague Dawley de 12 días de vida se obtuvieron tal como se ha descrito previamente (Barres et al., 1992). Las células se sembraron en placas de 24 pocillos que transportaban cubreobjetos de 12 mm de diámetro recubiertos con poli-D-lisina (10 µg/ml) a una densidad de 5×10^3 células por pocillo. Las células se mantuvieron a 37°C y CO₂ al 5% en un medio químicamente definido (Barres et al., 1992, Cell 70:31–46). Después de 2–4 días in vitro, los cultivos estaban compuestos de por lo menos un 98% de células O4/galactocerebrósido-positivo (O4/GalC); la mayoría de las células restantes se tiñeron con anticuerpos para proteína gliofibrilar ácida (GFAP). No se detectaron células A2B5+ o microgliales en estos cultivos (Alberdi et al., 2002, Neurobiol Dis 9:234–243).

Ensayos de viabilidad celular y toxicidad

Los ensayos de toxicidad celular y viabilidad se realizaron tal como se ha descrito previamente (Sánchez-Gómez and Matute, 1999, Neurobiol Dis 6:475–485). Para evaluar la toxicidad de MTA, las células de 2-4 días en el cultivo se expusieron durante 24 horas al fármaco y se evaluó la viabilidad celular utilizando calceína-AM (Invitrogen). Para los ensayos de protección, las células se preincubaron con MTA durante 15 minutos y, a continuación, se expusieron a AMPA durante un periodo adicional de 15 minutos. Veinticuatro horas después de la aplicación del fármaco, se evaluó la viabilidad celular utilizando calceína-AM (Invitrogen). Se contó el número total de células supervivientes en cada cubreobjetos que emitían fluorescencia de la calceína, y los resultados se expresaron como el porcentaje de muerte celular frente al control. Los resultados se expresaron como la media ± SEM de por lo menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Isquemia en nervios ópticos aislados

Los nervios ópticos adultos aislado de ratas Sprague Dawley se perfundieron con CSF artificial

saturado en oxígeno (aCSF) (en mM: 126 NaCl, 3 KCl, 2 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, y 2 CaCl₂ 2H₂O, 10 glucosa). El daño isquémico se indujo mediante la sustitución de glucosa por sacarosa y la adición de 1 mM del bloqueador glucolítico yodoacetato (1 mM) durante 1 hora seguido de 2 horas de reperfusión en aCSF saturado en nitrógeno. Los nervios ópticos durante la isquemia y la reperfusión se incubaron con vehículo, para controles, y con MTA o antagonistas del receptor de glutamato, y posteriormente se procesaron para un ensayo de la liberación de LDH. Los resultados son la media \pm SEM de por lo menos tres experimentos diferentes realizados por duplicado.

Tratamiento

La viabilidad celular en cultivos de oligodendrocitos se ensayó durante 24 h de exposición a MTA (1 μ M a 3 mM) con ensayos de calceína-AM respectivamente seguido de mediciones de fluorimetría (Synergy-HT). La protección de los oligodendrocitos con respecto a la excitotoxicidad y el daño en los nervios ópticos después de isquemia (1 hora + 2 horas de reperfusión) se examinó utilizando ensayos de liberación de lactato deshidrogenasa en presencia o ausencia de MTA (100-300 μ M durante 3 horas).

Componentes de prueba

5'-desoxi-5'-metiltioadenosina (MTA)

Animales

Especie	Ratas Sprague-Dawley
Sexo	Macho/Hembra
Edad	Crías de 12 días de vida para el cultivo; ratas de 8-10 semanas de vida para los nervios ópticos
Rango de peso corporal	No disponible
Suministrador	Harlan
Método de identificación	Cultivos marcados con tinta permanente
Aclimatación	7 días después de la llegada a la instalación para animales
Condiciones del hábitat	1 rata hembra y sus crías en jaulas ventiladas
Dieta	Chow de laboratorio (Harlan)
Agua	Agua corriente
Cama	Madera talada
Dosis	Vehículo 1 μ M-3 mM MTA
Volumen o volúmenes de administración	Diluido por lo menos 1 a 100
Tiempo de inyección	No disponible

Ruta y frecuencia de la administración sistémica	Añadido a cultivos celulares o nervios ópticos
Duración del tratamiento	24 h para cultivos celulares, 3 h para nervios ópticos
Elección de la dosis y rutas de administración	Las dosis se seleccionaron en base a experimentos previos
Número/grupo	5-10 animales/grupo para cultivos, 2-3 animales/grupo para nervios ópticos
Número de grupos	3-5 cultivos para el grupo experimental, 6 nervios ópticos por grupo experimental
Identificación individual de animales	No disponible

Dosis y grupos

Dos grupos de cultivos o nervios ópticos.

Grupos:

1. Vehículo
2. Oligodendrocitos tratados: 1 μ M a 3 mM

Nervios ópticos tratados: 100-300 μ M

Procedimientos experimentales

1. Producción de MTA: MTA fue suministrada por ENANTIA S.L. (Barcelona, España).
2. Análisis de datos: El análisis estadístico se realizó utilizando Test t-Student, dos colas.

Resultados

En primer lugar se evaluó el perfil de toxicidad de MTA (1 μ M-3 mM) en cultivos de oligodendrocitos expuestos al compuesto durante 24 horas, evaluado con fluorescencia de calceína-AM. Los resultados indicaron que se observaba una toxicidad significativa a concentraciones de MTA por encima de (Figura 5A). A continuación, se examinó la potencia protección de MTA de lesiones excitotóxicas a oligodendrocitos inducidas mediante la activación selectiva de receptores de glutamato ionotrópicos del tipo AMPA bajo condiciones experimentales en las que la MTA no era tóxica para las células (100-300 μ M). A concentraciones de agonista que inducen apoptosis o necrosis (10 μ M de AMPA), la MTA ejerció una actividad protectora robusta (Figura 5B). En cambio, no se observó protección bajo condiciones que provocaban la muerte necrótica de oligodendrocitos (AMPA a 100 μ M; Figura 5B).

Después de saber que la MTA era inocua y protectora a las condiciones utilizadas, se exploró su capacidad de disminuir el daño en el tejido de sustancia blanca en nervios ópticos aislados después de una isquemia simulada. De este modo, la isquemia se mimetizó mediante la

eliminación de oxígeno y glucosa (OGD) del medio de cultivo y la adición de yodoacetato (un bloqueo glicolítico; IAA). El daño inducido por isquemia fue reducido por antagonistas del receptor de glutamato de los tipos AMPA y NMDA utilizando CNQX y APV, respectivamente, solos o juntos (figura 6, parte superior). Además, la MTA también era protectora de manera similar (figura 6, parte inferior)

Conclusión

La MTA protege los oligodendrocitos de la excitotoxicidad y el daño en el tejido de los nervios ópticos después de isquemia experimental.

Ejemplo 4: Efecto de MTA en la muerte neuronal excitóxica

Resumen

Las acciones neuroprotectoras de la MTA se han ensayado en un modelo de excitotoxicidad (exposición a NMDA). La MTA no muestra ninguna neuroprotección contra una lesión neurotóxica en un cultivo neuronal puro. Sin embargo, en un cultivo mixto glial-neuronal se observó una acción protectora indicada por el bloqueo de la activación de caspasa 3. Esto sugiere que las células gliales podrían ser necesarias en la acción neuroprotectora de MTA en neuroexcitotoxicidad.

Introducción

El posible efecto neuroprotector de MTA se ha estudiado utilizando un modelo de exposición parecido a la excitotoxicidad al agonista del receptor de NMDA glutamato NMDA. La neurotoxicidad de nNMDA se estudió en dos modelos: 1) cultivo neuronal cortical de rata puro y 2) cultivo neuronal glial-cortical mixto (Nicoletti et al., 1999, *Neuropharmacology*, 38:1477-1484).

Material y métodos

Componentes de prueba

5'-desoxi-5'-metiltioadenosina (MTA)

Animales

Especie	Ratas Sprague-Dawley
Sexo	Embriones E17
Edad	E17
Rango de peso corporal	No disponible
Suministrador	Harlan
Método de identificación	NO DISPONIBLE
Aclimatación	7 días después de la llegada a la instalación para animales
Condiciones del hábitat	Una madre preñada en jaulas ventiladas (57*35*19cm)
Dieta	Chow de laboratorio (Harlan)

Agua	Agua corriente
Cama	Madera talada
Dosis	NO DISPONIBLE
Volumen o volúmenes de administración	NO DISPONIBLE
Tiempo de inyección	NO DISPONIBLE
Ruta y frecuencia de la administración sistémica	NO DISPONIBLE
Duración del tratamiento	NO DISPONIBLE
Elección de la dosis y rutas de administración	Las dosis se seleccionaron en base a experimentos previos
Número/grupo	Indicado en las leyendas de las figuras
Número de grupos	Indicado en las leyendas de las figuras
Identificación individual de animales	NO DISPONIBLE

Cultivo de neuronas corticales de rata

Los cultivos primarios de neuronas corticales cerebrales se prepararon esencialmente tal como se ha descrito previamente (Bruno et al., 2001, *Eur. J. Neurosci.*, 13:1469-1478). Los lóbulos corticales fronto-laterales se diseccionaron de fetos embrionarios de 17 días Sprague-Dawley y se disociaron mecánicamente en solución equilibrada de Hank. Los lóbulos corticales se trituraron mediante la aspiración 7-10 veces utilizando una pipeta Pasteur con una punta estrechada al fuego. Después de la centrifugación a 800g durante 5 minutos, las células se resuspendieron en medio neurobasal sin suero (GIBCO) complementado con B27 (GIBCO) que contenía 2 mM de L-glutamina, penicilina (20 unidades/ml) y estreptomycin (5 µg/ml) y se emplacaron sobre placas de cultivo de 24 pocillos recubiertas de poli-L-lisina o sobre placas de cultivo de 6 pocillos recubiertas de poli-L-lisina. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de humedad saturada que contenía un 95% de aire y un 5% de CO₂ y se utilizaron las neuronas corticales para experimentos después de 7 días in vitro (DIV).

Cultivo mixto de neuronas y células gliales corticales de rata

Los cultivos primarios de neuronas y células gliales corticales cerebrales se prepararon esencialmente tal como se ha descrito previamente (Bruno et al., 2001, *Eur. J. Neurosci.*, 13:1469-1478). Los lóbulos corticales fronto-laterales se diseccionaron de fetos embrionarios de 17 días Sprague-Dawley y se disociaron mecánicamente en solución equilibrada de Hank. Los lóbulos corticales se trituraron mediante la aspiración 7-10 veces utilizando una pipeta Pasteur con una punta estrechada al fuego. Después de la centrifugación a 800g durante 5

minutos, las células se resuspendieron en medio neurobasal sin suero (GIBCO) complementado con B27 (GIBCO) y suero bovino fetal al 5% que contenía 2 mM de L-glutamina, penicilina (20 unidades/ml) y estreptomina (5 µg/ml) y se emplacaron sobre placas de cultivo de 24 pocillos recubiertas de poli-L-lisina o sobre placas de cultivo de 6 pocillos recubiertas de poli-L-lisina. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de humedad saturada que contenía un 95% de aire y un 5% de CO₂ y se utilizaron las neuronas corticales para experimentos después de 7 días in vitro (DIV).

Ensayo de LDH

Para experimentos de viabilidad, las neuronas corticales o las neuronas o células gliales corticales mixtas, sembradas sobre placas de 24 pocillos a razón de 15×10^4 células/pocillo y cultivadas durante 7 DIV, se trataron vehículo (DMSO 1%), NMDA (300 µM), NMDA (300 µM) + MTA (a diferentes concentraciones) o NMDA (300 µM) + MK-801 (10 µM) durante 6 h y 24 h. Los sobrenadantes se recogieron y las células se lavaron con PBS y se lisaron con Triton X-100 al 0,9% (v/v) en solución salina. La actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) se midió como un índice de muerte celular y la mortalidad se expresó como el porcentaje de LDH liberada el medio de cultivo. La LDH se midió espectrofotométricamente a 490 nm en un lector de una placa de 96 pocillos utilizando el Kit Cytotox 96 según las instrucciones del fabricante (Promega). El porcentaje de la liberación de LDH se define por la proporción de LDH liberada sobre el total de LDH presente en la célula al principio del tratamiento. Todas las muestras se realizaron por triplicado (Posada et al., 2007, *Br. J. Pharmacol.*, 150:577-585).

Ensayo de MTT

Para los experimentos de viabilidad, las neuronas corticales sembradas sobre placas de 24 pocillos a razón de 15×10^4 células/pocillo y cultivadas durante 7 DIV o células de neuroblastoma de SH-SY5Y desarrolladas en placas de cultivo de 24 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 80%, se trataron con vehículo (DMSO 1%), NMDA (300 µM), NMDA (300 µM) + MTA (a diferentes concentraciones) o NMDA (300 µM) + MK-801 (10 µM) durante 24 horas. Después del periodo de incubación, se añadieron a cada pocillo cinco mg/ml de MTT, siendo el volumen de MTT añadido igual a un décimo del volumen total del pocillo. A esto le siguió la incubación a 37 °C durante 3 horas. Después de esto, se extrajo el medio de cultivo y se disolvieron los cristales de formazán insolubles en 300 µl de DMSO (Merck). A continuación, se transfirieron alícuotas de cincuenta microlitros de cada pocillo a una microplaca de 96 pocillos, se diluyeron con 150 µl de DMSO y se midieron espectrofotométricamente en un lector ELISA (Microplate Reader 2001, Bio-Whittaker) a las longitudes de onda de referencia de 570 y 630 nm (Jordan et al., 2000, *Br. J. Pharmacol.*, 130:1496-1504).

Actividad de Caspasa 3

Las neuronas corticales o neuronas y células gliales corticales mixtas se emplacaron sobre placas de cultivo de 6 pocillos recubiertas de poli-L-lisina y después de 7 DIV, las células se trataron con vehículo o NMDA (300 μ M) para diferentes periodos de tiempo. En otro grupo de experimentos, las células se trataron con vehículo, NMDA solo o en presencia de MTA o MH-801 durante 1 hora. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron en tampón de lisis que contenía 100 mM Hepes, 5 mM DTT, 5 mM EGTA, 0,04% Nonidet P-40, y 20% glicerol; pH 7,4. A continuación, los extractos se centrifugaron a 5,000xg durante 10 min a 4°C, y se determinó el contenido de proteína mediante la utilización del ensayo de la proteína BCA según las instrucciones de fabricante. Los extractos celulares se incubaron (40 μ g de proteína) en tampón de reacción (25 mM Hepes, 10% sacarosa, 0,1% CHAPS, 10 mM DTT) que contenía 50 μ M de sustrato de fluorescencia Z-DEVD-AFC a 37°C durante 1 hora. La separación del fluoróforo AFC se determinó en un espectrofluorómetro a una longitud de onda de excitación de 400 nm y la fluorescencia se detectó a una longitud de onda de emisión de 505 nm. La actividad de caspasa 3 se expresó como unidades de fluorescencia/mg de proteína/h (Posadas et al., 2009, *Pharm. Res.*, In press).

Procedimientos experimentales

1. Producción de MTA: MTA fue suministrada por ENANTIA S.L. (Barcelona, España).
2. Análisis de datos: Los datos se expresan como la media \pm s.e.m. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando en análisis de varianza de una cola (ANOVA) y el test t de Bonferroni posterior para comparaciones múltiples. Los resultados estadísticos se indican en las leyendas de las figuras 7-12. El análisis estadístico se realizó utilizando Graph Pad Prism 4.0

Resultados

Los resultados se ilustran en las figuras 7-12.

Conclusiones

En el modelo de excitotoxicidad en neuronas corticales de rata, no existe un efecto neuroprotector de MTA hasta 500 μ M en cultivos neuronales puros. La falta de este efecto se ha observado tanto en la liberación de LDH como en la actividad de caspasa 3 inducidos por el agonista del receptor de NMDA. Sin embargo. Cuando están presentes las células gliales, se puede observar la protección contra la actividad de la caspasa 3 inducida por NMDA (figura 12). Esta acción neuroprotectora es similar a la observada utilizando el antagonista del receptor NMDA MK-801 (10 μ M).

Ejemplo 5: Evaluación de la actividad neuroprotectora de MTA en un modelo in vitro de neuroinflamación

Resumen

La neuroinflamación es un proceso común que tiene lugar en varias enfermedades neurológicas, tales como la Esclerosis Múltiple, la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, ALS o apoplejía, que contribuyen a la neurodegeneración. Se ha desarrollado un modelo in vitro de neuroinflamación que utiliza cultivos cerebelares organotípicos estimulados con LPS para la evaluación de la actividad neuroprotectora de MTA. Los resultados indican que la MTA disminuye el número de axones distróficos y previenen la pérdida de mielina, confirmando el efecto ventajoso de la MTA protegiendo axones y mielina contra el daño mediado por el sistema inmune.

Introducción

Modelo de neuroinflamación en cultivos organotípicos cerebelares.

El modelo de cultivos organotípicos de neuroinflamación se basa en observaciones previas en las que inyecciones sistémicas de lipopolisacárido (LPS) en médula espinal de ratones inducen inflamación, desmielinación y degeneración Walleriana. En cultivos organotípicos cerebelares de ratones, LPS induce la activación de microglía con la consecuente desmielinación y daño axonal. En particular, LPS induce la liberación de TNF-alfa e IL1-beta, el hinchamiento axonal y bulbos terminales debido al bloqueo del transporte axonal, y un descenso de la densidad axonal. Los cultivos organotípicos representan el mejor modelo para representar mecanismos in vivo, ya que mantienen la interacción célula-célula y la estructura organotípica de la región cerebral estudiada. De esta manera, este modelo de neuroinflamación in vitro reproduce la activación de microglía, la desmielinación y el fenómeno de daño axonal observado en MS.

Tratamiento

Los cultivos organotípicos cerebelares que se trataron previamente durante media hora con 192 μ M de MTA y 15 μ g/ml de LPS se ha utilizado para generar el modelo de neuroinflamación.

Material y métodos

Componentes de prueba

5'-desoxi-5'-metiltioadenosina (MTA)

Animales

Especie	Ratones de tipo salvaje C57/B16
Sexo	Macho y hembra
Edad	8-10 días
Rango de peso corporal	---
Suministrador	Harlan
Método de identificación	Marcaje de la placa
Aclimatación	Los animales se utilizaron 2 días después de la llegada a la

	instalación para animales
Condiciones del hábitat	6 ratones en jaulas ventiladas con la madre
Dieta	Madre: Chow de laboratorio (Harlan)
Agua	Madre: Agua corriente
Cama	Madera talada
Dosis	Vehículo 192µM MTA Tris 300mM
Volumen o volúmenes de administración	57 ml/pocillo
Tiempo de inyección	< 5 s
Ruta y frecuencia de la administración sistémica	Ninguno (in vitro)
Duración del tratamiento	30 minutos
Elección de la dosis y rutas de administración	Las dosis se seleccionaron en base a experimentos previos
Número/grupo	5 ratones P8-10
Número de grupos	3 para cada experimento (modelo de neuroinflamación con 5 y 15 µg/ml de LPS y modelo pretratado con MTA)
Identificación individual de animales	ratones numerados de 1 a 5

Dosis y grupos

Tres grupos de animales, consistiendo cada uno en 5 ratones P8-10.

Grupo:

1. 15 µg/ml de LPS en medio cultivo
2. 5 µg/ml de LPS en medio de cultivo
3. 192 µM de MTA en medio de cultivo más 15 µg/ml de LPS

Procedimientos experimentales

1. Producción de MTA: MTA fue suministrada por ENANTIA S.L. (Barcelona, España).
2. Análisis de datos: la transferencia Western, inmunofluorescencia y análisis ELISA se realizaron utilizando técnicas convencionales.

Resultados

Datos preliminares de nuestro laboratorio han mostrado que el uso de LPS en cultivos organotípicos de cerebelo de ratón produce activación de la microglia con una consecuente desmielinización y daño axonal en los cultivos. En las Figura 13.I y 13.II se puede observar que

el tratamiento con LPS induce activación de MHCII a las tres horas tras el tratamiento (Figura 13.II.B) y liberación de TNF-alfa 1 hora después de la estimulación con LPS (Figura 13.I.B). En la Figura 13.II.A se muestran las imágenes de inmunofluorescencia para MBP y NFL obtenidas con el microscopio confocal. Como se puede observar el tratamiento con LPS de los cultivos organotípicos induce desmielinización, que no se observa en los controles (Figura 13.II.A paneles 1 y 2). También se observa un hinchamiento de los axones característico de un bloqueo axonal, y botones de transección axonal, así como disminución de la densidad axonal (Figura 13.II.A paneles 3 y 4).

En el modelo de neuroinflamación in vitro, se observaron diferencias significativas entre los cultivos organotípicos cerebelares tratados con 15 µg/ml de LPS y los cultivos organotípicos tratados previamente con MTA. En particular, el análisis inmunofluorescente para la proteína básica de mielina (MBP) y neurofilamentos ligeros (NFL) mostró desmielinación y daño axonal en el modelo de neuroinflamación (figura 13), confirmado mediante análisis de transferencia Western. Además, en este modelo se observó la liberación de IL-1β y TNF-α (figuras 13-14), sugiriendo la activación de microglía. El tratamiento previo durante media hora con MTA antes de inducir la neuroinflamación previene la desmielinación y el daño axonal, y disminuye la producción de IL-1β (Figura 14). En resumen, la MTA es un neuroprotector en el modelo de neuroinflamación.

Conclusión

La MTA protege frente a la desmielinación, una neurodegeneración en este modelo de neuroinflamación en cultivos organotípicos.

Ejemplo 6: Actividad neuroprotectora de MTA en el daño axonal en un modelo transgénico de esclerosis múltiple progresiva

Resumen

En la Esclerosis Múltiple, la presencia de una discapacidad permanente depende principalmente de la pérdida axonal. Por esta razón, Un punto final crítico para los fármacos modificadores de la enfermedad para tratar MS es si son capaces de evitar la pérdida axonal debido al proceso inflamatorio en el cerebro. La MTA ha demostrado propiedades de protección celular in vitro y en modelos de animales de enfermedades del hígado. Además, se ha observado que la MTA presenta propiedades inmunomoduladoras y es capaz de mejorar la evolución y patogénesis del modelo animal de MS, Encefalomiелitis Autoinmune Experimental. Aquí, observamos que la MTA evita la pérdida axonal en el modelo de EAE, sugiriendo una actividad neuroprotectora que será beneficiosa para el tratamiento de la enfermedad. Con el fin de medir de manera precisa la pérdida axonal se utilizaron ratones transgénicos que expresan axones fluorescentes en el mecanismo motor (el tracto

corticoespinal).

Métodos

Modelo animal de MS progresivo

Se indujo una EAE crónica en ratones con YFP en el tracto corticoespinal (base C57B6; véase Bareyre et al., Nat Med. 2005 Dec; 11(12):1355-60) inmunizados con MOG. El marcaje fluorescente de axones motores permite una cuantificación precisa del daño axonal durante EAE.

Evaluación histológica

1. Alinear las médulas espinales de todos los animales y cortar las siguientes piezas de la médula espinal al mismo nivel en todos los animales: a) una pieza de la médula espinal cervical (aproximadamente 1 cm de largo) empezando alrededor del nivel cervical superior aproximadamente C1/2 (esto permitirá determinar el número de fibras CST que penetran la médula espinal); b) una pieza de la médula espinal lumbar (aproximadamente 1 cm de longitud) empezando alrededor del nivel medio-lumbar L2/3 (esto permitirá determinar el número de fibras que alcanzan la médula espinal lumbar).
2. Transferir médula espinal a sacarosa al 30% en PBS y esperar que el tejido se equilibre (la médula espinal se hundirá hasta el fondo) – habitualmente después de 3-7 días.
3. Incrustar piezas de médula espinal en tejido tek y congelar con precaución (se utilizó isopropanol enfriado hasta aproximadamente -40°C) – marcar la dirección de la médula espinal, de manera que se pueda estar seguro de iniciar el corte en el extremo superior (=craneal) del tejido.
4. Cortar secciones transversales de criostato empezando desde el extremo superior de la pieza de médula espinal (aproximadamente 50 micrómetros de grueso) y montarlas sobre una portaobjetos de vidrio adhesivo (por ejemplo, SuperFrost) – se cortaron habitualmente aproximadamente 20 secciones de la pieza cervical y lumbar por animal/almacenar el resto del bloque de tejido a -20°C.
5. Montar el tejido y analizar las secciones utilizando microscopía confocal – uso de un objetivo de alta resolución, por ejemplo, un objetivo de aceite 60x y tomar un único plano de imagen que cubre el tracto corticoespinal completo.
6. A continuación, se realiza el recuento simple del número de puntos (= número de fibras) – normalmente se hace a ciegas sobre 3-5 secciones y, a continuación, se calcula el promedio del CST como CST – especialmente en la médula espinal cervical que contiene muchas fibras podría ser más fácil estimar el número total de fibras CST cervicales en base al recuento de diversas áreas de CST con un tamaño definido. Mediante el recuento del número de fibras del CST cervical y lumbar en cada uno de los animales, se puede determinar la reducción del CST.

Además, si existen diferencias entre los grupos, se pueden enviar la próxima vez algunas médulas espinales de animales sanos, de manera que se pueda normalizar la reducción axonal a la reducción esperada en animales sanos (debido a las fibras de CST que terminan por encima de la médula espinal lumbar) y obtener el porcentaje de fibras de CST perdidas en EAE (normalmente alrededor del 40% en nuestros experimentos).

Material y métodos

Componentes de prueba

5'-desoxi-5'-metiltioadenosina (MTA)

Animales

Especie	YFP en el tracto corticoespinal (base C57B6)
Sexo	Hembra
Edad	8-12 semanas
Rango de peso corporal	20 gramos
Suministrador	Harlan
Método de identificación	Marca de pinzamiento para la oreja
Aclimatación	7 días después de la llegada a la instalación para animales
Condiciones del hábitat	8 ratones en jaulas ventiladas
Dieta	Chow de laboratorio (Harlan)
Agua	Agua corriente
Cama	Madera talada
Dosis	Placebo (PBS) MTA 96 $\mu\text{mol/Kg}$
Volumen o volúmenes de administración	200 μL
Tiempo de inyección	< 5 s
Ruta y frecuencia de la administración sistémica	intraperitonealmente (i.p) con una jeringa de 1 ml una vez cada 24 horas
Duración del tratamiento	30 días
Elección de la dosis y rutas de administración	Las dosis se seleccionaron en base a experimentos previos
Número/grupo	8 / 10 ratones
Número de grupos	2
Identificación individual de animales	ratones numerados de 1 a 8 / 10

Dosis y grupos

Dos grupos de animales.

Grupos:

1. Placebo (PBS) (8 animales)
2. MTA i.p. 96 $\mu\text{mol/Kg}$ (10 animales)

Procedimientos experimentales

1. Producción de MTA: MTA fue suministrada por ENANTIA S.L. (Barcelona, España).
2. Análisis de datos: El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS 13.0.

Resultados

Los animales se trataron cuando la EAE se volvió crónica (primer día con una valoración de EAE de 2 o superior ($>$ día 20 después de la inmunización). Los animales se pusieron al azar para ser tratados con MTA (96 $\mu\text{Mol/Kg}$) o placebo (PBS). Los animales tratados con MTA mostraron una mejora de los síntomas clínicos en comparación con el placebo (figura 15).

Se realizó una medición cuantitativa de la densidad axonal y la médula espinal lumbar y cervical. Se observó que los animales tratados con MTA presentaban una densidad axonal significativamente superior a la de los animales placebo (figura 16), indicando que el tratamiento con MTA en la fase crónica de la enfermedad era capaz de prevenir la pérdida axonal a largo plazo debido al ataque autoinmune contra el cerebro.

Conclusión

Los resultados indican que el tratamiento con MTA en la fase crónica de la enfermedad eran capaces de prevenir la pérdida axonal a largo plazo debido al ataque autoinmune contra el cerebro.

Ejemplo 7. Efecto neuroprotector de MTA en Epilepsia del Lóbulo Temporal Experimental

Resumen

La epilepsia del lóbulo temporal (TLE) está asociada con la pérdida sustancial de neuronas en la formación hipocampal. En modelos de roedores de TLE, un episodio de estado epiléptico (SE) conduce a un patrón similar de muerte neuronal hipocampal seguido del desarrollo de convulsiones recurrentes espontáneas. Se ha observado que los compuestos neuroprotectores son prometedores en la mejora de la muerte celular inducida por SE, pero son menos impactantes en la prevención de la epileptogénesis. Se llevaron a cabo estudios para examinar los efectos neuroprotectores de metiltioadenosina (MTA) en el modelo de pilocarpina de TLE. Un grupo de ratas recibió MTA durante 5 días empezando 2 días antes de SE (MTA pre-SE) y a otro grupo se le administró MTA durante 3 días empezando al término de SE (MTA post-

SE), una pauta de tratamiento clínicamente más relevante. Se examinó la pérdida celular en secciones de cerebro 3-5 días (punto de tiempo inicial) o 30 días (punto de tiempo posterior) después de SE. También se examinó el crecimiento de fibras musgosas mediante tinción Timm en el punto de tiempo posterior. A un grupo de control se administró vehículo y se llevó a cabo SE, y a un segundo grupo de control se administró MTA y solución salina en lugar de pilocarpina. Se observó que el tratamiento con MTA empezando antes o después de SE reducía cualitativamente la pérdida neuronal en el giro dentado las áreas del hipocampo CA1 y CA3 en ambos puntos de tiempo inicial y posterior evaluado mediante tinción Nissl e inmunohistoquímica NeuN. La cuantificación preliminar de células inmunorreactivas a NeuN en el área CA1 a los 30 días después de SE mostraron efectos neuroprotectores significativos en el grupo de MTA pre-SE ($p = 0,02$) y una tendencia hacia la neuroprotección en el grupo de MTA pre-SE ($p = 0,057$). No se observaron diferencias cualitativas en el crecimiento de fibras musgosas en ninguno de los grupos. Estos hallazgos sugieren que la MTA ejerce propiedades neuroprotectoras en el establecimiento de la muerte neuronal inducida por SE, y justifica el estudio adicional para determinar si la MTA muestra propiedades antiepilépticas en TLE experimental.

Introducción

La epilepsia del lóbulo temporal (TLE) es una forma común y a menudo resistente a los fármacos de epilepsia asociada con una morbilidad significativa debido a convulsiones recurrentes y una disfunción de la memoria asociada. Los humanos con TLE muestran una pérdida neuronal sustancial en la formación hipocampal que se cree que juega un papel en tanto la epilepsia como la disfunción cognitiva relacionada. La patología hipocampal de TLE se recapitula en modelos de roedores en los que los animales adultos se someten a un episodio de estado epiléptico (SE) que conduce después de un periodo latente a convulsiones recurrentes espontáneas. Este paradigma experimental modela el escenario clínico común en el que un niño experimenta un ataque febril complicado o SE febril y después de unos años continúa con el desarrollo de TLE.

No existen tratamientos antiepiléptogénicos para TLE. Todas las terapias actuales son sintomáticas y están dirigidas a la prevención de convulsiones recurrentes. Se ha observado que los compuestos neuroprotectores son prometedores en la mejora de la muerte celular inducida por SE en TLE experimental, pero son menos impactantes en la prevención de la epileptogénesis. De este modo, existe una necesidad urgente por nuevas terapias que prevengan el desarrollo de la epilepsia después de una lesión cerebral. Por lo tanto, se llevaron a cabo estudios para examinar los efectos neuroprotectores de la metiltioadenosina (MTA) en el modelo de pilocarpina de TLE. La pilocarpina es una agonista colinérgico muscarínico que

actúa como quimioconvulsivante para producir SE. El modelo de pilocarpina es un modelo de TLE utilizado normalmente que produce de manera consistente animales epilépticos con patrones de pérdida celular y reorganización aberrante muy similar a TLE humana.

Se compararon dos pautas de tratamiento con MTA para examinar su efecto neuroprotector sobre SE inducido por pilocarpina en ratas adultas. Una pauta implicó 5 días del tratamiento con MTA empezando 2 días antes de SE (Mta pre-SE). La otra pauta, un protocolo más clínicamente relevante, consistía en el tratamiento con MTA durante 3 días empezando al término de SE (MTA post-SE). Los resultados preliminares sugieren efectos neuroprotectores sustanciales con ambas pautas de tratamiento con MTA.

Materiales y Métodos

Componentes de prueba

5'-desoxi-5'-metiltioadenosina (MTA)

Animales

Especie	Rata (Sprague-Dawley)
Sexo	Macho
Edad	
Rango de peso corporal	175-200 g
Suministrador	Charles River
Método de identificación	
Aclimatación	3 días después de la llegada a la instalación para animales
Condiciones del hábitat	2-3 ratas en jaulas ventiladas (8" x 17" x 7")
Dieta	Chow de laboratorio
Agua	Agua corriente
Cama	
Dosis	
Volumen o volúmenes de administración	
Tiempo de inyección	< 5 s
Ruta y frecuencia de la administración sistémica	intraperitonealmente (i.p) con una jeringa de 1 ml una vez cada 24 horas
Duración del tratamiento	3 ó 5 días
Elección de la dosis y rutas de administración	Las dosis se seleccionaron en base a experimentos previos
Número/grupo	4-6 ratas excepto control sin SE (solo 2 ratas)
Número de grupos	5

Identificación individual de animales	ratas enumeradas de 1 a 25
---------------------------------------	----------------------------

Dosis y grupos

Cinco grupos de animales, 4-6/grupo excepto el grupo sin SE (sólo 2 rata).

Grupos:

1. Tris 100 mM para el control
2. MTA 96 μ M/Kg/día

Tratamiento de animales con 5'-metiltioadenosina (MTA)

Se dividieron ratas jóvenes adultas macho Sprage-Dawley (175-200 g) en cuatro grupos de tratamiento con MTA, 9-11 ratas por grupo. En el grupo A, las ratas se sometieron a un estado epiléptico (SE) inducido por pilocarpina. Después de 90 minutos de actividad convulsiva continua, se detuvo el SE mediante una única administración de diazepam (10 mg/kg). Las ratas se inyectaron con vehículo o MTA una vez diaria durante 3 días. Las ratas se sacrificaron en el día 4 después de SE y sus cerebros se fijaron por perfusión, se congelaron y se seccionaron para histología. En el grupo B, el tratamiento con ratas fue el mismo que el Grupo A a excepción de que las ratas se sacrificaron en el día 30 después de SE. En el grupo C, las ratas se trataron con Mta una vez diaria durante dos días. En el tercer día, las ratas experimentaron SE inducido por pilocarpina. Las ratas se trataron continuamente con MTA una vez diaria durante tres días más; los controles recibieron placebo. A continuación, las ratas se anestesiaron y sacrificaron el día 4 después de SE: En el grupo D, las ratas se trataron de la misma manera que el grupo C a excepción de que las ratas se sacrificaron en el día 30 después de SE.

Histología

Las secciones se sometieron a tinción con violeta de cresilo (Nissl) e inmunotinción con NeuN para examinar la pérdida celular. La tinción con Timm para identificar el crecimiento de fibras musgosas se realizó en el grupo de supervivencia de 30 días.

Procedimientos experimentales

1. Producción de MTA: MTA fue suministrada por ENANTIA S.L. (Barcelona, España).
2. Análisis de datos: El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS 11.0.

Resumen de los Resultados

La tinción co violeta de cresilo mostró cualitativamente más células teñidas con Nissl en los hipocampos de ratas tratadas con MTA en comparación con el vehículo, independientemente de si el tratamiento con MTA se iniciaba antes o después de SE, en ambos puntos de tiempo inicial y posterior. Los resultados de la inmunotinción con NeuN fueron similares y los ejemplos en el punto de tiempo a 30 días se muestran en la figura 17. Las diferencias en la

supervivencia celular eran cualitativamente claras en el giro dentado y las capas de células piramidales del área del hipocampo CA3 y CA1. La cuantificación del recuento de células teñidas con Nissl en el área CA1 se muestra en la figura 18. Los hallazgos sugieren que el tratamiento con MTA es neuroprotector en este modelo de epilepsia.

Conclusión

La MTA ejerce propiedades neuroprotectoras en el establecimiento de la muerte neuronal inducida por SE.

Ejemplo 8. Efecto neuroprotector de MTA en modelo de animal de la enfermedad de Parkinson

Resumen: Se ensayó el efecto de la metitioadenosina en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas (células TH+) en la sustancia negra del tronco del encéfalo en ratones tratados con MPTP tóxico para inducir el modelo de enfermedad de Parkinson.

Introducción

En la enfermedad de Parkinson varias poblaciones neuronales degeneran conduciendo a una enfermedad degenerativa crónica con trastornos en movimiento, anormalidades cognitivas y síntomas vegetativos. Entre las poblaciones neuronales dañadas por la enfermedad, las más prominentes son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra en el tronco del encéfalo, afectando al funcionamiento de los ganglios basales. Con el fin de estudiar la base biológica de la enfermedad, se utilizan en su lugar varios modelos de animales, siendo el utilizado más habitualmente la intoxicación con MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina). La intoxicación con MPTP en humanos y animales producen una enfermedad altamente reminiscente de la enfermedad de Parkinson, ambos a nivel clínico e histológico. Actualmente, la enfermedad de Parkinson carece de tratamientos dirigidos a modificar la evolución de la enfermedad (fármacos modificadores de la enfermedad), aunque la terapia sintomática está bien desarrollada. Debido a su frecuencia elevada, la salud y el coste social, el desarrollo de nuevas terapias para detener la evolución de la enfermedad es una prioridad principal. En este sentido, las terapias están dirigidas a proteger o regenerar las neuronas dopaminérgicas, que están principalmente reconocidas por las enfermedades.

Métodos

El modelo de ratones con MPTP

En este estudio se utilizaron ratones macho C57B1 con un cuerpo que variaba en peso de 23 a 31 g. Se inyectó intraperitonealmente MPTP (Sigma) disuelto en NaCl al 0,9% en una dosis de 30 mg/kg durante 5 días. Se disolvió MTA en agua purificada con un 2% de DMSO a una concentración final de 6 mg/ml y se inyectó intraperitonealmente en una dosis de 96 μ mol/Kg ó 192 μ mol/Kg. El primer día del experimento, se inyectó MTA 24 horas antes de la inyección

de MPTP y durante los siguientes cuatro días la administración de MTA fue 1 hora antes de la administración de MPTP. Los ratones se dividieron en cuatro grupos: (1) MPTP (n=6); (2) MPTP más 96 $\mu\text{mol/Kg}$ MTA (n=6); (3) MPTP más 192 $\mu\text{mol/Kg}$ MTA (n=9) y (4) Grupo de control (n=2).

Al final del experimento, los animales se anestesiaron con una sobredosis de hidrato cloral al 10% en agua destilada y a continuación se perfundió transcardialmente con solución salina de Ringer seguido de 100 ml de una solución de fijación fría que contenía paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,4% en PB 0,125 M, pH 7,4. Después de la perfusión, se abrió el cráneo y el cerebro extraído se fijó posteriormente durante toda la noche a 4°C en la misma solución de fijación y a continuación se almacenó en una solución crioprotectora que contenía glicerina al 20% y dimetilsulfóxido al 2% en PB 0,125 M, pH 7,4. Se obtuvieron secciones de micrótomos coronales congelados (50 μm de grosor) y se recogieron en PB 0,125 M, pH 7,4, en 6 series de secciones adyacentes. Las secciones se almacenaron a -80°C hasta el procesamiento posterior.

Immunohistoquímica

Con un inicio aleatorio, se tomaron muestras cada tercera sección a lo largo de todo el SN. Las secciones se procesaron sin flotación. Se eliminó la actividad de peroxidasa endógena mediante la incubación de las secciones en metanol con H_2O_2 al 1,25% durante 40 minutos. Después del bloqueo con suero de cabra normal al 4%, BSA al 4% y TX-100 al 0,05% en PBA 0,125 M (40 minutos, temperatura ambiente), las secciones se incubaron con un anticuerpo monoclonal antiTH de ratón (Sigma) diluido 1:500 (durante toda la noche a temperatura ambiente) en la misma solución de bloqueo. A continuación, se incubaron con un anticuerpo IgG anti-ratón de cabra biotinilada (Jackson ImmunoResearch) diluida 1:300 en suero de cabra normal al 0,5%, BSA al 2% en PBS 0,125 M durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron en una solución 1:4000 de ExtrAvidin® conjugada a peroxidasa en PBS 0,1325 M durante 90 minutos a temperatura ambiente y se visualizaron las estructuras inmunoreactivas después de la incubación en 3,3'-diaminobenzidina (DAB) al 0,05% y H_2O_2 recién preparado 0,03% en Tris-HCl 0,05 M (pH 7,4). Finalmente, las secciones se montaron sobre portaobjetos de vidrio utilizando una solución al 2% de gelatina en Tris-HCl 0,05M. Al día siguiente se contratiñeron con Nissl (Sigma), se deshidrataron, se purificaron en xileno y se recubrieron con DPX. Antes de la inhibición de la peroxidasa, incubación con los anticuerpos primarios y secundarios, conjugación con peroxidasa e incubación con DAB y montaje sobre los portaobjetos de vidrio, las secciones se lavaron 3 veces con PBS 0,125 M. La cuantificación histológica se realizó utilizando el sistema CAST de Olympus utilizando el microscopio BX50 y los siguientes métodos descritos por Oorschot (J Comp Neurol 366:580–

599, 1996). Se utilizó el método Cavalieri para calcular los volúmenes utilizando secciones de un grosor de 50 μm . Las neuronas se contaron utilizando el disector óptico cada 3 secciones a una distancia de 150 μm y a $\times 400$. En todos los casos, el coeficiente de error fue inferior al 10%.

Resultados

Se observó que los animales tratados con MPTP tuvieron un descenso en el número de neuronas dopaminérgicas del 40% en comparación con los animales de control. En cambio, los animales tratados con MTA 96 $\mu\text{M}/\text{día}$ presentaron una pérdida neuronal significativamente inferior en comparación con los animales de control (10%) y un número significativamente superior de neuronas dopaminérgicas que los animales tratados con MPTP (30% más) (figura 19).

Conclusiones

Los resultados muestran que la MTA protege a las neuronas dopaminérgicas frente al daño inducido por MPTP, sugiriendo que la MTA puede convertirse en una terapia neuroprotectora (terapia modificadora de la enfermedad) para la enfermedad de Parkinson.

Ejemplo 9. Capacidad de MTA para inducir diferenciación neuronal en un modelo “*in vitro*” y estudio de las vías de señalización implicadas

Resumen

Se ensayó el efecto de la metiloadenosina (MTA) en la inducción de la diferenciación de precursores neuronales a neuronas, determinado por la producción de neuritas, en una línea de células dopaminérgicas procedentes de pheocromocitoma de rata (PC12) y se estudiaron las vías de señalización implicadas.

Introducción

La línea PC12 es utilizada como sistema modelo para diferenciación de células neuronales. Tras estimulación con factor de crecimiento nervioso (NGF), paran su crecimiento, comienzan a formar procesos y a expresar otros marcadores neuronales como la formación de vesículas sinápticas tras el estímulo apropiado. Es bien conocido que las vías de señalización ras-MAPK, fosfolipasa C (PLC) y fosfatidilinositol (PI)3-kinase se activan tras el tratamiento con NGF. El sistema de diferenciación de neuritas en PC12 es por tanto un sistema idóneo para el estudio de la capacidad de MTA de formación de neuritas y de las vías de señalización implicadas.

Métodos

Cultivo de PC12

Las células PC12 se mantuvieron a 37 °C en medio HAM'S suplementado con 2,5% de suero bovino fetal, 15% de suero de caballo y penicilina/estreptomicina. Los ensayos de diferenciación de neuritas se realizaron en placas de 24 pocillos tratadas con colágeno en

medio HAM'S suplementado con 0,5% de suero bovino fetal y penicilina/estreptomicina. Se añadió a los cultivos NGF (100 ng/ml) o MTA a diferentes concentraciones (25 μ M, 100 μ M y 2 mM) y tras cuatro días se contabilizó el porcentaje de células con neuritas mayores en longitud a 2 cuerpos celulares. Para cada experimento se contabilizaron de forma aleatoria un mínimo de 300 células.

Determinación de fosforilación intracelular

La detección de la fosforilación de diferentes proteínas intracelulares fue realizada mediante tecnología Luminex. Tras el ensayo de diferenciación de neuritas se recogieron las PC12 en bufer de lisis y se testaron con diferentes anticuerpos: total Akt/PKB, total p38/SAPK, total STAT3, total ERK/MAPK, total P70 S6Kinasa, Akt/PKB fosforilada (Ser473), Akt/PKB fosforilada (Thr 308), p38/SAPK fosforilada (Thr180/Tyr182), STAT 3 fosforilada (Tyr705/Ser 727), ERK/MAPK fosforilada (Thr185/Tyr187), P70 S6Kinase fosforilada (Thr412).

Resultados

En los resultados de diferenciación de neuritas podemos observar la capacidad de MTA para desarrollar nuevos procesos en células PC12. La formación de nuevas neuritas depende de la concentración de MTA añadida en el medio, siendo 1 mM la concentración más óptima. La concentración más elevada testada (5 mM) no presenta efecto en el desarrollo de neuritas (Figura 20 A y B). En el proceso de diferenciación inducido por MTA en células PC12 podemos observar activación de las vías MAPK, p38/SAPK y STAT3, lo que sugiere que el efecto de MTA en la diferenciación de neuritas podría no transcurrir por la misma vía de actuación de NGF (vía que requiere inhibición de la fosforilación de STAT 3 (Figura 21).

Conclusiones

Los resultados muestran que MTA es capaz de promover la diferenciación a neuronas en células PC12 utilizando una vía alternativa a la clásica utilizada por NGF en esta misma línea celular.

Ejemplo 10. Capacidad de neuroprotección de MTA frente a estrés oxidativo "in vitro".

Resumen

Se ensayó la capacidad de neuroprotección de MTA en la línea de Schwannoma de rata RN22 frente a dos tipos de estrés oxidativo: peróxido de hidrógeno y sulfato de cobre. La neuroprotección se midió por la capacidad de protección frente a muerte producida por el estrés y la capacidad de reducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) directamente relacionadas con la producción de estrés oxidativo.

Introducción

La línea RN22 (Schwannoma de rata) es utilizada como sistema para el estudio de protección

frente a estrés por sulfato de cobre debido a que en esta línea NGF es capaz de activar vías de supervivencia mediante su receptor de membrana p75. Tras la generación del estrés, las células en las que se añade NGF activan vías de supervivencia mediante el receptor p75 que les permite sobrevivir a las condiciones. El sistema de supervivencia a estrés en RN22 es por tanto un sistema idóneo para el estudio de la capacidad de MTA de proteger células del sistema nervioso frente a diferentes tipos de estrés.

Métodos

Cultivo de RN22

Las células RN22 se mantuvieron a 37 °C en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y penicilina/estreptomicina. Los ensayos frente a estrés por sulfato de cobre se realizaron en placas de 24 pocillos en medio DMEM sin suero. Tras permitir la adherencia de las células durante 3 días se añadió NGF (100 ng/ml) o MTA a diferentes concentraciones media hora antes que el sulfato de cobre (150 µM). Tras 24 horas, se cuantificó la viabilidad celular mediante ensayo MTT y la producción de ROS mediante fluorescencia. Los ensayos frente a estrés por peróxido de hidrógeno se realizaron de la misma manera que los anteriores pero utilizando peróxido de hidrógeno 100 µM como agente productor del estrés.

Ensayo MTT

Se determina la cantidad de MTT (Sigma) que se reduce hacia formazan insoluble. Tras separar el medio, el formazan insoluble en agua se solubiliza en DMSO y el material disuelto se mide en el espectrofotómetro a 570 nm.

Medición de ROS

Se determinó la cantidad de ROS producida por las células tras el estrés con y sin tratamiento. 2',7'-Diclorodihidrofluorescina (DCFH) se utiliza de forma generalizada para medir estrés oxidativo en células. Las células se incubaron con DCFH-DA (10 µM) a 37 °C durante 30 minutos. Tras la incubación se realizaron 2 lavados con PBS y se lisaron las células con bufer 10 mM Tris-HCL que contenía 0,5% de Tween 20. Los homogeneizados se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos para separar los restos celulares y se midió la fluorescencia de DCF en el sobrenadante mediante un fluorímetro (excitación 492-495, emisión 517-527 nm)(Invitrogen).

Resultados

En los ensayos de neuroprotección frente a estrés por sulfato de cobre podemos observar que MTA ejerce un efecto neuroprotector significativo llegando incluso a los niveles de protección del control NGF en la mayoría de las concentraciones de MTA testadas (Figura 22). El efecto de MTA depende de la concentración de la molécula, siendo las concentraciones elevadas (rango mM) las de menor respuesta. Este efecto se ve confirmado con la capacidad anti-

oxidante de MTA de reducir la producción de ROS a diferentes tiempos tras la inducción del estrés (Figura 23).

En los ensayos de neuroprotección frente a estrés por peróxido de hidrógeno podemos observar que MTA es capaz de mantener la viabilidad celular en todo el rango de concentraciones testadas (25 μ M-3 mM)(Figura 24). De la misma manera que en el caso del estrés con sulfato de cobre, MTA es capaz de reducir la producción de ROS a diferentes tiempos tras estrés producido por peróxido de hidrógeno (Figura 25).

Conclusiones

Los resultados muestran la capacidad neuroprotectora de MTA frente a diferentes tipos de estrés oxidativo. MTA en ambos casos mantiene la viabilidad celular tras el estrés y tiene un efecto anti-oxidante reduciendo de manera significativa los niveles de producción de ROS en células de Schawn.

Reivindicaciones

1. Uso de 5'-metiltioadenosina (MTA), sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas como principio activo en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la muerte o el daño de las células nerviosas.
2. Uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas como principio activo en la fabricación de un medicamento neuroprotector.
3. Uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas como principio activo en la fabricación de un medicamento para la regeneración de células nerviosas.
4. MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso en la prevención o el tratamiento de la muerte o el daño de las células nerviosas.
5. MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso como fármaco neuroprotector.
6. MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso en la regeneración de células nerviosas.
7. Método de prevención o tratamiento de la muerte o el daño de las células nerviosas que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de MTA o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas.
8. Método de neuroprotección que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de MTA o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas.
9. Método de regeneración de células nerviosas que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de MTA o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas.
10. Uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, o los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde MTA se administra a un sujeto con una enfermedad neurológica o psiquiátrica.
11. Uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, o los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde

MTA se utiliza como adyuvante o terapia adicional a un sujeto con una enfermedad neurológica o psiquiátrica.

12. Uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, o los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde MTA se administra a un sujeto sano.
13. Uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, o los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde MTA se utiliza como adyuvante o terapia adicional a un sujeto en tratamiento con uno o más fármacos neuropotenciadores.
14. Uso de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas como principio activo en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica seleccionada entre isquemia del nervio óptico, esclerosis múltiple progresiva, neuromielitis óptica, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, Ataxia de Friedreich, Enfermedad de Huntington, Demencia con cuerpos de Lewy, atrofia muscular espinal, epilepsia, neuritis óptica, traumatismo craneal, tumor cerebral, depresión, trastorno bipolar, esquizofrenia, enfermedad obsesivo compulsiva, abuso del alcohol, abuso de fármacos, encefalopatía, encefalitis, meningitis, fatiga crónica, fibromialgia, dolor crónico, migraña, y dolor de cabeza.
15. MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurológica o psiquiátrica seleccionada entre isquemia del nervio óptico, esclerosis múltiple progresiva, neuromielitis óptica, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, Ataxia de Friedreich, Enfermedad de Huntington, Demencia con cuerpos de Lewy, atrofia muscular espinal, epilepsia, neuritis óptica, traumatismo craneal, tumor cerebral, depresión, trastorno bipolar, esquizofrenia, enfermedad obsesivo compulsiva, abuso del alcohol, abuso de fármacos, encefalopatía, encefalitis, meningitis, fátiga crónica, fibromialgia, dolor crónico, migraña, y dolor de cabeza.
16. Método de prevención o tratamiento de una enfermedad neurológica que comprende administrar a un sujeto con necesidad del mismo una cantidad eficaz de MTA, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o profármacos de las mismas, donde la

enfermedad neurológica o psiquiátrica se selecciona entre isquemia del nervio óptico, esclerosis múltiple progresiva, neuromielitis óptica, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, Ataxia de Friedreich, Enfermedad de Huntington, Demencia con cuerpos de Lewy, atrofia muscular espinal, epilepsia, neuritis óptica, traumatismo craneal, tumor cerebral, depresión, trastorno bipolar, esquizofrenia, enfermedad obsesivo compulsiva, abuso del alcohol, abuso de fármacos, encefalopatía, encefalitis, meningitis, fatiga crónica, fibromialgia, dolor crónico, migraña, y dolor de cabeza.

Figura 1

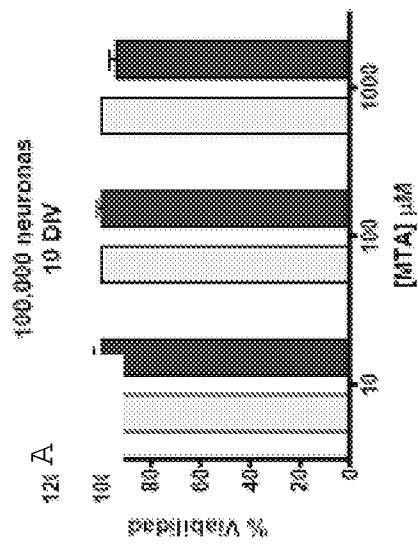
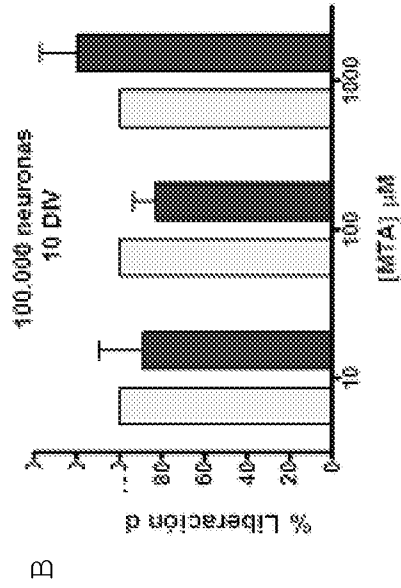


Figura 2

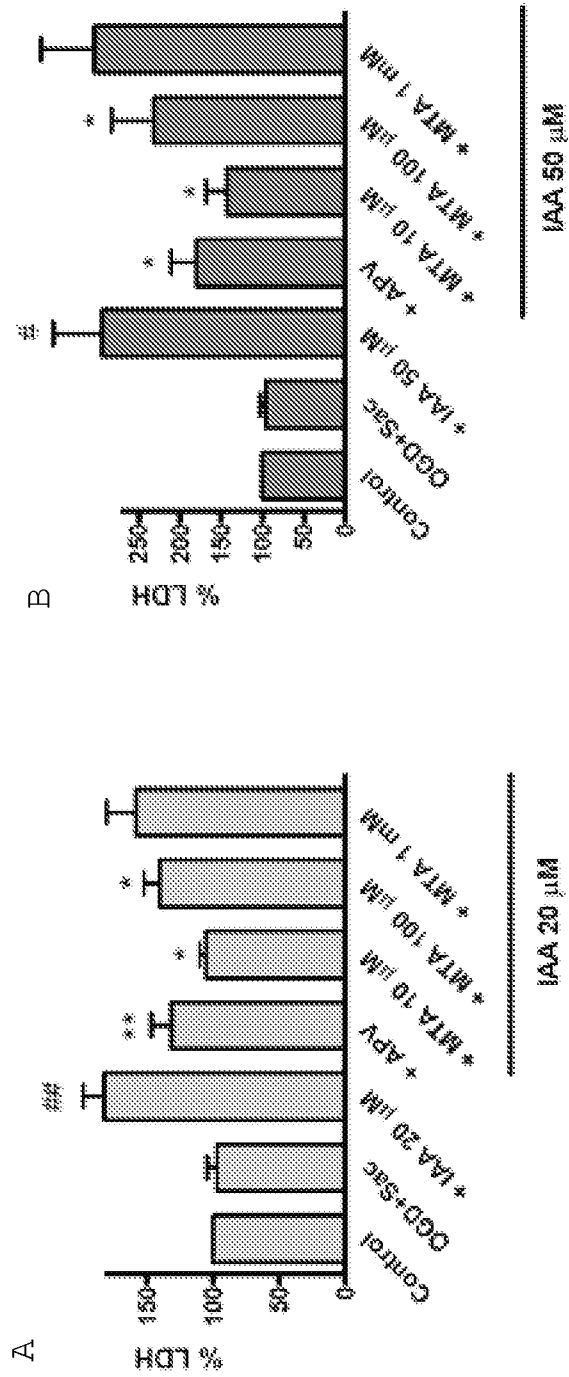


Figura 3

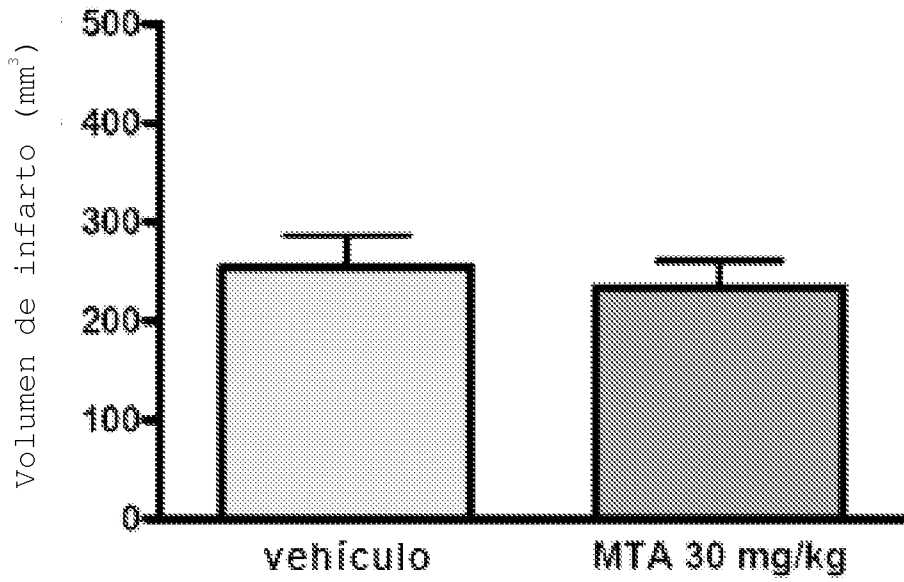


Figura 4

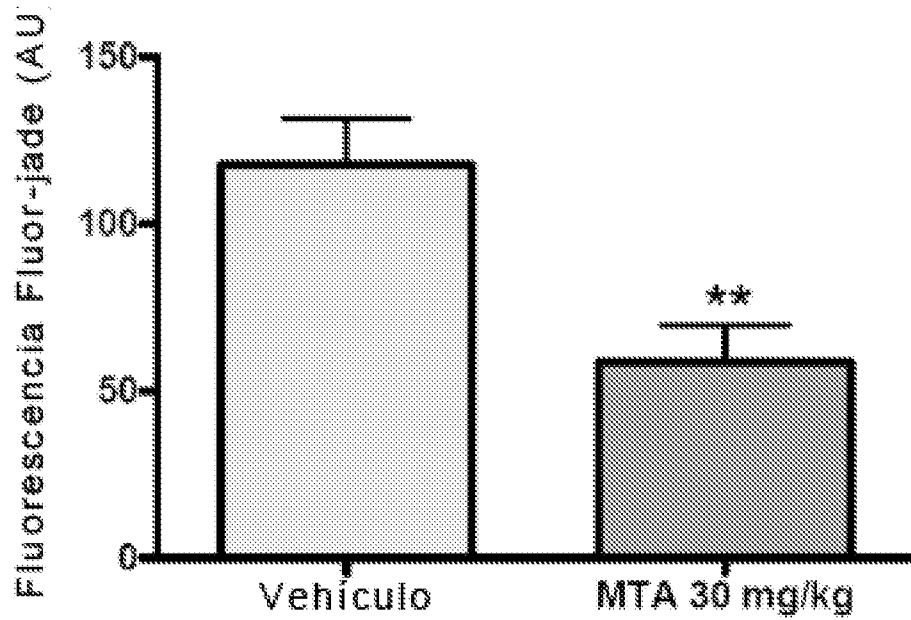


Figura 5

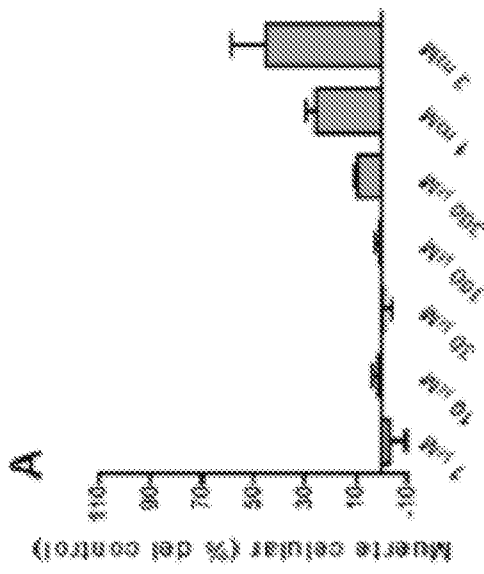
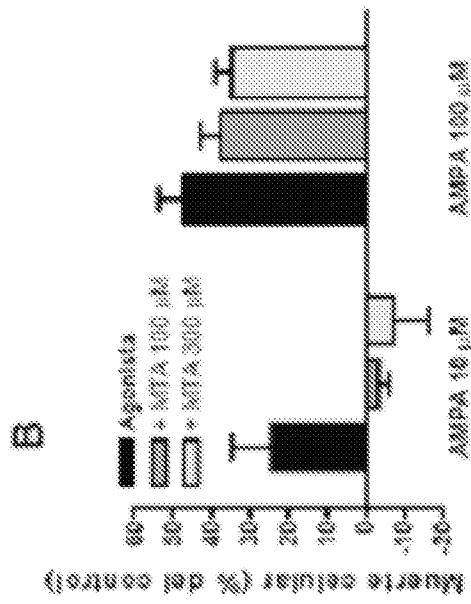


Figura 6

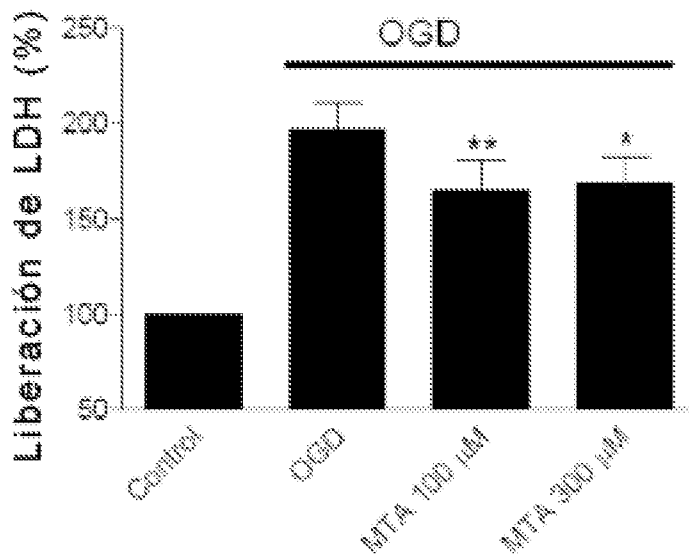
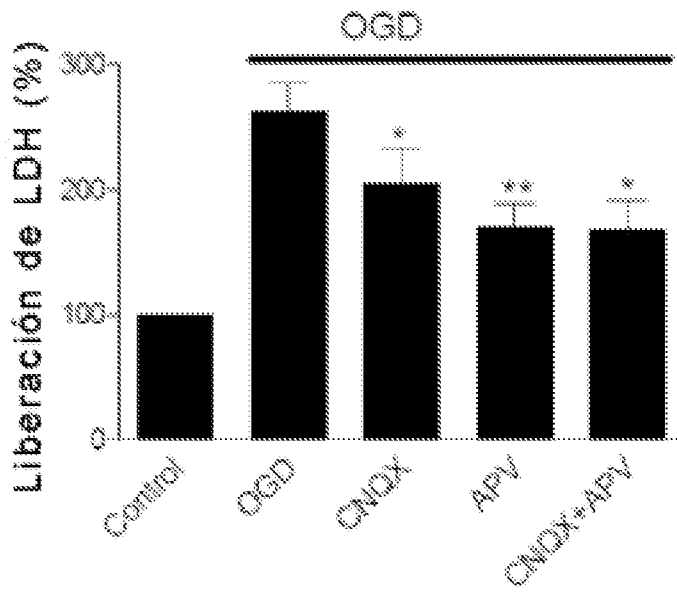
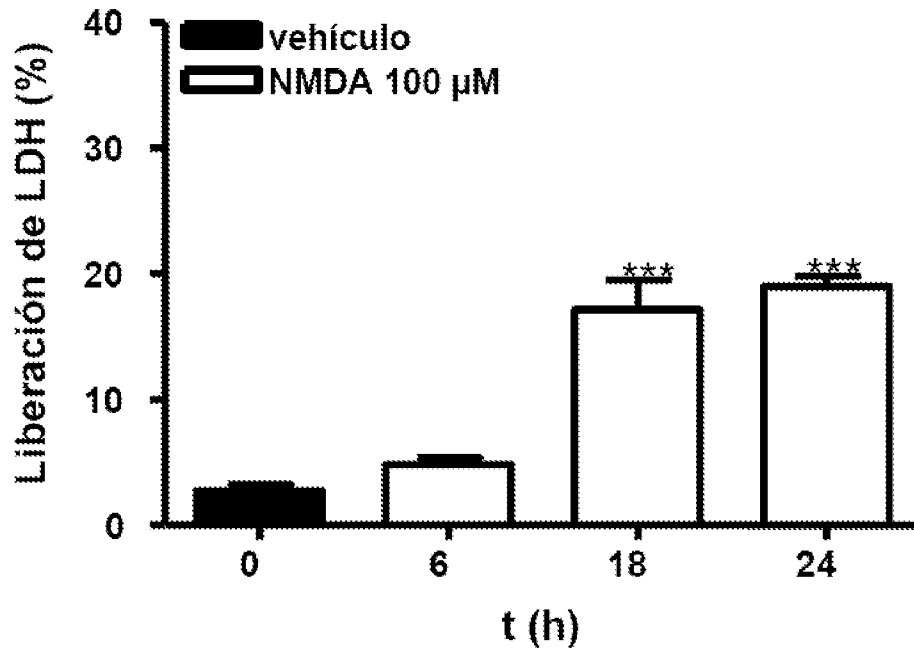
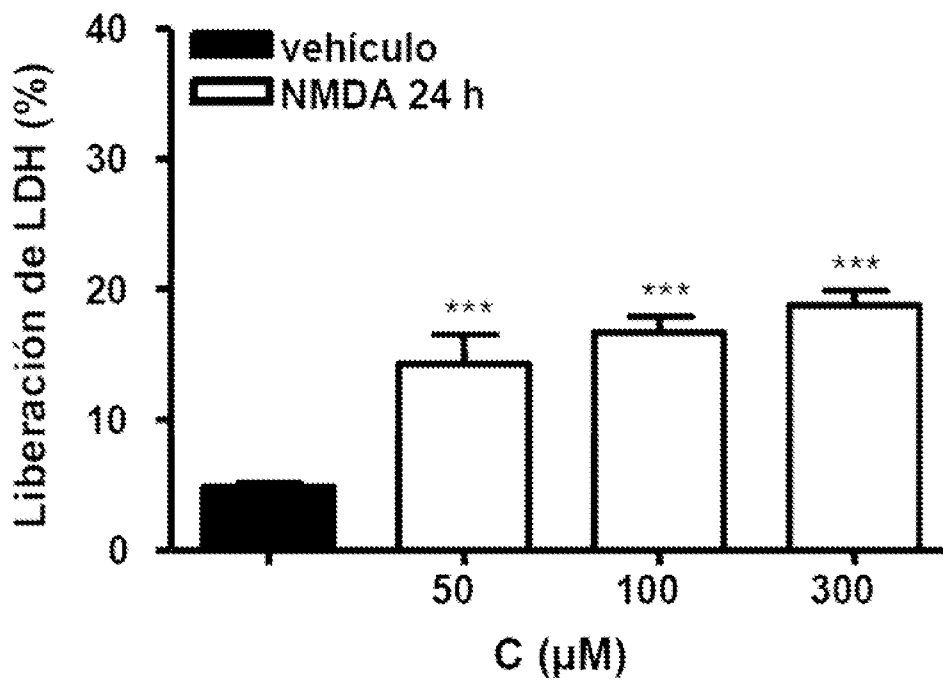


Figura 7



5 Figura 8



7/24

Figura 9

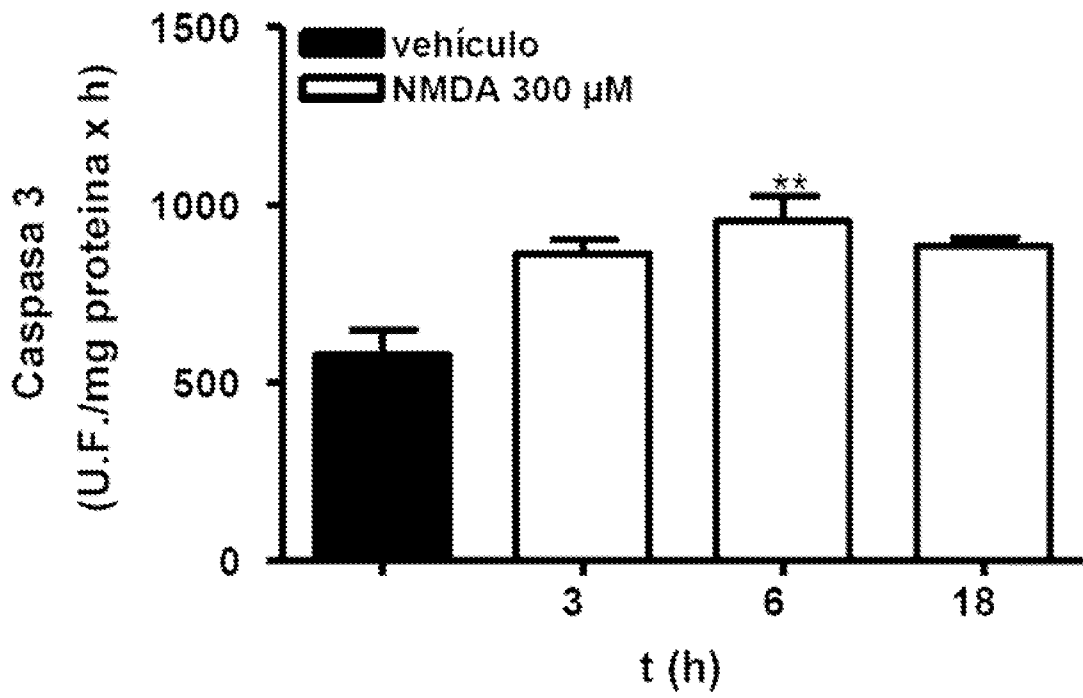
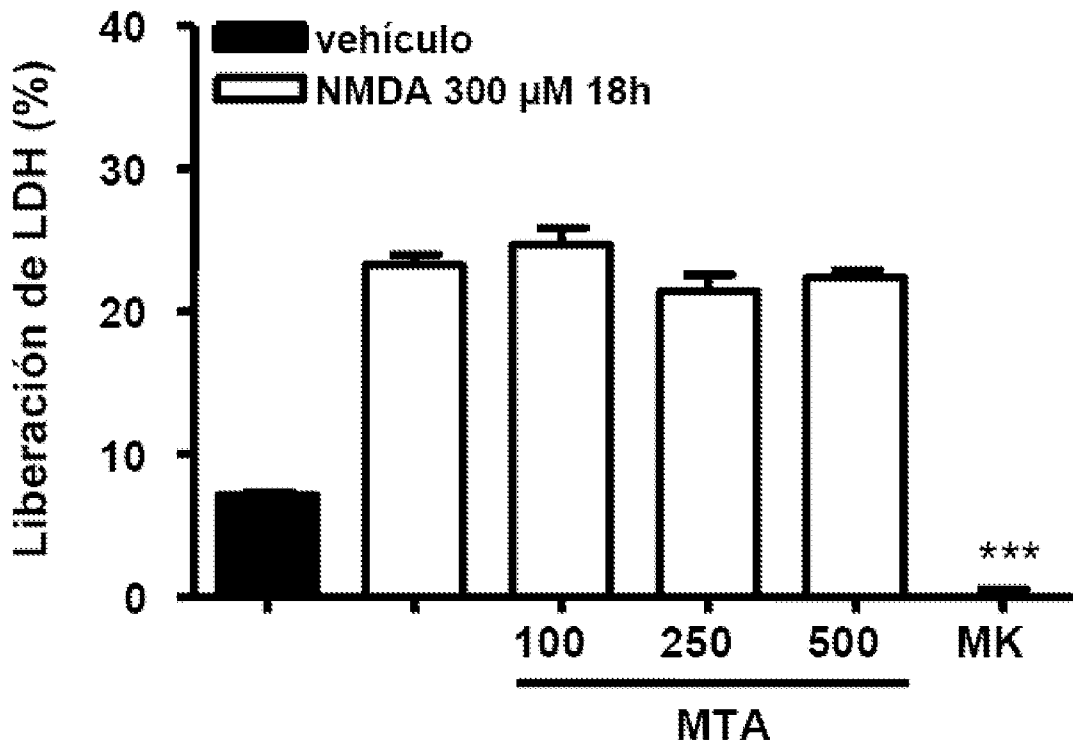


Figura 10



8/24

Figura 11

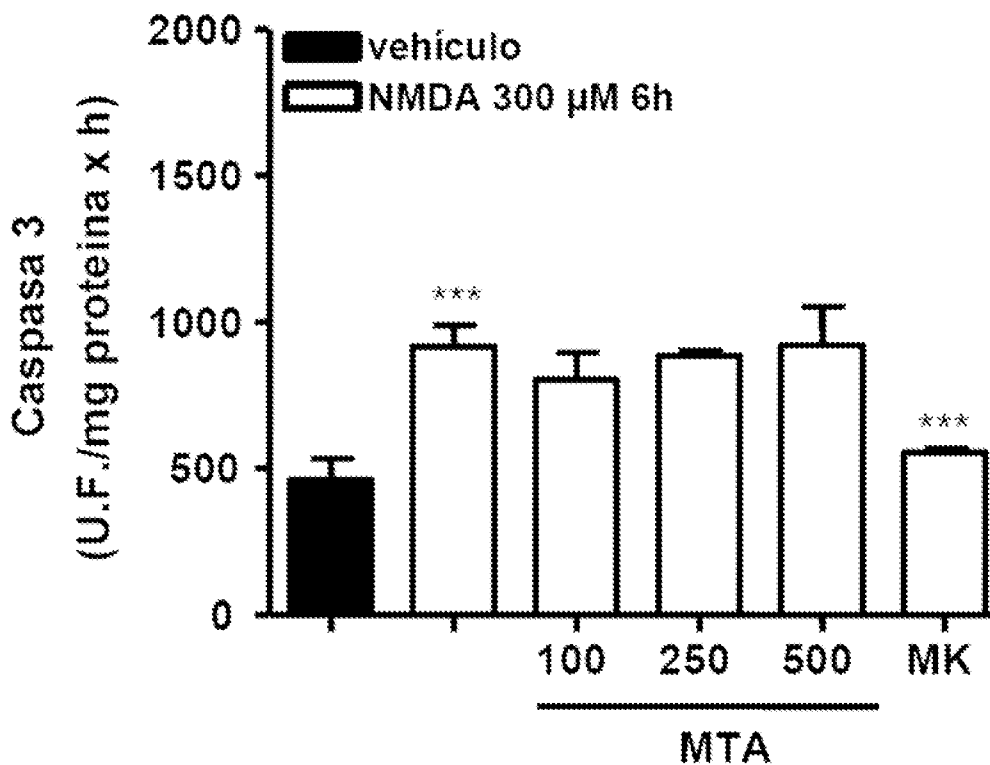


Figura 12

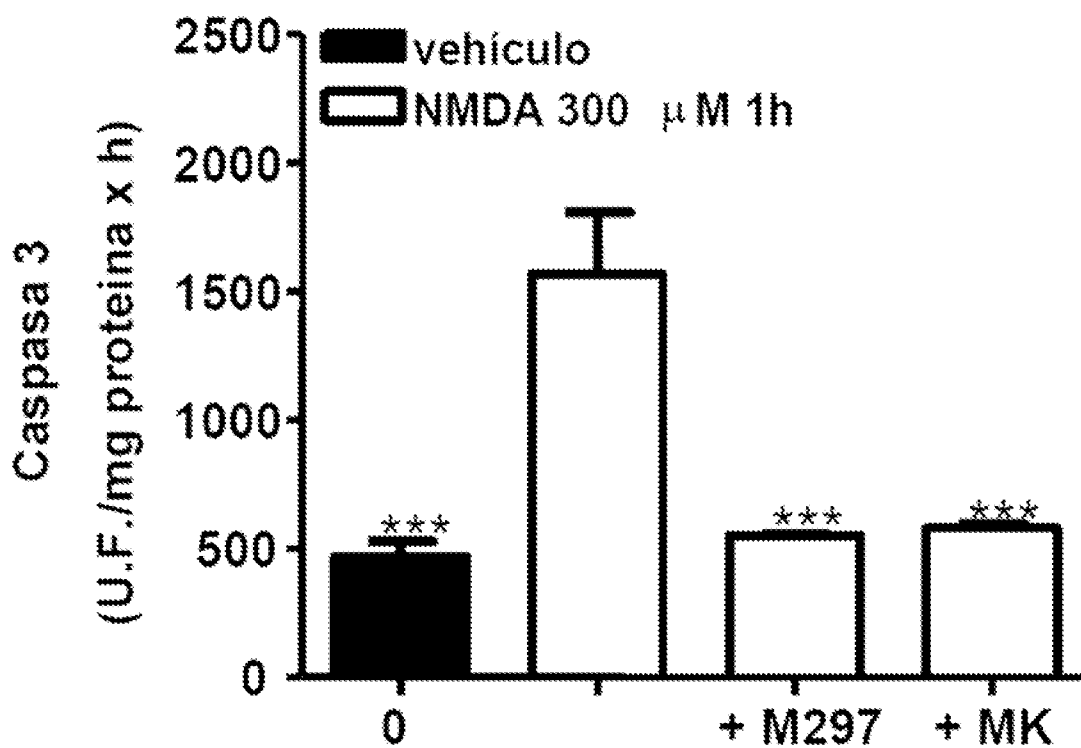
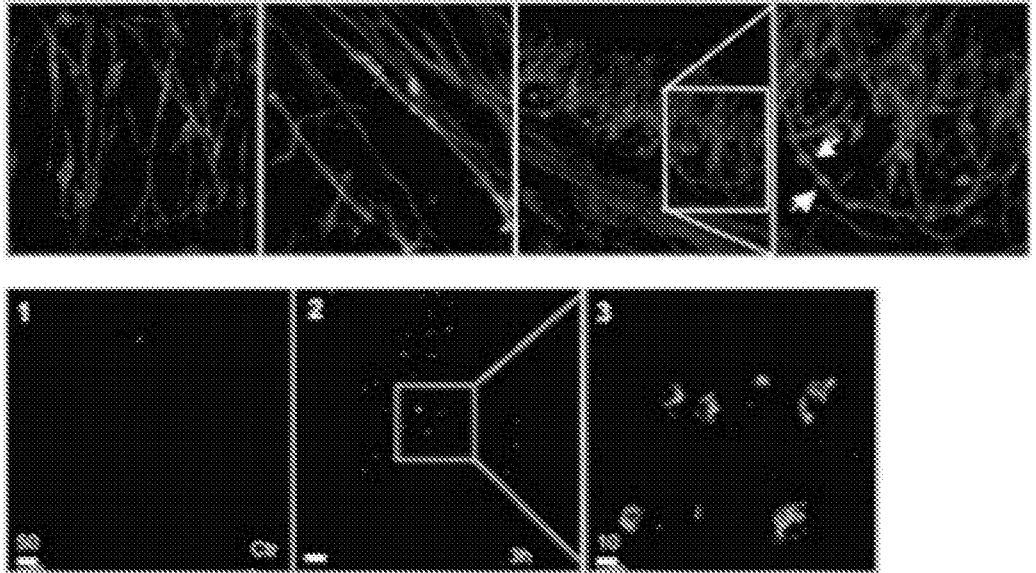


Figura 13b

A



B

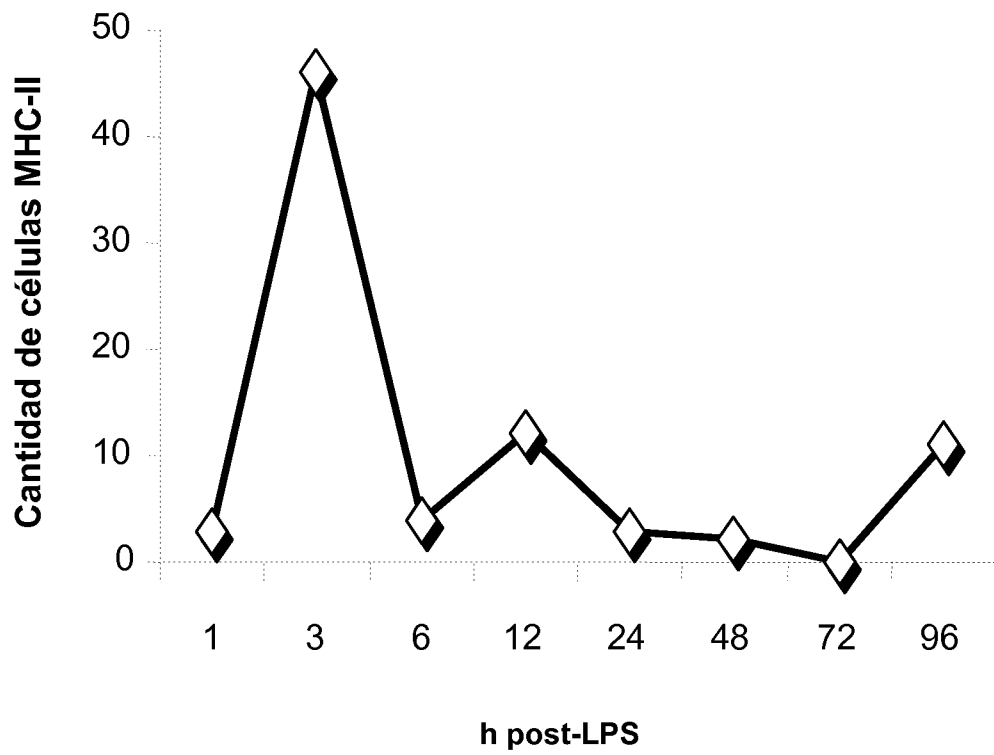
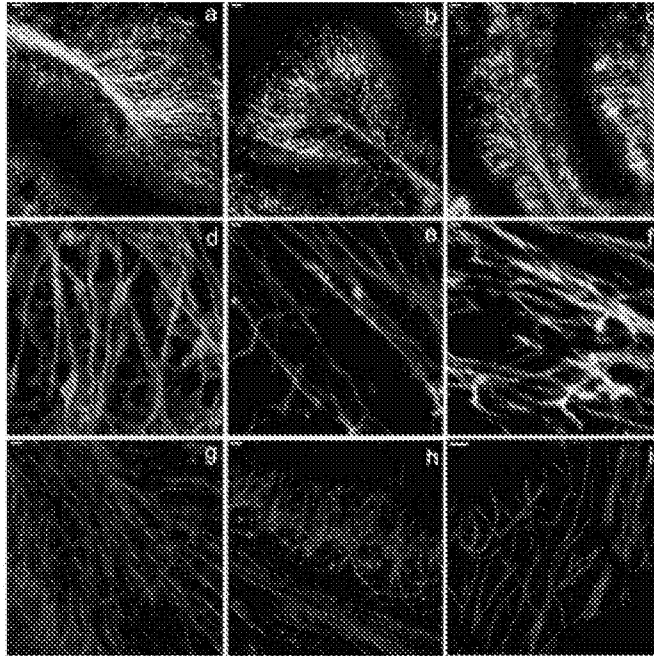
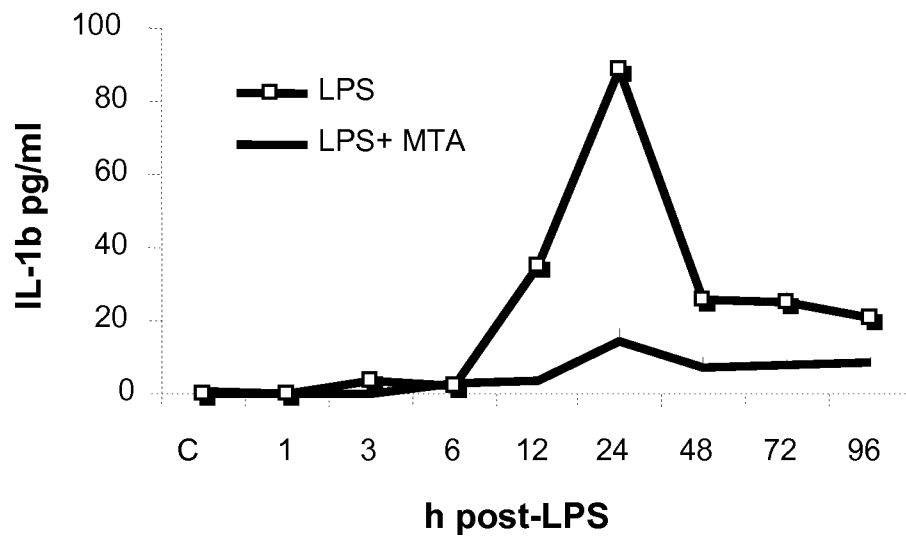


Figure 14

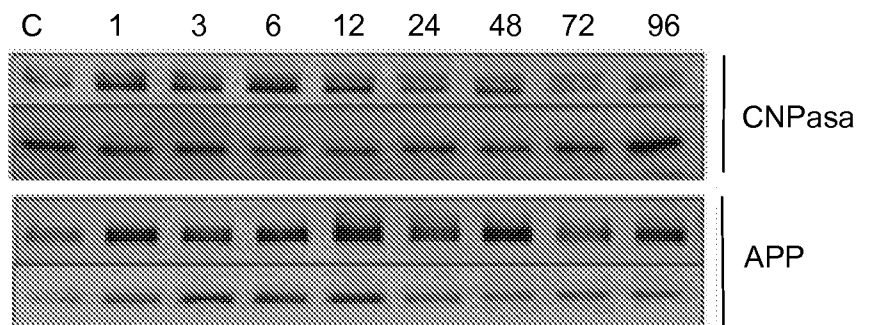
A



B



C



12/24

Figura 15

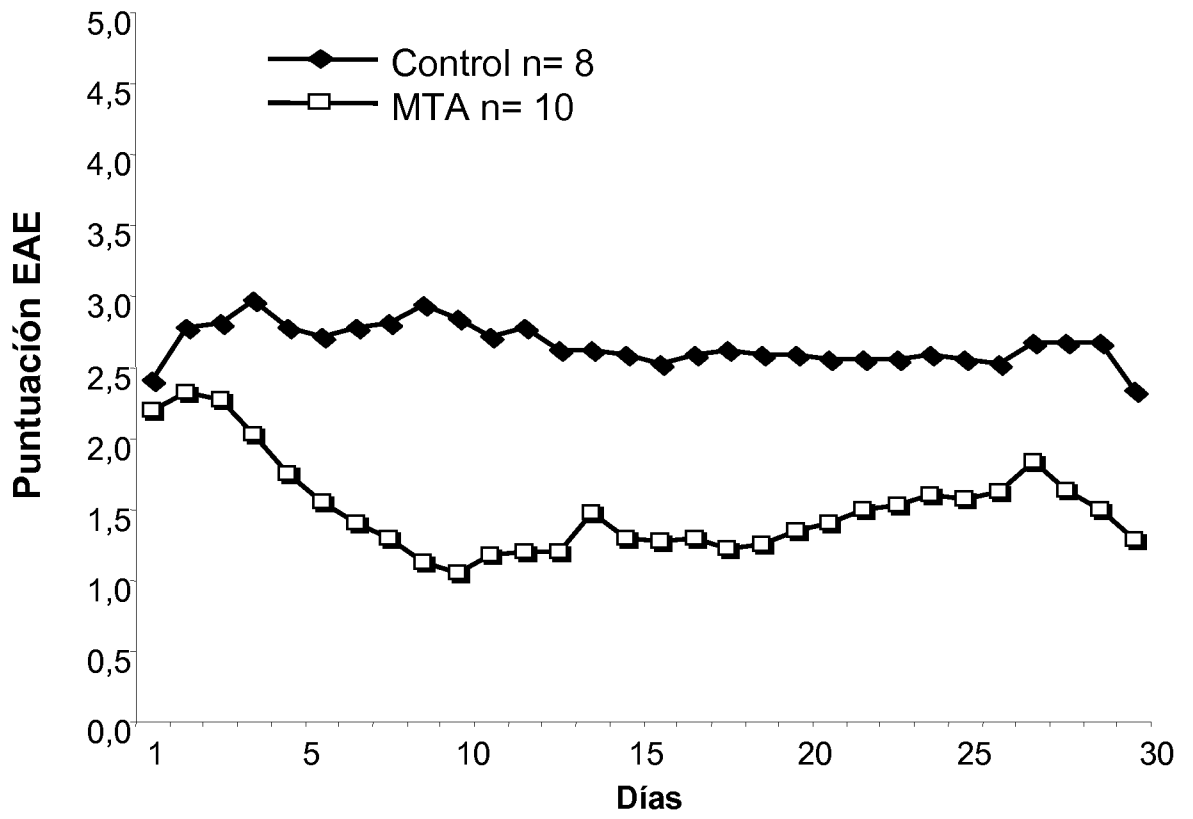


Figura 16

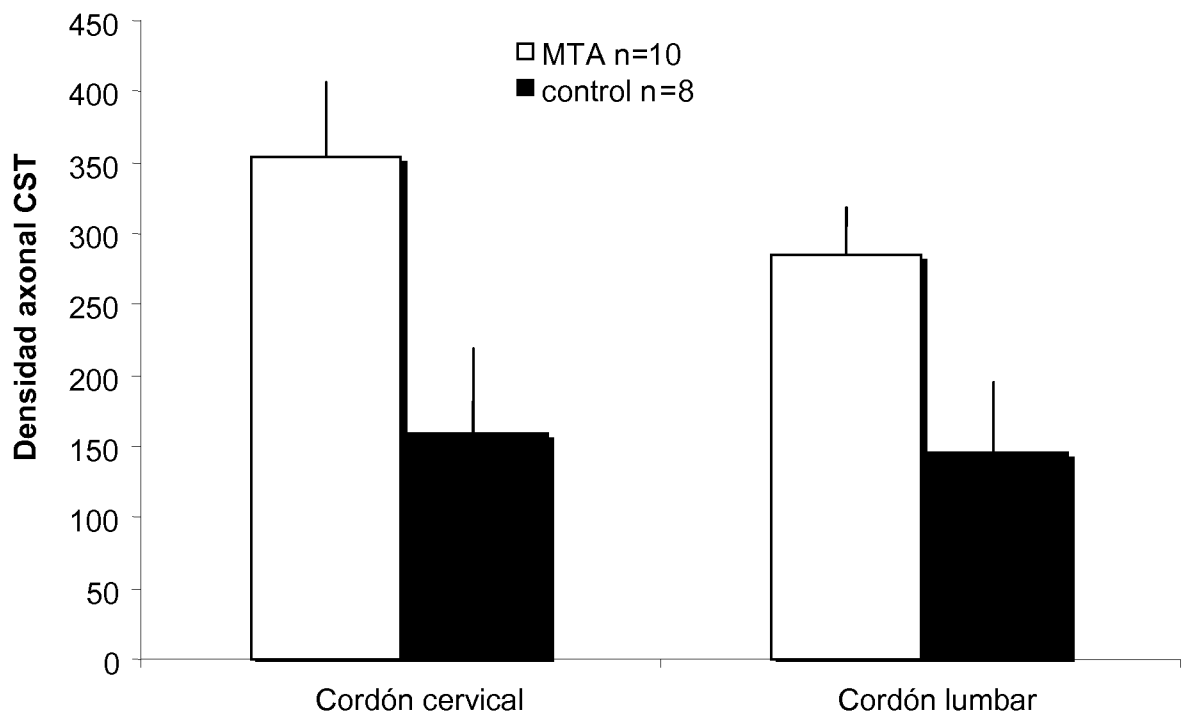


Figura 17

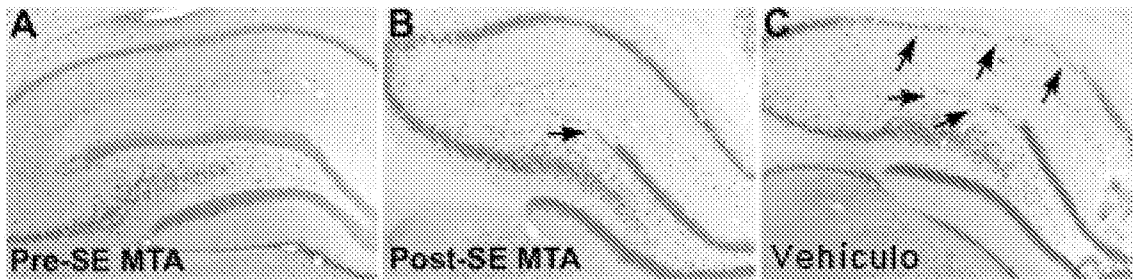


Figura 18

Efecto del tratamiento post-ataque con MTA en CA1

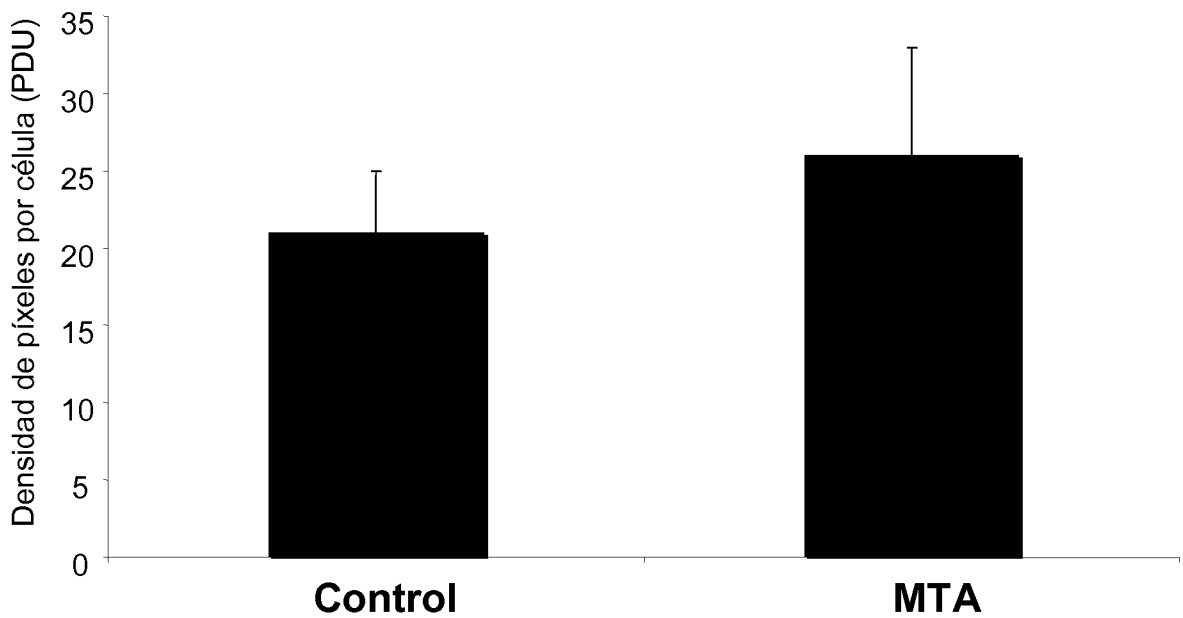


Figura 19

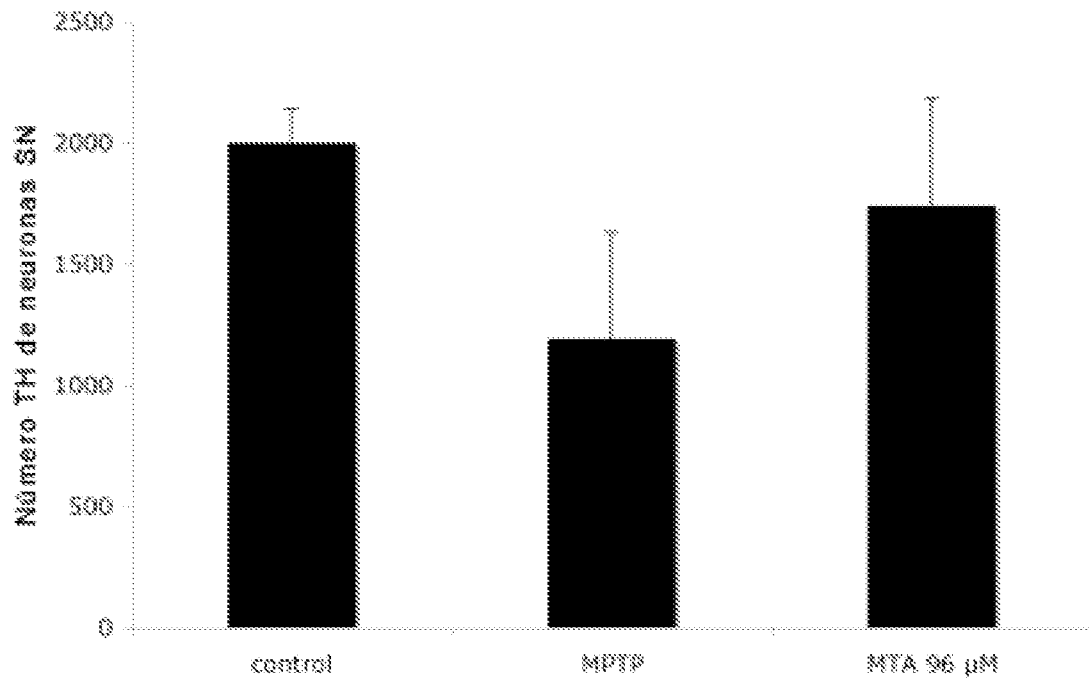


Figura 20A

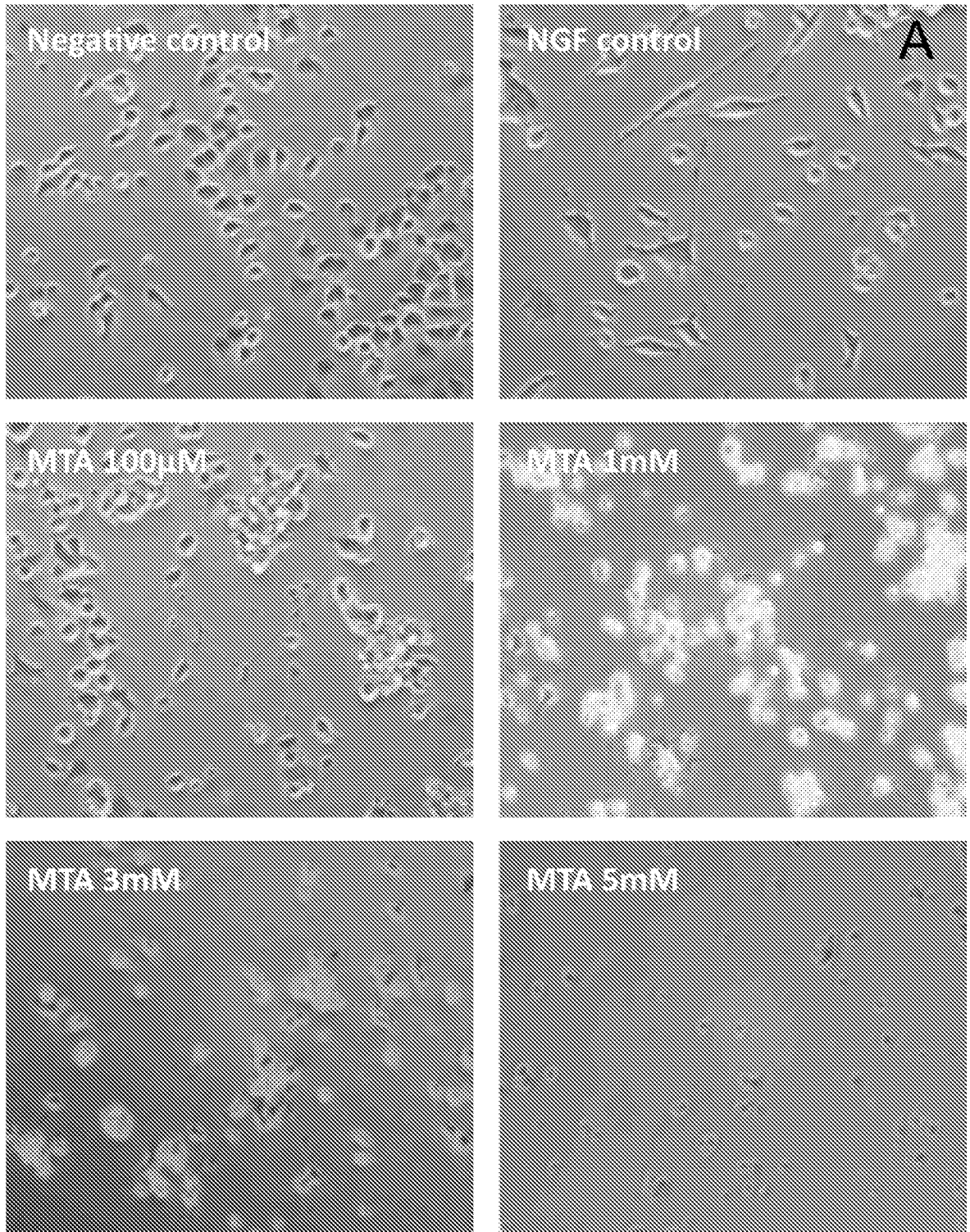


Figura 20B

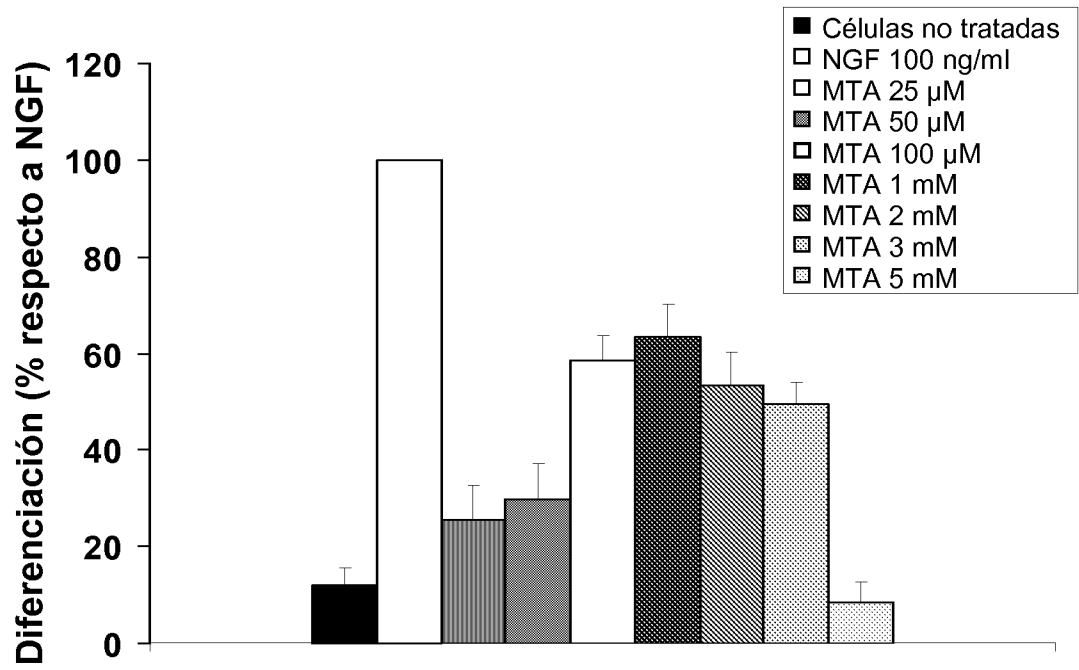


Figura 21A

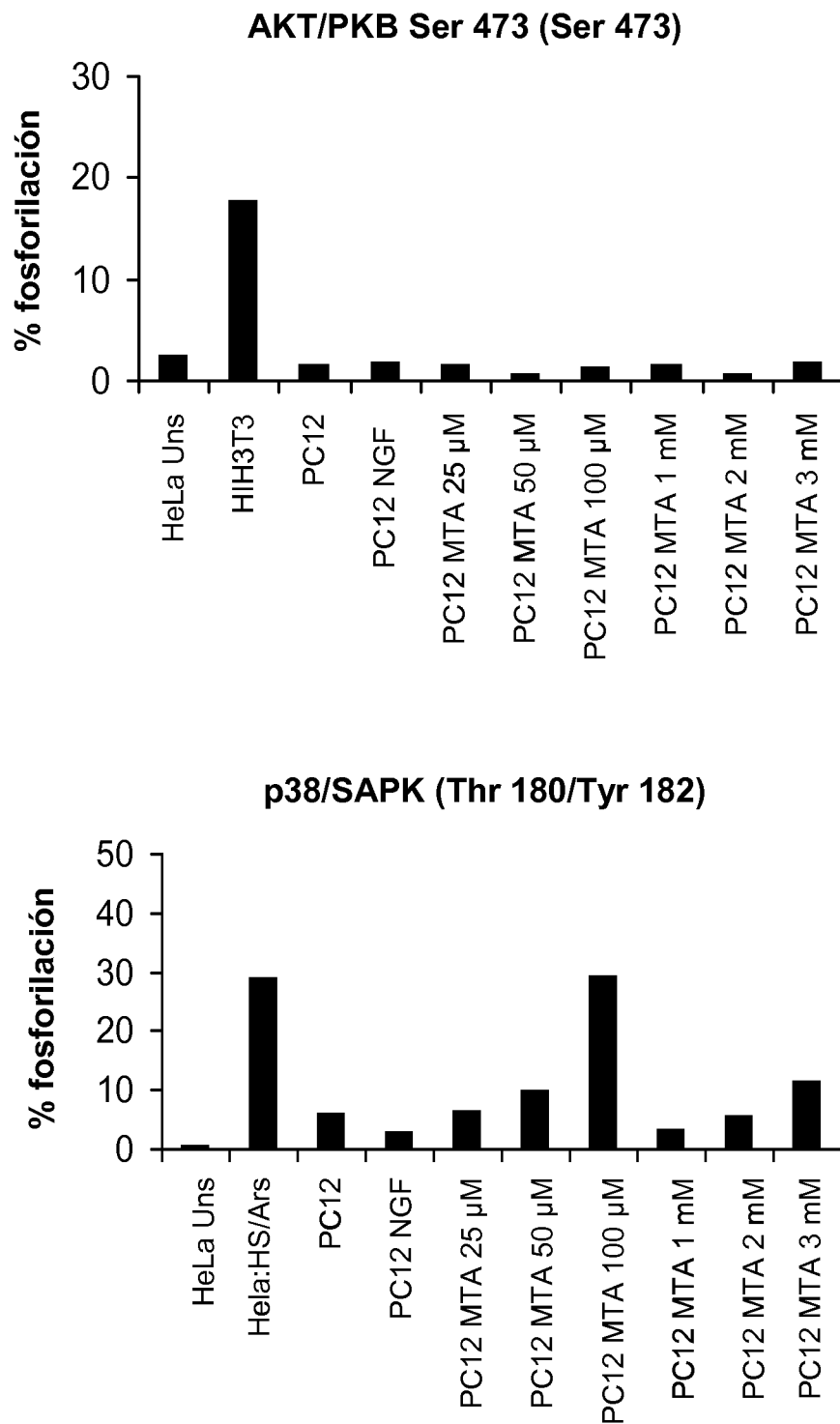


Figura 21B

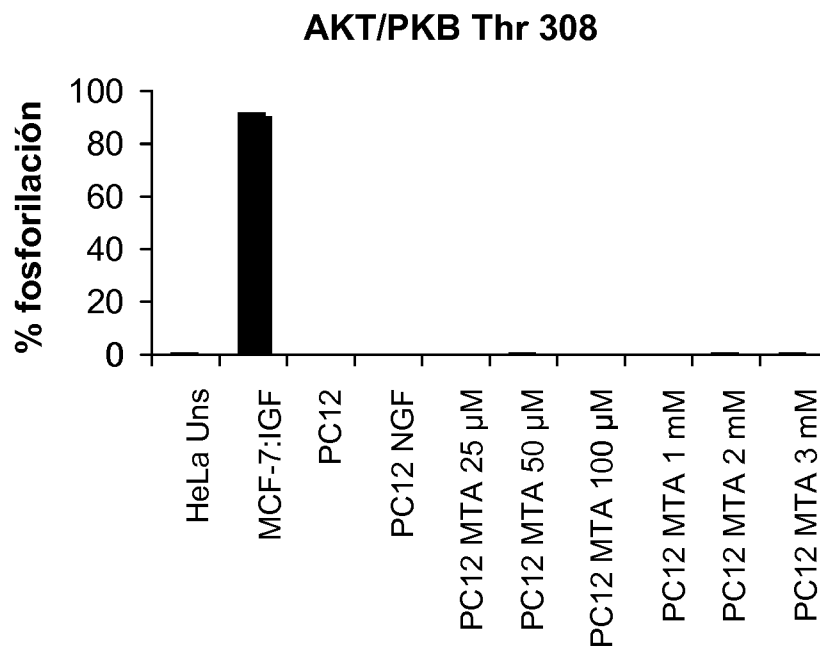
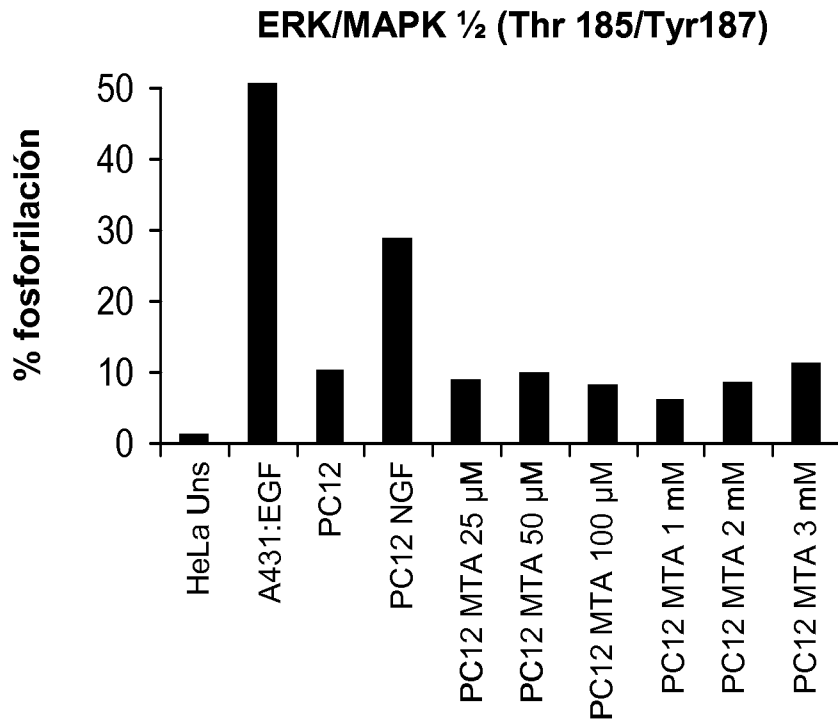


Figura 21C

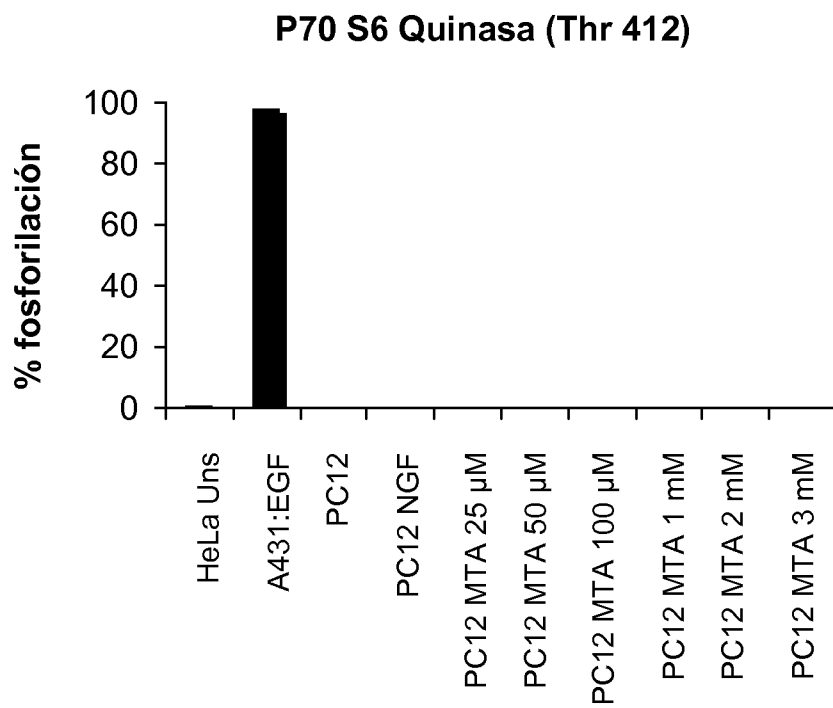
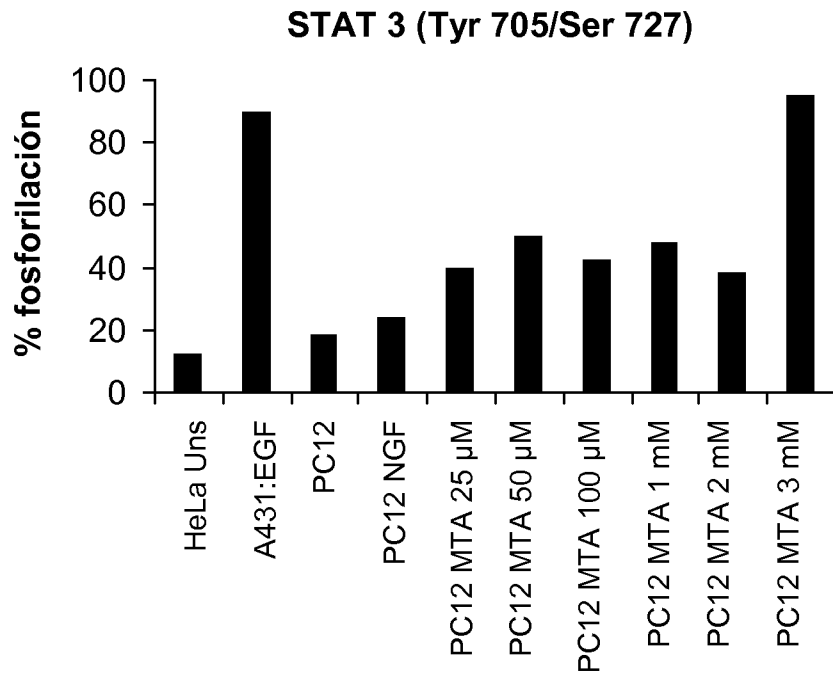


Figura 22

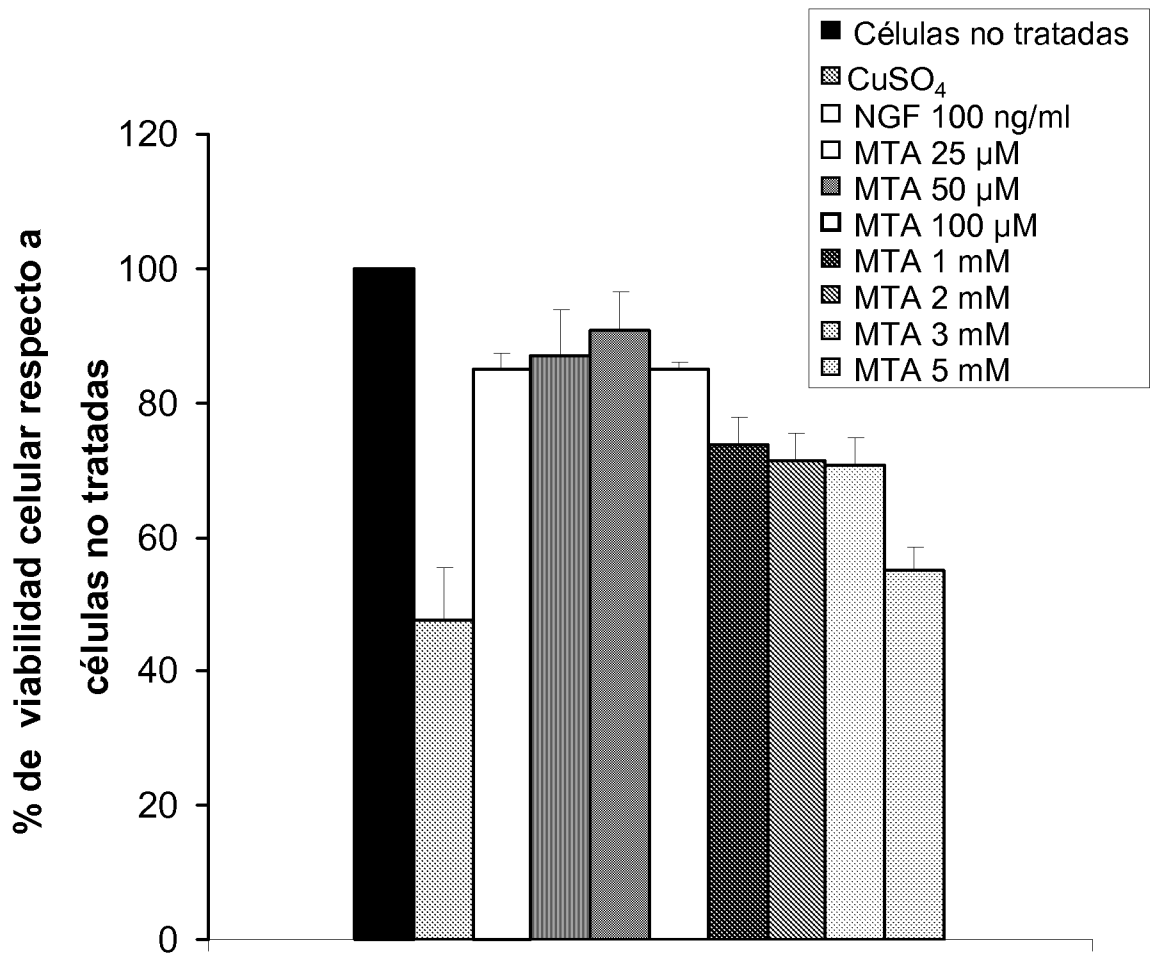


Figura 23

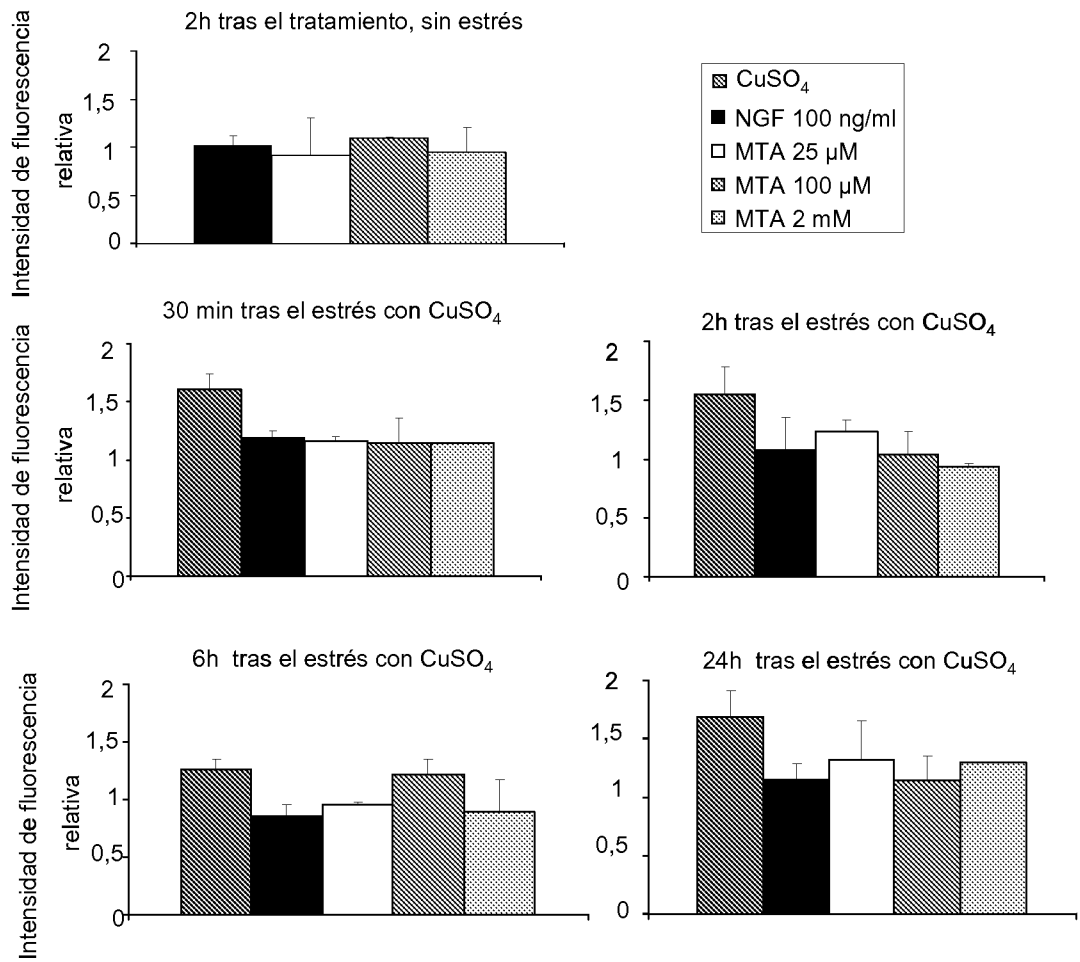


Figura 24

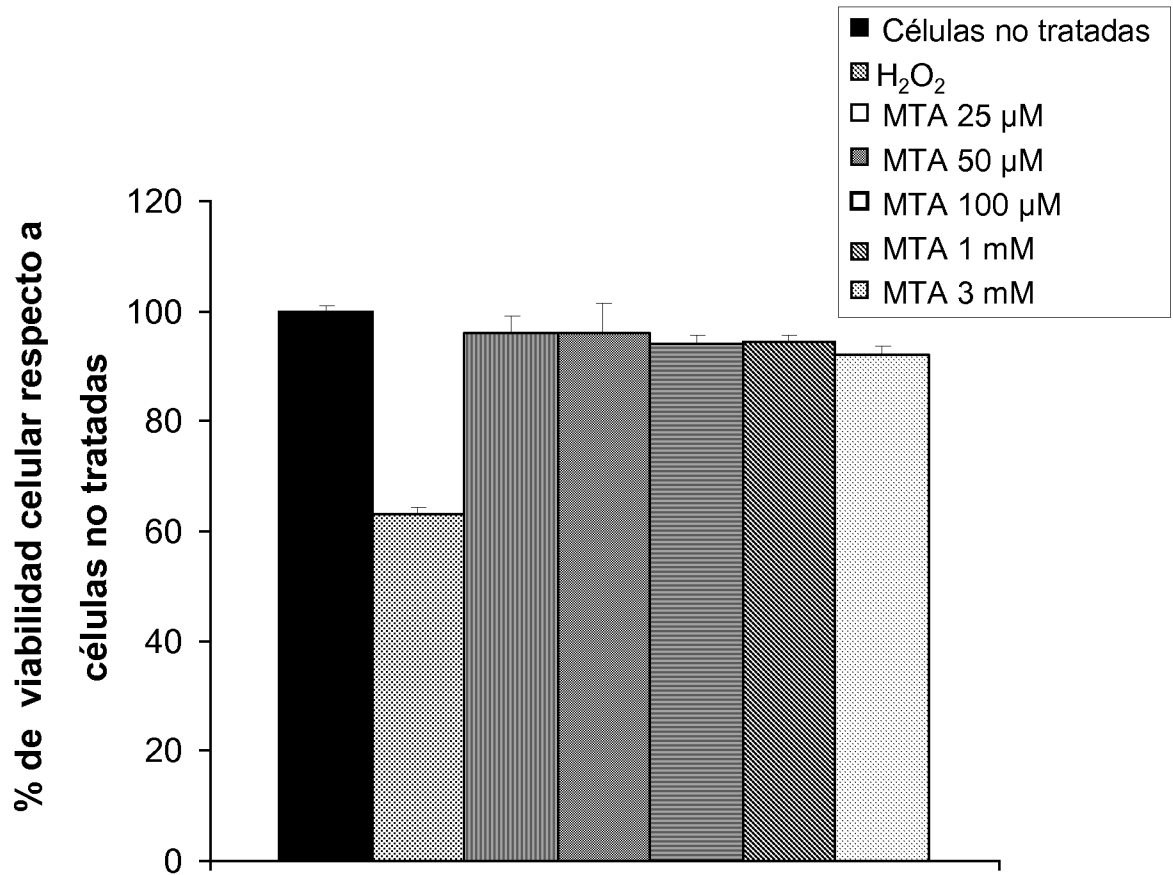
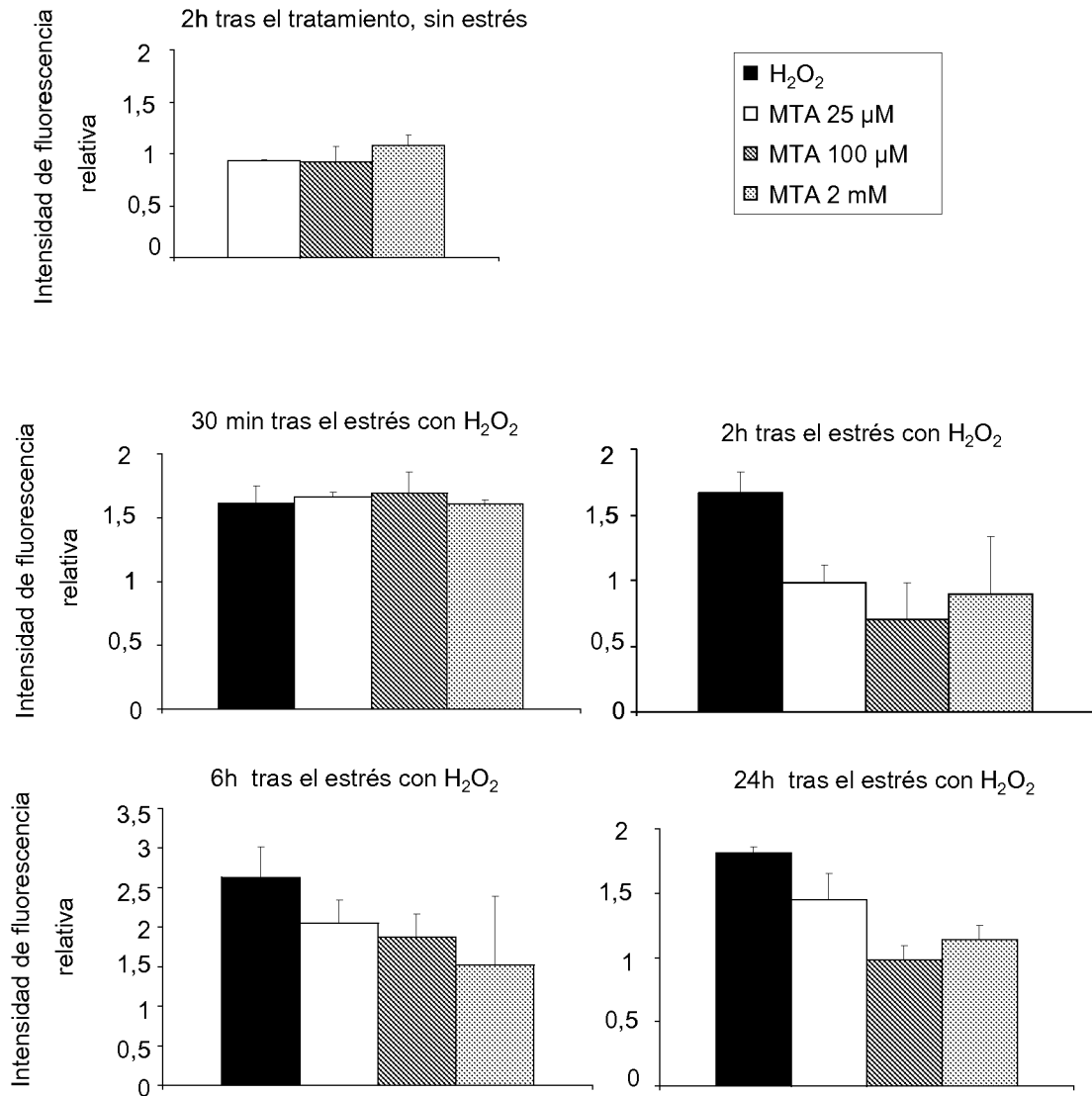


Figura 25



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2010/070374

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/7076 A61P25/00 A61P25/28
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/136454 A2 (PLT PATENT & LICENCE TRADING L [GB]; WOLF HANS UWE [DE]; WILHELM CHRIS) 28 December 2006 (2006-12-28) claims 1,14	1-16
X	EP 1 891 961 A1 (PROYECTO BIOMEDICINA CIMA SL [ES]) 27 February 2008 (2008-02-27) page 9, paragraph 67 - page 10, paragraph 71 claims 1-4	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 August 2010

Date of mailing of the international search report

24/08/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nyeki, Agnes

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2010/070374

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MIYAJI KATSUYA ET AL: "Inhibition by 5'-methylthioadenosine of cell growth and tyrosine kinase activity stimulated by fibroblast growth factor receptor in human gliomas"</p> <p>JOURNAL OF NEUROSURGERY, AMERICAN ASSOCIATION OF NEUROLOGICAL SURGEONS, US, vol. 83, no. 4, 1 October 1995 (1995-10-01), pages 690-697, XP009137491 ISSN: 0022-3085 * abstract page 693, left-hand column, paragraph 2</p>	1-16
X	<p>SHEA THOMAS B ET AL: "S-adenosyl methionine: A natural therapeutic agent effective against multiple hallmarks and risk factors associated with Alzheimer's Disease"</p> <p>JOURNAL OF ALZHEIMER'S DISEASE, IOS PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 13, no. 1, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 67-70, XP009137483 ISSN: 1387-2877 the whole document</p>	1-16
X	<p>MICHAEL SERRA ET AL: "COMMUNICATION; Folate and S-adenosylmethionine modulate synaptic activity in cultured cortical neurons: acute differential impact on normal and apolipoprotein-deficient mice"</p> <p>PHYSICAL BIOLOGY, INSTITUTE OF PHYSICS PUBLISHING, BRISTOL, GB LNKD-DOI:10.1088/1478-3975/5/4/044002, vol. 5, no. 4, 1 December 2008 (2008-12-01), page 44002, XP020146869 ISSN: 1478-3975 the whole document</p>	1-16
X,P	<p>WO 2009/115634 A1 (PROYECTO BIOMEDICINA CIMA SL) 24 September 2009 (2009-09-24) * abstract claims 1-12</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2010/070374

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	VILLOSLADA PABLO ET AL: "Neuroprotective Activity of Methylthioadenosine for the Treatment of Multiple Sclerosis and Other Neurological Diseases" NEUROLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, PHILADELPHIA, US, vol. 74, no. 9, Suppl. 2, 1 March 2010 (2010-03-01), page A483, XP009137493 ISSN: 0028-3878 * abstract -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2010/070374

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006136454 A2	28-12-2006	DE 102005029468 A1 EP 1917006 A2 US 2010143322 A1	28-12-2006 07-05-2008 10-06-2010
EP 1891961 A1	27-02-2008	AT 442854 T AU 2005329287 A1 BR PI0520129 A2 CA 2601557 A1 CN 101141970 A DK 1891961 T3 ES 2334924 T3 WO 2006097547 A1 JP 2008533107 T PT 1891961 E SI 1891961 T1 US 2009042831 A1	15-10-2009 21-09-2006 28-04-2009 21-09-2006 12-03-2008 21-12-2009 17-03-2010 21-09-2006 21-08-2008 17-12-2009 29-01-2010 12-02-2009
WO 2009115634 A1	24-09-2009	ES 2329327 A1	24-11-2009

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070374

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/7076 A61P25/00 A61P25/28

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) **EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data**

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	WO 2006/136454 A2 (PLT PATENT & LICENCE TRADING L [GB]; WOLF HANS UWE [DE]; WILHELM CHRIS) 28 diciembre 2006 (2006-12-28) reivindicaciones 1, 14	1-16
X	EP 1 891 961 A1 (PROYECTO BIOMEDICINA CIMA SL [ES]) 27 febrero 2008 (2008-02-27) página 9, párrafo 67 - página 10, párrafo 71 reivindicaciones 1-4	1-16

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional 13 agosto 2010 (13.08.2010)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 24 agosto 2010 (24.08.2010)
--	---

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional <p style="text-align: center;">OEP</p>	Funcionario autorizado
N° de fax	N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070374

C (continuación).	DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES	
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	<p>MIYAJI KATSUYA ET AL: "Inhibition by 5'-methylthioadenosine of cell growth and tyrosine kinase activity stimulated by fibroblast growth factor receptor in human gliomas"</p> <p>JOURNAL OF NEUROSURGERY, AMERICAN ASSOCIATION OF NEUROLOGICAL SURGEONS, US, vol. 83, no. 4, 1 octubre 1995 (1995-10-01), páginas 690-697, XP009137491 ISSN: 0022-3085</p> <p>* resumen página 693, columna mano derecha, párrafo 2</p>	1-16
X	<p>SHEA THOMAS B ET AL: "S-adenosyl methionine: A natural therapeutic agent effective against multiple hallmarks and risk factors associated with Alzheimer's Disease"</p> <p>JOURNAL OF ALZHEIMER'S DISEASE, IOS PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 13, no. 1, 1 enero 2008 (2008-01-01), páginas 67-70, XP009137483 ISSN: 1387-2877</p> <p>todo el documento</p>	1-16
X	<p>MICHAEL SERRA ET AL: "COMMUNICATION; Folate and S-adenosylmethionine modulate synaptic activity in cultured cortical neurons: acute differential impact on normal and apolipoprotein-deficient mice"</p> <p>PHYSICAL BIOLOGY, INSTITUTE OF PHYSICS PUBLISHING, BRISTOL, GB LNKD-DOI : 10.1088/1478-3975/5/4/044002 , vol. 5, no. 4, 1 diciembre 2008 (2008-12-01), página 44002, XP020146869 ISSN: 1478-3975</p> <p>todo el documento</p>	1-16
X,P	<p>WO 2009/115634 A1 (PROYECTO BIOMEDICINA CIMA SL) 24 septiembre 2009 (2009-09-24)</p> <p>* resumen reivindicaciones 1-12</p>	1-16

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070374

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X, P	VILLOSLADA PABLO ET AL: "Neuroprotective Activity of Methyl thioadenosine for the Treatment of Multiple Sclerosis and Other Neurological Diseases" NEUROLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, PHILADELPHIA, US, vol. 74, no. 9, Suppl .2, 1 marzo 2010 (2010-03-01), página A483, XP009137493 ISSN: 0028-3878 * resumen	1-16

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070374

WO 2006136454	A2	28-12-2006	DE 102005029468	A1	28-12-2006
			EP 1917006	A2	07-05-2008
			US 2010143322	A1	10-06-2010

EP 1891961	A1	27-02-2008	AT 442854	T	15-10-2009
			AU 2005329287	A1	21-09-2006
			BR PI0520129	A2	28-04-2009
			CA 2601557	A1	21-09-2006
			CN 101141970	A	12-03-2008
			DK 1891961	T3	21-12-2009
			ES 2334924	T3	17-03-2010
			WO 2006097547	A1	21-09-2006
			JP 2008533107	T	21-08-2008
			PT 1891961	E	17-12-2009
			SI 1891961	T1	29-01-2010
			US 2009042831	A1	12-02-2009

WO 2009115634	A1	24-09-2009	ES 2329327	A1	24-11-2009
