



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 311 626**

51 Int. Cl.:
A61K 31/517 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02769372 .0**
96 Fecha de presentación : **08.05.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1385523**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2004**

54 Título: **Antagonistas del receptor de adenosina A1 para el tratamiento de trastornos de memoria y de aprendizaje inducidos por hipoxia.**

30 Prioridad: **08.05.2001 US 289137 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

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

73 Titular/es:
**Blanchette Rockefeller Neurosciences Institute
9601 Medical Center Drive
Rockville, Maryland 20850, US**

72 Inventor/es: **Sun, Miao-Kun y
Alkon, Daniel, L.**

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 311 626 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Antagonistas del receptor de adenosina A1 para el tratamiento de trastornos de memoria y de aprendizaje inducidos por hipoxia.

La presente solicitud reivindica los beneficios de la solicitud provisional USSN 60/289.137, solicitada el 8 de mayo del 2001, incorporada en la presente como referencia.

Sector técnico de la invención

La presente invención se refiere a una formulación terapéutica para el tratamiento o la prevención de la pérdida de memoria producida por una disfunción sináptica inducida y asociada por una hipoxia reversible transitoria que comprende la administración de un antagonista del receptor de adenosina A1.

Antecedentes

La hipoxia y la apoplejía isquémica siguen siendo una de las amenazas más devastadoras para el ser humano. Los trastornos de memoria son comunes después de una isquemia/hipoxia cerebral, cirugía con bypass o ataque cardíaco¹. Aunque todas las células mamíferas pueden detectar y responderán a una hipoxia^{2,3}, las células piramidales del hipocampo CA1 están entre las más sensibles, sino las que más. Las consecuencias hipóxicas/isquémicas consisten principalmente en tres formas: alteraciones funcionales, daño celular y pérdida celular retardada a través de la apoptosis⁴ o necrosis, dependiendo de la gravedad de la lesión. Cada forma tiene una caracterización patofisiológica diferente y requiere diferentes productos terapéuticos.

Es conocido que un antagonista del receptor de adenosina A1 selectivo, DPCPX, mitiga la acumulación de adenosina inducida por una hipoxia durante hipoxia. Pearson T. y otros, Eur. J. Neurosci. 2000, 12(8): 3064-6. La adenosina suprime las respuestas sinápticas en el hipocampo de ratas durante la hipoxia, y esa supresión se invirtió mediante el uso de un antagonista A1. Arlinghaus y otros, Brain Res. 1996, 724 (2): 265-8. La mediación por adenosina de la liberación de glutamato sináptico en neuronas piramidales CA1 inducida por anoxia no estaba afectada por DPCX. Katchman y otros, Hippocampus 1996, 6(3): 213-24, y la patente de Estados Unidos 6.166.181. Otro antagonista bloqueó la depresión inducida por la hipoxia de la transmisión sináptica en neuronas CA1. Doolette y otros, Brain Res. 1995, 677 (1): 127-37. Estas referencias no demuestran o dan a conocer ningún efecto de hipoxia sobre el ritmo teta del hipocampo, la atención, el aprendizaje o la memoria, o un efecto de bloqueo de los receptores de adenosina A1 de CA1 en la prevención de la pérdida de memoria inducida por hipoxia.

El aprendizaje y la memoria espacial dependen del procesamiento de la información por las redes del hipocampo, cuya función es extremadamente sensible a la hipoxia leve y la isquemia transitoria. Sin embargo, a pesar de una intensa investigación dirigida al desarrollo de intervenciones terapéuticas eficaces, aún existe una falta de terapia prometedora. La presente invención demuestra que la hipoxia reversible transitoria reduce la actividad θ colinérgica y la "interrupción" sináptica asociada en CA1 del hipocampo y que estas respuestas se podían prevenir por el antagonista del receptor de adenosina A₁. Los episodios hipóxicos breves afectaban notablemente en la capacidad de las ratas en un laberinto de agua de Morris para el aprendizaje y memoria espacial. Este deterioro se evita mediante el antagonista del receptor de adenosina A₁. Esta protección de la eficacia sináptica representa una estrategia terapéutica eficaz para eliminar la alteración funcional debido a episodios hipóxicos breves. Además, la presente invención da a conocer una molécula con un log P elevado y que penetra fácilmente en el sistema nervioso central o se puede transferir o "quedar atrapada" en el cerebro mediante el uso de una técnica de profármacos.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una formulación terapéutica que comprende una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un antagonista de adenosina A-1, liberando la composición el antagonista a través de la barrera hematoencefálica, sin causar la composición ningún efecto secundario indeseado en concentraciones eficaces para bloquear las lesiones relacionadas con el aprendizaje y/o la pérdida de memoria causadas por la hipoxia. La presente invención también se refiere a un artículo de fabricación que consiste esencialmente en una composición farmacéuticamente aceptable, envasada junto con las instrucciones que indican su uso en relación con la mitigación de lesiones inducidas por hipoxia. El antagonista del receptor de adenosina A1 puede ser 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (CPDPX). La formulación puede comprender una combinación de antagonista de adenosina A-1 con un agente que invierte el daño celular y/o evita la pérdida celular.

La presente invención se refiere a un método de identificación de compuestos antagonista A-1 terapéuticos útiles para el tratamiento de la pérdida de memoria relacionada con la hipoxia que comprende: disponer de tejido cerebral bajo condiciones controladas que modelan la actividad teta, colocar el tejido en condiciones de hipoxia que provocan la interrupción sináptica y la pérdida de actividad teta, administrar un compuesto candidato antagonista de A-1 al tejido cerebral en condiciones de hipoxia, y determinar si el compuesto candidato evita la interrupción sináptica del tejido cerebral y/o mantiene la actividad teta. El tejido cerebral puede comprender células piramidales CA1.

Otros objetivos y ventajas serán evidentes tras considerar la descripción, los dibujos y los ejemplos.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entiende mejor mediante la lectura de la siguiente descripción detallada con referencia a las figuras que se acompañan:

5 Las figuras 1a-1, 1a-2, 1a-3, 1b-1, 1b-2, 1b-3, 1c, 1d y 1e muestran los efectos diferenciales de hipoxia breve en θ colinérgica de CA1 y una potenciación a largo plazo de los EPSP de Sch-CA1. Ejemplos de potenciales de campo registrados: control pre-carbacol (figura 1a-1), durante la aplicación de carbacol ($50 \mu\text{M}$, 30 min; figura 1a-2) y 10 minutos después de la hipoxia breve (5% de O_2 durante 3 min; figura 1a-3). Trazos del potencial de membrana de células piramidales CA1 registradas: pre-carbacol (control; figura 1b-1), durante la aplicación de carbacol ($50 \mu\text{M}$, 30 min; figura 1b-2) y 10 minutos después de la hipoxia breve (5% de O_2 durante 3 min; figura 1b-3). La membrana se mantuvo al nivel de pre-carbacol mediante el paso de corriente negativa (el segundo trazo). Los trazos representativos de EPSP de Sch-CA1 (figura 1c) de post-HFS (LTP, 40 minutos después de HFS) y pre-HFS (Control). Los trazos representativos de EPSP de Sch-CA1 (figura 1d) de pre-HFS (control), post-HFS (LTP, después de 29 minutos después de HFS) e inmediatamente después de hipoxia breve (5% de O_2 durante 3 minutos). La figura 1e representa la evolución con el tiempo de EPSP de Sch-CA1 en respuesta a HFS (en la primera flecha) e hipoxia breve (en la segunda flecha). Los puntos de los datos significan la media \pm S.E. de la media. Los EPSP evocaron a 1/min. Por claridad, sólo se muestran cada dos puntos ■: control; ●: 5% O_2 durante 3 minutos.

20 Las figuras 2a, 2b, 2c y 2d muestran la interrupción sináptica producida por una hipoxia breve sin causar una pérdida celular obvia. Los EPSPs (figura 2a) y EPSCs (figura 2b) de Sch-CA1 se eliminaron brevemente al final de la hipoxia breve (5% O_2 durante 3 minutos), en comparación con los del siguiente trazo (Recuperación) y de prehipoxia (Control). Los trazos representativos de la respuesta de la membrana a la aplicación local de glutamato (Glut; $20 \mu\text{l}$ de 10 mM) antes (figura 2c) y al final de una hipoxia breve (figura 2d); con aplicación de glutamato ($20 \mu\text{l}$ de 10 mM) aproximadamente 0,5 s antes del final de los 3 minutos de hipoxia, de manera que el máximo estaba aproximadamente al final de los 3 minutos). Las secciones coronales del campo dorsal de CA1 teñidos con Nissl revelaron células piramidales densamente empaquetadas con núcleos bien definidos en ratas de control y ratas sometidas a 8 episodios de hipoxia breve (no mostrados). Las figuras 3a, 3b, 3c-a, 3c-2, 3c-3, 3d-1, 3d-2 y 3d-3 muestran los efectos del antagonista de receptor de adenosina A_1 en la interrupción sináptica, θ de CA1, en respuesta a una hipoxia breve. En presencia de citicolina ($100 \mu\text{M}$), se observó la interrupción sináptica al final de los 3 minutos de hipoxia (figura 3a). En presencia de 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina ($10 \mu\text{M}$) se eliminó la interrupción sináptica (figura 3b) y la hipoxia breve no eliminó ni la θ colinérgica de CA1 (figuras 3c-1-3) ni θ intracelular colinérgica de las células piramidales CA1 (figuras 3d-1-3).

35 Las figuras 4a, 4b, 4c, 4d, 4e y 4f muestran los efectos de la hipoxia breve y el antagonista del receptor de adenosina A_1 en la acción de ratas en la tarea del laberinto acuático con plataforma escondida. La figura ilustra el protocolo experimental (figura 4a), la latencia de escape (media \pm SEM) en el entrenamiento del laberinto acuático (figura 4b) a lo largo de 12 pruebas ($F_{11,312} = 50,14$, $p < 0,0001$), y la preferencia de cuadrante (figuras 4c, 4d y 4e) realizada al final de la duodécima sesión de entrenamiento, y la distancia nadada (en 1 minuto; figura 4f). Las ratas se sometieron a aire o a hipoxia (95% N_2 /5% CO_2 durante 100 segundos) aproximadamente 30 minutos en un bote de vidrio después de la 2ª o la 4ª prueba del día. Se administraron CPDPX (400 nmoles/sitio) o vehículo i.c.v. bilateral antes de la 2ª y la 4ª prueba del día. El cuadrante 4 es el cuadrante objetivo durante el entrenamiento.

Descripción detallada

45 Al describir las realizaciones preferentes de la presente invención, por claridad se utiliza terminología específica.

La presente invención da a conocer composiciones terapéuticas dirigidas a lesiones inducidas por hipoxia que conducen a una pérdida de memoria. Estas lesiones tienen aspectos bioquímicos, fisiológicos y cognitivos, todos ellos relacionados y se pueden considerar como dianas sujetas a terapia según la presente invención. La diana bioquímica para los métodos y formulaciones de la presente invención es el receptor de adenosina A_1 en neuronas asociadas con la memoria y el aprendizaje, en particular aquellas que están afectadas por hipoxia. Los receptores de reconocimiento responden a señales de adenosina durante la hipoxia en una cascada que causa la interrupción sináptica y trastornos de memoria, sin daño o muerte celular.

55 El aspecto fisiológico de lesiones reconocidas por la invención es la condición reversible de interrupción sináptica y reducción de la inducción colinérgica teta de la red de neuronas CA1. Esta red incluye neuronas piramidales CA1 y otras implicadas en la generación de actividad teta estable y sometidas a interrupción sináptica durante la hipoxia. Durante la misma, se eliminan los EPSPs y EPSCs, la red neuronal de CA1 se desconecta y la actividad teta se pierde reversiblemente hasta que se aplica oxígeno de nuevo.

65 Las lesiones cognitivas/de comportamiento sometidas a terapia se pueden caracterizar en general como un trastorno de la atención, trastorno del aprendizaje, trastorno de la memoria, incluyendo amnesia, la pérdida de memoria, retención de memoria y aprendizaje incluyendo aprendizaje espacial. El trastorno puede ser súbito como en la hipoxia transitoria, o a largo plazo y gradual, o ambos, tal como puede suceder con incidentes repetidos de hipoxia transitoria. Dichos incidentes crónicos o repetidos pueden conducir también a otras lesiones.

ES 2 311 626 T3

Los sujetos con necesidad de terapia son aquellos expuestos a hipoxia de cualquier origen. En general, los sujetos para terapia son aquellos con riesgo para la hipoxia, incluyendo personas mayores, personas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, personas para cirugía, aquellas con riesgo de apoplejía, y otros que padecen enfermedades que los predisponen a hipoxia. La hipoxia induce muchas lesiones en sujetos, incluyendo muerte celular y una amplia variedad de disfunciones sinápticas. Los sujetos con necesidad de terapia son aquellos que se enfrentan a una anomalía en el ritmo teta inducido por hipoxia y pérdida de memoria.

Sólo aquella disfunción sináptica asociada con la pérdida de memoria se somete a terapia en la presente invención, y otros efectos de la hipoxia no se someten a tratamiento según la presente invención. Por ejemplo, la hipoxia interfiere con la potenciación a largo plazo (PLT), pero el tratamiento con un antagonista de receptores de adenosina A1 no mitiga esa interferencia. No era predecible que los antagonistas de A1 funcionaran en neuronas CA1 y/o en otras implicadas en la generación de actividad teta y el soporte de la retención de memoria.

La hipoxia sometida a terapia es leve, es decir, causa efectos reversibles, pero suficientes para interrumpir la actividad teta y/o teta intracelular, sin causar pérdida celular. La hipoxia sometida a terapia causa niveles bajos de oxígeno en el cerebro, pero no muerte celular sustancial inmediata. Las causas de la hipoxia que inducen las lesiones reconocidas por la invención incluyen sucesos traumáticos, ataques isquémicos transitorios, hipoxia relacionada con cirugía, enfermedad pulmonar obstructiva aguda y/o crónica, infecciones del sistema nervioso central, tales como meningitis, encefalitis y/u otras lesiones traumáticas del sistema nervioso central.

Los episodios hipóxicos repetitivos del tipo sujeto a terapia se pueden asociar con la neurodegeneración y/o preceder a la misma en el tiempo. Dichos trastornos incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la demencia pugilística o demencia.

La presente invención reduce o elimina las lesiones inducidas por hipoxia. La terapia de la presente invención bloquea los receptores de adenosina A1 en las neuronas reconocidas. Este bloqueo protege y aumenta la eficacia sináptica y elimina la interrupción o reduce la disfunción sináptica a la que se hace referencia como interrupción sináptica que conduce a la pérdida del ritmo teta estable. Los métodos y composiciones dan a conocer una terapia para una enfermedad de trastorno de la memoria en un sujeto expuesto a hipoxia, tratan o previenen la pérdida de memoria, bloqueando o mitigando la extensión del daño cognitivo.

La terapia significa administrar un antagonista de receptor de adenosina A1 a neuronas implicadas en la generación de ritmo teta en una cantidad eficaz para prevenir la interrupción sináptica inducida por hipoxia. El antagonista debe administrarse en una dosis y manera eficaces para atravesar la barrera hematoencefálica para proporcionar un efecto de bloqueo en el momento necesario, es decir, durante hipoxia.

Un aspecto de la presente invención se refiere a la reducción de los efectos de la hipoxia transitoria reversible y asociada a la disfunción sináptica. Los efectos de la hipoxia según la presente invención pueden implicar reducciones de aproximadamente 50% a aproximadamente 95%, por ejemplo aproximadamente 75%, aproximadamente 80% o aproximadamente 90% de transmisión sináptica, actividad teta y/o actividad teta intracelular. Utilizando un antagonista de receptor de adenosina A1 según la presente invención se pueden mitigar los efectos de la hipoxia mediante la restauración de aproximadamente 75% a aproximadamente 100%, por ejemplo, aproximadamente 80, 90, 95 ó 99% de los niveles de prehipoxia para la transmisión sináptica y/o la actividad teta y la actividad teta intracelular.

Las formulaciones de la presente invención son composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden antagonistas de adenosina A-1. Particularmente útiles en la presente invención son aquellos antagonistas que pueden atravesar la barrera hematoencefálica y no provocan ningún efecto lateral no deseado en concentraciones eficaces para bloquear lesiones asociadas a pérdidas de memoria causadas por hipoxia. Según la presente invención, se da a conocer un producto comercial que consiste esencialmente en dicha composición farmacéuticamente aceptable envasada junto con instrucciones que indican el uso en relación con la mitigación de lesiones inducidas por hipoxia.

La presente invención da a conocer un método para mitigar la pérdida de memoria inducida por hipoxia en un sujeto expuesto a hipoxia, que comprende la administración al sujeto de un antagonista de receptor de adenosina A1 en una cantidad eficaz para evitar la interrupción sináptica que conduce a la pérdida de ritmo teta. La presente invención da a conocer un método para prevenir la interrupción sináptica reversible inducida por hipoxia en un sujeto mediante el bloqueo de receptores de adenosina A1 en el cerebro del sujeto.

El método de tratamiento de un trastorno neurodegenerativo comprende la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de receptor de adenosina A1 (en combinación con una cantidad eficaz de un agente que invierte el daño celular y previene la pérdida celular). La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un antagonista de receptor de adenosina A1 y un portador farmacéuticamente aceptable, liberando la composición el antagonista a través de la barrera hematoencefálica. En otra realización, la presente invención se refiere a un método de mantenimiento de la actividad teta durante la hipoxia, que comprende la administración de un antagonista de adenosina A1 al cerebro en una cantidad eficaz. Otro aspecto se refiere a un método de prevención o inversión de la interrupción sináptica de neuronas CA1 debido a hipoxia en ausencia de daño celular.

La hipoxia breve daña el funcionamiento de la transmisión sináptica de neuronas CA1, el potenciamiento a largo plazo (LTP) de los EPSPs glutamatergicos, y θ colinérgico, una sincronización de la actividad neuronal relacionada

ES 2 311 626 T3

con la memoria que depende de una interacción heterosináptica temporal⁵. Además, la hipoxia breve bloquea la transmisión sináptica⁶ de entradas (“inputs”) glutamatergicas, entradas GABAérgicas y entradas colinérgicas, causando la desconexión, o interrupción “sináptica”, de la red neuronal CA1. Muchas de estas entradas y su interacción juegan un papel esencial en aumentar la eficacia sináptica en el aprendizaje y memoria.

5 En experimentos realizados por lo inventores, la hipoxia breve eliminó temporalmente los EPSPs y EPSCs. La “interrupción” sináptica desapareció inmediatamente cuando se inició la reoxigenación y no se produjo después de la transmisión postsináptica. La “interrupción” sináptica hipóxica y la reducción en la inducción θ colinérgica se evitaban mediante el bloqueo de los receptores de adenosina A_1 . Por otro lado, la aplicación de citicolina, una sustancia neuroprotectora, es ineficaz, lo cual sugiere que no hay daño celular implicado.

10 En presencia de 8-pentil-1,3-dipropilxantina (CPDPX), un antagonista selectivo de receptor de adenosina A_1 , la transmisión sináptica permaneció intacta al final de la hipoxia. Ni la actividad θ ni la θ intracelular fueron afectadas por la hipoxia breve.

15 Los presentes inventores han demostrado que un antagonista selectivo del receptor de adenosina A_1 , tal como 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (CPDPX), se puede utilizar para eliminar el daño funcional asociado con la pérdida de memoria inducida por hipoxia transitoria y asociada a disfunción sináptica. Esto se puede conseguir mediante la mitigación de la “interrupción” heterosináptica en la red bloqueando los receptores de adenosina A_1 .

20 La presente invención comprende además la combinación del antagonista selectivo del receptor de adenosina A_1 con agentes que invierten el daño celular y previenen la pérdida celular. Además, los antagonistas también podrían ser válidos en la terapia contra una pérdida de memoria inducida por una hipoxia/isquemia severa.

25 La presente invención se utiliza para tratar trastornos de neurotransmisión alterada mediante la administración de un antagonista selectivo de receptor de adenosina A_1 en cantidades eficaces. Dichos trastornos pueden incluir traumatismo cerebral o lesión de la médula espinal o una enfermedad neurológica o neuromuscular, tal como miastenia gravis, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, o trastornos espinales. Además, la presente invención da a conocer una composición farmacéutica y un portador farmacéuticamente aceptable.

30 Los métodos generales para el bloqueo de receptores de adenosina A_1 son bien conocidos. Muchos antagonistas de adenosina A_1 son conocidos y las personas expertas en la materia pueden identificar más mediante métodos de cribado convencionales. Véase, la Patente de Estados Unidos No. 6.166.181 de Jacobson y otros, y Joel Linden, *Structure and Function of A_1 adenosine receptors*, The FASEB Journal, V5: 2668-2676 (Septiembre 1991), incorporado en la presente invención por referencia en su totalidad. Algunos ejemplos particulares de antagonistas de adenosina A_1 son 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (CPDPX), 1,3-dietil-8-fenilxantina (DPX), 8-(p-sulfofenil)teofilina, BWA-844U, XAC, CGS-15943, BWA-1433U, CP-68.247, XCC, 8-PT, DPSPX, y CP-66.713.

35 Métodos terapéuticos de administración de una composición farmacéutica al cerebro de un sujeto expuesto a hipoxia. Las composiciones químicas útiles en la presente invención se pueden “convertir” en composiciones farmacéuticas mediante la disolución en, y/o la adición de, portadores o diluyentes adecuados farmacéuticamente aceptables. De este modo, las composiciones se pueden formular en preparados sólidos, semisólidos, líquidos o gaseosos, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyectables, inhalantes y aerosoles, utilizando medios convencionales. Se utilizan métodos conocidos para evitar la liberación o absorción del principio o agente activo hasta que alcance las células u órgano diana o para asegurar la liberación con el tiempo del agente. Una forma farmacéuticamente aceptable es aquella que no inactiva o desnaturaliza el agente activo. En las formas de dosificación farmacéuticas útiles en la presente invención, las presentes composiciones se pueden utilizar solas o en asociación o combinación apropiadas con otros compuestos farmacéuticamente activos.

40 Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar a cualquiera de una serie de sitios de un sujeto y, de este modo, se libera a través de una serie de vías para conseguir el efecto deseado. La liberación local o sistémica se lleva a cabo mediante la administración de la composición farmacéutica a través de inyección, infusión o centelleo en una parte del cuerpo o cavidad corporal, o mediante ingestión, inhalación o insuflación de un aerosol. Entre las vías de administración preferentes se incluyen administración parenteral, que incluye intramuscular, intracraneal, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica o vías habituales.

45 Las composiciones de la invención se pueden disponer en forma de dosificación unitaria, en la que cada unidad de dosificación, por ejemplo, una cucharadita, un comprimido, un volumen fijo de solución inyectable, o un supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición, sola o en combinación apropiada con otros agentes farmacéuticamente activos. El término “forma de dosificación unitaria” se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para un sujeto humano o animal, conteniendo cada unidad, tal como se ha indicado anteriormente, una cantidad predeterminada de la presente composición farmacéutica o una combinación en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado. En una unidad de dosificación se puede utilizar cualquier diluyente o portador farmacéuticamente aceptable en una unidad de dosificación, por ejemplo, un portador líquido, tal como una solución salina, una solución tampón, u otra solución acuosa fisiológicamente aceptable), o un vehículo. Las especificaciones para las nuevas formas de dosificación unitarias de la presente invención dependen del efecto particular a conseguir y las propiedades farmacodinámicas particulares de la composición farmacéutica en el huésped particular.

Una “cantidad efectiva” de una composición es una cantidad que produce el efecto deseado en un huésped, cuyo efecto se puede controlar utilizando cualquier punto final conocido para un experto en la materia. Los métodos descritos en la presente invención no pretenden incluir todos los posibles y en su lugar se pueden utilizar métodos adicionales conocidos por un experto en la materia.

Se puede obtener tejido cerebral *in situ* (en el cerebro de un sujeto) o *in vitro* (una biopsia o trozo de tejido cerebral) según la presente invención bajo condiciones controladas que modelan la actividad teta. Además, la cantidad de cada agente activo indicado como ejemplo en la presente invención pretende proporcionar una guía general del intervalo de cada componente que se puede utilizar por el médico después de la optimización de estos métodos para la práctica *in vitro* o *in vivo*. Además, los intervalos de las dosis de ejemplo no excluyen el uso de dosis superiores o inferiores que podrían justificarse para una aplicación particular. Por ejemplo, la dosis y pauta real pueden variar dependiendo de (a) si una composición se administra combinadas con otras composiciones farmacéuticas, o (b) diferencias entre individuos en la farmacocinética, disposición de fármacos y metabolismo. De manera similar, las cantidades pueden variar para las aplicaciones *in vitro*. Un experto en la materia puede hacer cualquier ajuste necesario según las necesidades de una situación particular.

Ejemplos

Métodos

Trozos de cerebro y electrofisiología. Se anestesiaron ratas macho Sprague-Dawley (150-200 g) con pentobarbital y se extrajeron los cerebros y se enfriaron rápidamente en una solución de aCSF, se burbujearon con un 95% de O₂ y 5% de CO₂. Se trocearon los hipocampos (400 μ M) y se colocaron en aCSF oxigenado (NaCl, 124 mM; KCl 3; MgSO₄ 1,3; CaCl₂ 2,4; NaHCO₃ 26; NaH₂PO₄ 1,25; y glucosa 10). Las células piramidales CA1 se registraron a 30-31°C con electrodos precisos (resistencia punta: 60-120 M Ω). El estudio se realizó en neuronas CA1 con un potencial de membrana de descanso estable más negativo de -70 mV. A menos que se mencione lo contrario, se aplicaron estímulos de prueba a una frecuencia de 1 por minuto (0,017 Hz). Las señales se amplificaron con un amplificador Axi-Clamp-2B, se digitalizaron y se guardaron utilizando DigiData 1200 con la recogida de datos P-Clamp y el software de análisis (Axon Instruments, Inc.).

Hipoxia. Los episodios de hipoxia se indujeron mediante la sustitución de la administración de oxígeno por 95% N₂/5% O₂/5% CO₂ durante 3 minutos a 95% N₂/5% CO₂ durante 100 segundos. Las respuestas neuronales a cualquier de los anteriores se observó que eran idénticas en los experimentos preliminares. La hipoxia es más suave que las utilizadas por otros para producir un daño irreversible de la transmisión sináptica²⁵.

Histología. Al final de la prueba de comportamiento, las ratas se perfundieron transcardialmente bajo anestesia con pentobarbital terminal profundo con 400 ml de formaldehído al 10%. Los cerebros perfundidos se insertaron en cera. Las secciones coronales de 7 μ m se cortaron mediante microtoma rotatoria y se pusieron las secciones en serie a través de la formación hipocampal sobre portaobjetos y se procesaron mediante tinción con Nissl.

Tarea de laberintos espaciales. Se anestesiaron ratas Wistar adultas macho (200-250 g) con pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.) y se colocaron en un aparato estereotáctico (Kopf Instruments, Tujunga, CA). Se colocaron dos cánulas guías de acero inoxidable con las puntas situadas en las coordenadas (anterior-posterior, 0,5 mm; lateral, 1,5 mm; horizontal, 3,2 mm), en condiciones asépticas. Se dejó un periodo de recuperación de 7 días antes de ninguna otra experimentación. Todas las ratas se asignaron al azar a grupos diferentes (10 cada uno) y nadaron durante 2 minutos en una piscina (22 \pm 1°C) de 1,5 m (diámetro) x 0,6 m (profundidad). Al día siguiente, las ratas se entrenaron en una tarea de 2 pruebas por día durante 4 días consecutivos. Cada prueba de entrenamiento duró hasta 2 minutos, durante los cuales las ratas aprendieron a escapar del agua mediante la búsqueda de una plataforma escondida que estaba colocada en una localización fija y sumergida aproximadamente 1 cm por debajo de la superficie del agua. La navegación de las ratas se siguió con una videocámara. La prueba del cuadrante (1 minuto) se realizó después de eliminar la plataforma, 24 horas después de la última prueba de entrenamiento.

Resultados

Los efectos de la hipoxia breve en las funciones de las neuronas CA1 se controlaron con la transmisión sináptica, la potenciación a largo plazo (LTP) de los EPSPs glutamatérgicos y θ colinérgica, una sincronización de la actividad neuronal relacionada con la memoria que depende de la interacción heterosináptica temporal. La aplicación en un baño de carbachol (50 μ M, 20 minutos), un agonista del receptor colinérgico, a trozos de hipocampo mimetizaba la activación septal y transmisión difusa de acetilcolina e indujo el potencial de campo θ de CA1 (Figura 1a; amplitud máxima: 0,73 \pm 0,02 mV, n = 10, p < 0,05, a 7,4 \pm 0,7 Hz del ruido de fondo). θ es sensible al bloqueo de atropina y duró más de 3 horas⁷. La oscilación del potencial de membrana θ (7,5 \pm 1,0 mV; n = 18; p < 0,05) también se observó en células piramidales CA1 (θ intracelular; figura 1b). La hipoxia breve, inducida aproximadamente 30 minutos después de la inducción de θ , redujo ampliamente la actividad θ en un 87,4% (\pm 5,2%; n = 8, p < 0,05; figura 1a) y θ intracelular en un grado similar (en un 88,2 \pm 4,9%, n = 9, p < 0,05; figura 1b). Sin embargo, el LTP de respuestas a las entradas glutamatérgicas colaterales de schaffer (Sch) (figuras 1c,e), no se redujeron, sino que aumentaron, mediante hipoxia (figura 1d,e), lo cual concordaba con el LTP⁸ hipóxico descrito y la observación de que la expresión de LTP no es vulnerable a la hipoxia transitoria unos minutos después de la hipoxia. La transmisión sináptica se bloqueó brevemente sólo al final de los 3 minutos de hipoxia⁹.

Es conocido que el periodo de hipoxia bloquea la transmisión sináptica de entradas glutamatérgicas⁸, entrada GABAérgica^{8,10} y entradas colinérgicas^{11,12}, que provocan la desconexión o “interrupción” sináptica de la red neuronal de CA1⁸. Es conocido que estas entradas y su interacción juegan un papel esencial en el aumento de la eficacia sináptica en el aprendizaje y la memoria¹³. Los efectos de la hipoxia breve en la transmisión sináptica y de agentes en las respuestas hipóxicas se controlaron mediante las respuestas de células piramidales CA1 a la activación de Sch. La hipoxia breve eliminó brevemente los EPSPs y EPSCs (figura 2a,b; en un $95,2 \pm 5,6\%$; $n = 10$, y un $96,8 \pm 4,2\%$, respectivamente, $p < 0,05$). La “interrupción” sináptica desapareció inmediatamente cuando se inició la reoxigenación (figura 2a,b) y no se produjo de manera postsináptica. La aplicación local de glutamato durante los últimos segundos de los 3 minutos de hipoxia reveló un máximo de corriente de entrada ($201,2 \pm 10,5$ pA) que difería significativamente ($n = 7$, $p > 0,05$) de su valor de control ($206,8 \pm 9,7$ pA).

La “interrupción” sináptica hipóxica y la reducción en la inducción de θ colinérgica se evitaron mediante el bloqueo de los receptores de adenosina A₁. La aplicación de citicolina, una sustancia neuroprotectora¹⁴, por otro lado, no es eficaz (figura 3a; $n = 6$, $p < 0,05$), sugiriendo que no había daño celular implicado. En presencia de 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (CPDPX), un antagonista selectivo de receptor de adenosina A₁, la transmisión sináptica permaneció intacta al final de la hipoxia (figura 3b, $99,2 \pm 2,4\%$ al final de la hipoxia frente al control 100% ; $n = 7$, $p < 0,05$). Ni la actividad θ ($100,2 \pm 3,2\%$, $n = 6$, $p > 0,05$) ni θ intracelular ($99,6 \pm 3,0\%$, $n = 8$, $p > 0,05$) estaban afectadas por la hipoxia breve (figura 3c,d).

Una de las consecuencias más persistentes de la hipoxia/isquemia transitoria es la amnesia. Se evaluaron los efectos de una hipoxia breve y la CPDPX en el aprendizaje espacial (figura 4a) en ratas utilizando un laberinto acuático con plataforma escondida. Los episodios de hipoxia breve no provocaron ninguna pérdida celular obvia (figura 3e,f). Tal como se muestra en la figura 4b, la latencia para escapar a la plataforma en los tres grupos de ratas disminuyó después de las sesiones de entrenamiento. Sin embargo, la diferencia entre grupos era significativa ($F_{2,27} = 9,142$, $p < 0,001$), indicando que el aprendizaje espacial en ratas sometidas a hipoxia breve (ratas con hipoxia) era más lento. Un análisis *post hoc* revela una diferencia significativa desde las terceras pruebas ($p < 0,05$). Las pruebas de cuadrante 24 horas después de la última prueba de entrenamiento reveló que las ratas con hipoxia (figura 4d) no mostraron preferencia por un cuadrante ($F_{3,36} = 1,8$, $p > 0,05$), mientras que el control ($F_{3,36} = 160,3$, $p < 0,0001$; figura 4c) empleó más tiempo en la búsqueda del cuadrante objetivo (cuadrante 4), donde se situó previamente la plataforma. De este modo, las ratas con hipoxia actuaron peor que sus controles en esta tarea de retención de memoria espacial.

Los déficits de memoria inducidos por una hipoxia breve eran sensibles a CPDPX. Las inyecciones intracerebro-ventriculares bilaterales de CPDPX eliminaron el daño hipóxico en la memoria espacial (figura 4b). Las pruebas de cuadrante revelaron que las ratas con CPDPX-hipoxia mostraron preferencia por el cuadrante objetivo ($F_{3,36} = 169,7$, $p < 0,0001$; figura 4e), de forma idéntica a la del control. Sin embargo, el total de distancia nadada no difería entre los tres grupos (figura 4f; $p > 0,05$).

También es conocido que los factores diferentes del grado de pérdida de células CA1 contribuyen a daños en el comportamiento^{15,16}. La hipoxia/isquemia transitoria induce la liberación de adenosina^{17,19}, dando lugar a la obertura de ambos canales²⁰ de K_{ATP} y K_{Cn}²⁺ y a la disminución del influjo de calcio inducido por estímulos en las neuronas²¹ mediante una acción en receptores presinápticos y postsinápticos A1. La reducción en θ colinérgica sugiere una interacción temporal dañada de entradas heterosinápticas. Para una actividad θ estable, pueden ser necesarios algunos niveles de actividad e interacción persistentes de entradas heterosinápticas. Además, los receptores de adenosina A₁ están unidos a proteínas G y quizás a través de éstas se facilita la obertura de los canales de potasio. La liberación interna de Ca²⁺ de un depósito interno sensible a InsP₃ podría estar implicada como componente principal de la respuesta hipóxica²². La interacción funcional de CA1 puede subyacer en los déficits de memoria espacial observados debido a una hipoxia breve. Por otro lado, los propios EPSPs y LTP aumentados ligeramente no es probable que provoquen una disminución en el aprendizaje espacial. Se ha descrito que el aprendizaje espacial es normal con una potenciación a largo plazo de CA1 aumentada en dos veces en ratones²³ deficientes en inositol 1,4,5-trifosfato 3-quinasa_A. Los episodios de hipoxia breve pueden ser más relevantes a un declive gradual de la memoria durante el envejecimiento o la enfermedad de Alzheimer. Un episodio breve de isquemia global se describió como suficiente para aumentar la producción de la proteína precursora mieloide en neuronas²⁴ CA1 vulnerables. La “interrupción sináptica” hipóxica compromete la capacidad del cerebro para aprender y memorizar, que es un sacrificio innecesario si la hipoxia resulta ser breve. Liberar la red de la “interrupción” heterosináptica a través del bloqueo de los receptores de adenosina A₁ puede representar una estrategia eficaz para eliminar el daño funcional. Combinados con agentes que invierten el daño celular y evitan la pérdida celular, los antagonistas también podrían ser valiosos en la terapia contra la pérdida de memoria severa inducida por hipoxia/isquemia.

60 Referencias

Las siguientes referencias se incorporan en la presente invención por referencia:

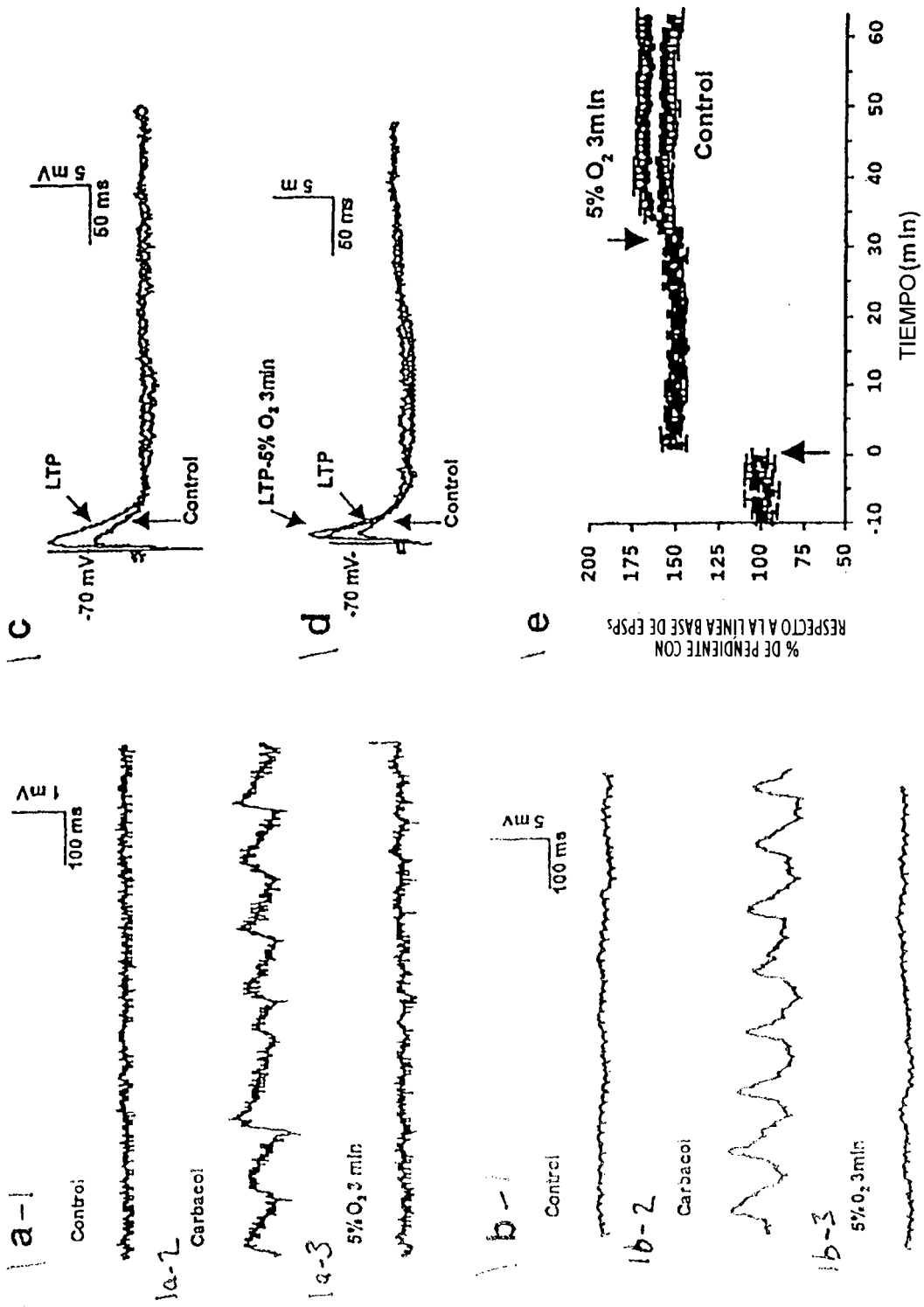
1. Grubb, N.R., O’Carroll, R., Cobbe, S.M., Sirel, J. & Fox, K.A. Chronic memory impairment after cardiac arrest outside hospital. *Br. Med. J.* 313, 143-146 (1996).
2. Semenza, G.L. Perspectives on oxygen sensing *Cell* 98, 281-284 (1999).

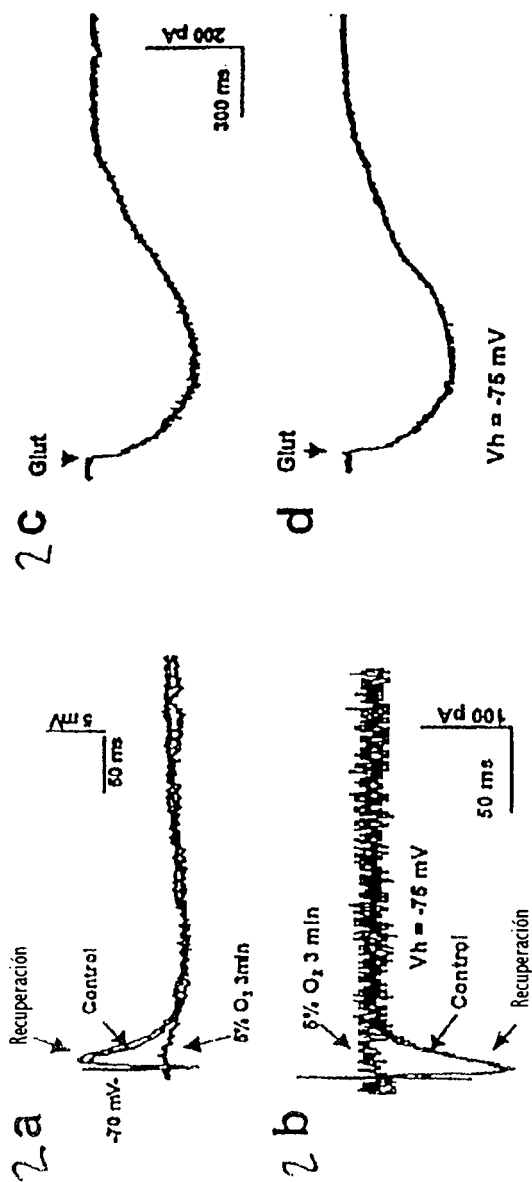
3. **Eu, J.P., Sun, J.H., Xu, I., Stamler, J.S. & Meissner, G.** The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell* 102, 499-509 (2000).
4. **Nakajimna, W., et al.** Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J. Neurosci.* 20, 7994-8004 (2000).
5. **Sun, M.-K., Zhao, W.Q., Nelson, T.J. & Alkon, D.L.** Theta rhythm of hippocampal CA1 neuron activity: gating by GABAergic synaptic depolarization. *J. Neurophysiol in press*, 2001.
10. **Descarries, L., Gisiger, V. & Steriade, M.** Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 53, 603-625 (1997).
7. **Huerta, P.T. & Lisman, J.E.** Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 *in vitro*. *Neuron* 15, 1053-1063 (1995).
15. **Hammond, C., Crépel, V., Gozlan, H. & Ben-Ari, Y.** Anoxic LTD sheds light on the multiple facets of NMDA receptors. *Trends Neurosci.* 17, 497-503 (1994).
9. **Arai, A., Larson, J. & Lynch, G.** Anoxia reveals a vulnerable period in the development of long-term potentiation. *Brain Res.* 511, 353-357 (1990).
20. **Congar, P., Khazipov, C.P. & Ben-Ari, Y.** Direct demonstration of functional disconnection by anoxia of inhibitory interneurons from excitatory inputs in rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 73, 421-426 (1995).
11. **Kasa, P., Rakonczay, Z. & Gulya, K.** The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 52, 511-535 (1997).
12. **Porkka-Heiskanen, T., et al.** Adenosine: A mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276, 1265-1267 (1997).
30. **Shulz, D.E., Sosnik, R., Haidarliu, S. & Ahissar, E.** A neuronal analogue of state-dependent learning. *Nature* 403, 549-553 (2000).
14. **Shuaib, A., Yang, Y. & Li, Q.** Evaluating the efficacy of citicoline in embolic ischemic stroke in rats: neuroprotective effects when used alone or in combination with urokinase. *Exp. Neurol.* 161, 733-739 (2000).
35. **Gibson, G.E. & Duffy, T.E.** Impaired synthesis of acetylcholine by mild hypoxic hypoxia or nitric oxide. *J. Neurochem.* 36, 28-33 (1981).
16. **Jaspers, R.M.A., Block, F., Heim, C. & Sontag, K.-H.** Spatial learning is affected by transient occlusion of common carotid arteris (2VO): comparison of behavioral and histopathological changes after "2VO" and "four-vessel-occlusion" in rats. *Neurosci. Lett.* 117, 149-153 (1990).
17. **Van Wylen, D.G., Park, T.S., Rubio, R. & Berne, R.M.** Increases in cerebral interstitial fluid adenosine concentration during hypoxia, local potassium infusion, and ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 6, 522-528 (1986).
45. **Sun, M.-K.** Pharmacology of reticulospinal vasomotor neurons in cardiovascular regulation. *Pharmacol. Rev.* 48, 465-494 (1996).
19. **Sun, M.-K. & Reis, D.J.** Hypoxia-activated Ca²⁺ currents in pacemaker neurooes of rat rostral ventrolateral medulla *in vitro*. *J. Physiol. Lond.* 476, 101-116 (1994).
50. **Yamamoto, S., Tanaka, E. & Higashi, H.** Mediation by intracellular calcium-dependent signals of hypoxic hyperpolarization in rat hippocampal CA1 neurons *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 77, 386-392 (1997).
21. **Fredholm, B.B. & Dunwiddie, T.V.** How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol, Sci.* 9, 130-133 (1988).
22. **Belousov, A.B., Godfraind, J.M. & Krnjevic, K.** Internal Ca²⁺ stores involved in anoxic responses of rat hippocampal neurons. *J. Physiol. Lond.* 486, 547-556 (1995).
60. **Jun, K., et al.** Enhanced hippocampal CA1 LTP but not spatial learning in inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase (A)-deficient mice. *Learning Memory* 5, 317-330 (1998).
24. **Gervais, F.G., et al.** Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-b precursor protein and amyloidogenic Ab peptide formation. *Cell* 97, 395-406 (1999).
65. **Furling, D., Ghribi, O., Lahsaini, A., Mirault, M.-E. & Massicotte, G.** Impairment of synaptic transmission by transient hypoxia in hippocampal slices: improved recovery in glutathione peroxidase transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4351-4356 (2000).

ES 2 311 626 T3

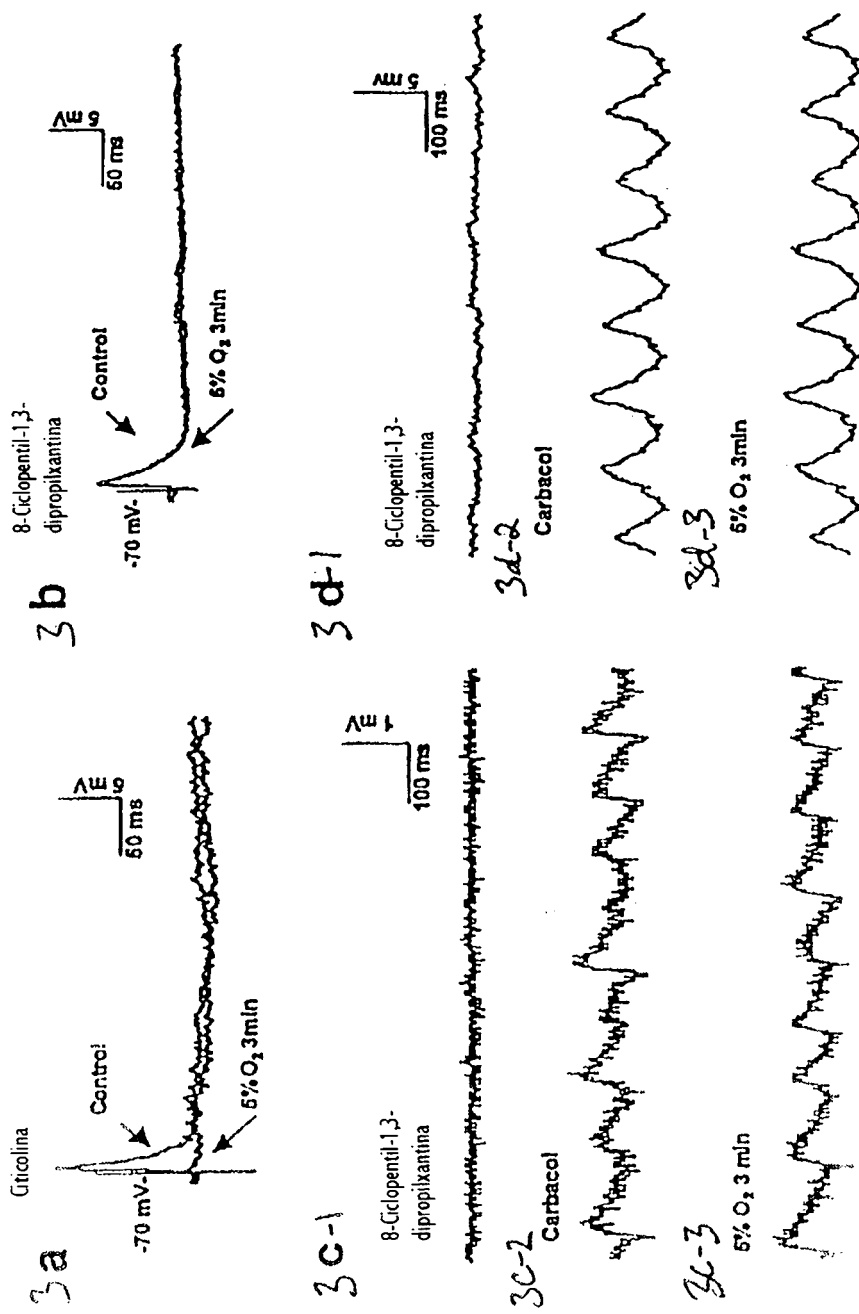
REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1 para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos de aprendizaje y/o de la memoria inducidos por hipoxia.
2. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según la reivindicación 1, en el que la hipoxia es cerebral.
- 10 3. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según cualquiera de las reivindicaciones, en el que la hipoxia es reversible y transitoria.
4. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según cualquiera de las reivindicaciones, en el que la hipoxia está inducida por la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la demencia pugilística, demencia o esclerosis múltiple.
- 15 5. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según cualquiera de las reivindicaciones, en el que la hipoxia aparece en periodos repetitivos.
- 20 6. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según cualquiera de las reivindicaciones, en el que la hipoxia está inducida por sucesos traumáticos, ataques isquémicos transitorios, hipoxia relacionada con azúcar, enfermedad pulmonar obstructiva aguda y/o crónica, infecciones del sistema nervioso central, tales como meningitis, encefalitis y/u otras lesiones traumáticas del sistema nervioso central.
- 25 7. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según cualquiera de las reivindicaciones, en el que el antagonista es 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (CPDPX).
8. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según cualquiera de las reivindicaciones, en el que la hipoxia reduce la actividad teta en, como mínimo, de, aproximadamente, 50% a, aproximadamente, 95%.
- 30 9. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según cualquiera de las reivindicaciones, en el que el antagonista mitiga los efectos de la hipoxia mediante la restauración de, como mínimo, 75% a, aproximadamente, 100% de los niveles de prehipoxia para la transmisión sináptica y/o la actividad intracelular teta.
- 35 10. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según cualquiera de las reivindicaciones, en el que el antagonista de adenosina A1 se combina con un portador farmacéuticamente aceptable, el cual libera el antagonista a través de la barrera hematoencefálica.
- 40 11. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según cualquiera de las reivindicaciones, en el que el antagonista de adenosina A1 se combina con un agente que invierte el daño celular y/o evita la pérdida celular.
- 45 12. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según cualquiera de las reivindicaciones, en el que la composición farmacéutica comprende soluciones tampón.
13. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según la reivindicación 12, en el que la solución tampón es una solución salina.
14. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según cualquiera de las reivindicaciones, en el que la composición farmacéutica se puede formular en preparados sólidos, semisólidos, líquidos o gaseosos.
- 50 15. Uso de un antagonista de receptor de adenosina A1, según la reivindicación 14, en el que la composición farmacéutica se puede formular en comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyectables, inhalantes y aerosoles.
- 55 16. Método de identificación de un compuesto antagonista de A1 útil para el tratamiento de la pérdida de memoria relacionada con hipoxia que comprende:
 - disponer de tejido cerebral bajo condiciones controladas que modelan la actividad teta,
 - colocar el tejido en condiciones de hipoxia que provocan la interrupción sináptica y la pérdida de actividad teta,
 - 60 administrar un compuesto candidato antagonista de A-1 al tejido cerebral en condiciones de hipoxia, y
 - determinar si el compuesto candidato evita la interrupción sináptica del tejido cerebral y/o mantener la actividad teta.
- 65 17. Método, según la reivindicación 16, en el que el tejido cerebral comprende células piramidales CA1.





Figuras 2a - 2d



Figuras 3a - 3d-3

