

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 930**

51 Int. Cl.:
A61K 31/57 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06739662 .2**
96 Fecha de presentación: **24.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1871382**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2008**

54 Título: **MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO DE UNA HERIDA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL POR MEDIO DE ADMINISTRACIÓN REDUCIDA DE PROGESTERONA.**

30 Prioridad:
24.03.2005 US 664728 P
24.10.2005 US 729663 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.01.2012

73 Titular/es:
EMORY UNIVERSITY
1784 NORTH DECATUR ROAD, NORTH
DECATUR BUILDING, SUITE 130
ATLANTA, GEORGIA 30322, US

72 Inventor/es:
STEIN, Donald, G. y
CUTLER, Sarah, Melissa

74 Agente: **Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 371 930 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

Métodos para el tratamiento de una herida del sistema nervioso central por medio de administración reducida de progesterona

Campo de la invención

5 [0001] La invención se refiere a métodos para el tratamiento de una herida isquémica o traumática del sistema nervioso central.

Antecedentes de la invención

[0002] Hay una evidencia experimental creciente de que la progesterona, sus metabolitos y otros esteroides gonadales, tales como estrógeno y posiblemente testosterona, son agentes neuroprotectores eficaces; aunque los mecanismos específicos fisiológicos por los que estas hormonas actúan en el sistema nervioso central para mejorar la reparación no se entienden completamente. Además de ser un esteroide gonadal, la progesterona también pertenece a una familia de hormonas autocrina/paracrina llamada neuroesteroides. Los neuroesteroides son esteroides que se acumulan en el cerebro independientemente de fuentes endocrinas y que se pueden sintetizar a partir de precursores de colesterol en células gliales. Estos neuroesteroides pueden potenciar la transmisión GABA, modular los efectos del glutamato, mejorar la producción de mielina, reducir la expresión de citocinas inflamatorias y prevenir la liberación de radicales libres de la microglia activada.

[0003] Datos in vivo han demostrado los efectos neuroprotectores de la progesterona en sistemas nerviosos dañados. Por ejemplo, después de una herida por contusión, la progesterona reduce la gravedad del edema cerebral después de la herida. La atenuación del edema por progesterona está acompañada por la preservación de neuronas de muerte neuronal secundaria y mejoras en las consecuencias cognitivas (Roof et al. (1994) *Experimental Neurology* 129:64-69). Además, después de una herida isquémica en ratas, la progesterona ha mostrado reducir el daño celular y el déficit neurológico (Jiang et al. (1996) *Brain Research* 735: 101-107). Los efectos protectores de la progesterona se pueden mediar a través de la interacción de tk8l'e con GABA y/o receptores de glutamato al igual que sus efectos en citocinas inflamatorias y la expresión de aquaporina que se media por el receptor de progesterona intranuclear.

[0004] Varios metabolitos de progesterona se sugiere también que tienen propiedades neuroprotectoras. Por ejemplo, la alopregnanolona metabolito de progesterona o la epipregnanolona son moduladores positivos del receptor GABA, aumentan los efectos de GABA de manera independiente a las benzodiazepinas (Baulieu, E. E. (1992) *Adv. Biochem. Psicofarmacol.* 47:1-16; Robel et al. (1995) *Crit. Rev. Neurobiol.* 9:383-94; Lambert et al. (1995) *Trends Pharmacol. Sci.* 16:295-303; Baulieu, E. E. (1997) *Recent prog. Horm. Res.* 52:1-32; Reddy et al. (1996) *Psychopharmacology* 128:280-92). Además, estos neuroesteroides hacen de antagonistas al receptor sigma. Un receptor que puede activar el complejo de canal NMDA (Maurice et al. (1998) *Neuroscience* 83:413-28; Maurice et al. (1996) *J. Neurosci. Res.* 46:734-43; Reddy et al. (1998) *Neuroreport* 9:3069-73). Estos neuroesteroides también han mostrado reducir la estimulación de neuronas colinérgicas y la liberación posterior de acetilcolina por excitabilidad. Numerosos estudios han mostrado que las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal son sensibles a la herida traumática del cerebro y que la liberación excesiva de acetilcolina puede ser más excitotóxica que la del glutamato (Lyeth et al. (1992) *J. Neurotrauma* 9(2):S463- 74; Hayes et al. (1992) *J. Neurotrauma* 9(1):S173-87).

[0005] Después de una herida traumática del sistema nervioso central, una cascada de eventos fisiológicos conduce a una pérdida neuronal incluyendo, por ejemplo, una respuesta inmunitaria inflamatoria y excitotoxicidad que resultan del impacto inicial que interrumpe el glutamato, acetilcolina, colinérgico, GABA y sistemas receptores NMDA. Además, a la herida traumática del CNS frecuentemente le sigue un edema del cerebro y/o de la médula espinal que aumenta la cascada de heridas y conduce además a muerte de célula secundaria y aumenta la mortalidad del paciente.

[0006] Otros tipos de herida del CNS pueden poner en marcha unos eventos fisiológicos diferentes que llevan a pérdida neuronal. Por ejemplo, la herida isquémica ocurre cuando el flujo sanguíneo del CNS se interrumpe. Durante la isquemia, el ATP celular consumido normalmente no puede restablecerse adecuadamente en ausencia de un suministro de oxígeno. Otros eventos fisiológicos asociados a la herida isquémica del CNS incluyen liberación o sobreexpresión de proteínas, como enolasa específica de neurona (NSE), mielina proteína básica, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína S-100 y la isoforma gamma de la proteína quinasa C (PKCg), estimulación de la degradación de fosfolípidos de la membrana y acumulación de ácidos grasos libres posterior, acidosis celular, liberación de glutamato y excitotoxicidad, influjo de iones calcio y generación de radicales libres.

[0007] Una isquemia significativa en el CNS ocurre con el derrame cerebral, que conduce a muerte celular rápida en las regiones del núcleo del derrame cerebral donde el flujo sanguíneo se reduce sobre un 20% de los niveles normales. No obstante, hay un área más grande de la herida potencial, llamada penumbra isquémica, en la que el flujo sanguíneo se reduce a una extensión menor. La células en esta región están en peligro, pero no pueden ser dañadas irreversiblemente.

[0008] Debido a la limitaciones en las terapias actuales para las heridas del CNS como se ha descrito anteriormente, se necesitan los métodos mejorados para el tratamiento de la herida isquémica y traumática del CNS.

Resumen de la invención

[0009] Administración reducida de progesterona para el tratamiento o la prevención del daño neuronal en el CNS se proporciona. En particular, la presente invención se refiere a la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de progesterona después de una herida isquémica o traumática al CNS de manera que, antes de la terminación de la administración de progesterona, la administración se reduce para evitar retiro. El fármaco reducido empleado puede implicar un taper lineal, un taper exponencial, división progresiva de la dosis administrada por 50%, o puede determinarse basándose en la evaluación por parte del médico encargado del tratamiento de la respuesta del paciente a la terapia. Los métodos de administración reducida de la presente invención se pueden utilizar en combinación con cualquier protocolo terapéutico o régimen para la administración de una cantidad de progesterona terapéuticamente eficaz para tratar una herida isquémica o traumática del CNS.

Breve descripción de los dibujos

[0010]

La figura 1 muestra una curva de respuesta de dosificación para la recuperación conductual después de un daño cerebral traumático. Las figuras 1A y 1B demuestran que el siguiente tratamiento con dosis baja (8 mg/kg), moderada (16 mg/kg) y alta (32 mg/kg) de progesterona en un portador con ciclodextrina, las dosis baja y moderada de progesterona producen una consistente mejora en el rendimiento del laberinto de agua de Morris.

La figura 2 muestra los resultados del tratamiento "tarea de eliminación del adhesivo" con dosis baja, (8mg/kg) moderada (16 mg/kg) y alta (32 mg/kg) de progesterona en un portador con ciclodextrina.

La figura 3 muestra una negligencia somatosensora, datos a un día (Figura 3A) y a una semana (Figura 3B) después del retiro.

La figura 3A muestra que a un día después del retiro animales TWL mostraron una latencia disminuida en comparación con animales VL y AWL (#, $p < 0,05$). Ratas AWS demostraron elevadas deficiencias sensoriales en comparación con los grupos TWS y VS (*, $p < 0,05$). La figura 3B muestra que, a una semana después del retiro, los animales falsos demostraron una latencia equivalente, mientras que el tratamiento reducido mantuvo la latencia disminuida en comparación con el tratamiento agudo y el de vehículo (#, $p < 0,05$).

La figura 4 muestra el tiempo central, determinado a partir de las jaulas Digiscan Locomoter Activity, entre uno (Figura 4A) y siete (Figura 4B) días después del retiro. La figura 4A muestra que a un día después del retiro, el tiempo central aumentó para animales TWS en comparación con todos los otros falsos (#; $p < 0,05$), mientras que el tiempo central TWL aumentó en comparación con otros grupos de lesión (**, $p < 0,05$). Los animales AWL aumentaron el tiempo en comparación con animales de vehículo (##; $p < 0,05$), y los animales AWS disminuyeron significativamente el tiempo central en comparación con animales VS (*, $p < 0,05$). La figura 4B muestra que el tiempo central TWL una semana después del retiro aumenta sobre AWL (**; $p < 0,05$), que aumenta sobre VL (###, $p < 0,05$). No se vio ninguna diferencia entre grupos falsos.

La figura 5 muestra la densitometría de transferencia de Western p53 entre grupos experimentales que demuestran un aumento en la actividad apoptótica para animales VL sobre todos los otros grupos de tratamiento (*, $p < 0,05$).

La figura 6 muestra la densitometría de transferencia de Western HSP70 entre grupos experimentales que demuestran un aumento para animales TWL sobre todos los otros grupos (*, $p < 0,05$).

La figura 7 muestra la densitometría de transferencia Western BDNF entre grupos experimentales que demuestran un aumento para animales TWL sobre todos los otros grupos (*; $p < 0,05$), seguidos de AWL (#, $p < 0,05$). Los niveles BDNF de VL fueron comparables a los de los falsos.

La figura 8 muestra imágenes representativas de secciones seleccionadas anteriores a bregma (Figura 8A) y datos cuantificados para cada grupo de lesión (Figura 8B). La figura 8A muestra secciones representativas teñidas con tionina a mm anterior a bregma para animales de lesión. La figura 8B muestra que el porcentaje del volumen de la lesión a 3 semanas después de la herida es más grande en animales tratados con vehículo, seguidos de aquellos con retiro agudo (*; $p < 0,05$) y retiro reducido (#, $p < 0,05$).

La figura 9 muestra astrocitos reactivos relativos determinados por coloración inmunofluorescente GFAP a tres semanas después de la herida. La figura 9A muestra coloración inmunofluorescente para GFAP en las rebanadas de cerebro de los siguientes grupos: (A) VL; (B) AWL; (C) TWL; (D) VS; (E) AWS; y (F) TWS. Las imágenes se muestran a 40x, con 10 μ m representados. La figura 9B muestra la cuantificación de la luminosidad para coloración inmunofluorescente GFAP de astrocitos reactivos que indica la respuesta más grande en animales VL (*; $p < 0,05$), seguidos de AWL (**; $p < 0,05$) y animales TWL. Los animales AWS elevaron significativamente los niveles de astrocitos reactivos en comparación con otros grupos falsos m (#, $p < 0,05$).

Descripción detallada de la invención

[0011] La presente invención se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento o la prevención de neurodegeneración después de una herida isquémica o traumática al sistema nervioso central. En particular, los métodos de la invención se refieren a la administración de una cantidad de progesterona terapéuticamente eficaz después de una herida isquémica o traumática al CNS de manera que, antes de la terminación de la administración de progesterona, la administración se reduce para evitar retiro. Como se describe con más detalle en otra parte del documento, la presente invención demuestra que la administración reducida permite una reparación del CNS más provechosa que cuando ocurre una terminación brusca de la progesterona o del metabolito progestínico.

[0012] Por "tratamiento" se entiende cualquier mejora en el sujeto que tiene la herida isquémica o traumática, incluyendo mejora morfológica (es decir, viabilidad del tejido mejorada) y/o recuperación conductual. La mejora se

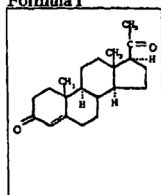
puede caracterizar por un aumento en el índice y/o la extensión de la recuperación anatómica y conductual después de la herida isquémica o traumática del CNS. Por consiguiente, una "respuesta terapéutica positiva" induce una reacción completa y una respuesta parcial. Varios métodos para determinar si una respuesta terapéutica completa o parcial ha sucedido se describen en otra parte de este documento.

5 [0013] La neurodegeneración es la pérdida progresiva de neuronas en el sistema nervioso central. Como se utiliza en este caso, "neuroprotección" es la detención y/o progresión inversa de la neurodegeneración después de una herida isquémica o traumática del sistema nervioso central. Por lo tanto, los métodos de la invención también encuentran uso en la reducción y/o prevención de los eventos fisiológicos que conducen a una neurodegeneración. Específicamente, la presente invención se refiere a métodos para la reducción o la eliminación de la muerte celular neuronal, edema, isquemia y mejora de la viabilidad del tejido después de una herida isquémica o traumática del sistema nervioso central.

10 [0014] Las hormonas sexuales son esteroides que se pueden clasificar en grupos funcionales según la estructura química y la actividad fisiológica, e incluyen hormonas estrogénicas, hormonas progestacionales y hormonas androgénicas. De interés particular en los métodos de la presente invención son las hormonas progestacionales, denominadas en este caso como "progestinas" o "progestágenos" y sus derivados y metabolitos bioactivos. Elementos de esta amplia familia incluyen hormonas esteroideas descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro et al., Mack Publishing Co. (18th ed. 1990), 990-993. Como con todas las otras clases de esteroides, el estereoisomerismo es de importancia fundamental con las hormonas sexuales. Por lo tanto, una variedad de progestágenos (es decir, progesterona) y sus derivados se abarcan en la presente invención, incluyendo productos naturales y sintéticos. En un aspecto de la invención, la progestina o metabolito progestínico es progesterona.

20 [0015] El término "progesterona", como se utiliza en este caso, se refiere a un elemento de la familia progestínica y comprende hormonas esteroideas de 21 carbonos. La progesterona también se conoce como D4-pregnene-3,20-dione; 84-pregnene-3,20-dione; o pregn-4-ene-3,20-dione y su estructura se proporciona más adelante como fórmula (I). La progesterona usada en los métodos de la invención puede ser de origen natural o sintético.

Formula I



30 [0016] Una herida traumática del CNS se caracteriza por un impacto físico al sistema nervioso central. Por ejemplo, un daño cerebral traumático resulta cuando el cerebro está sujeto a una fuerza física que provoca un daño progresivo en la célula neuronal y/o muerte celular. Un daño cerebral traumático puede causar un soplado en la cabeza y manifestarse como una herida cerrada o abierta. Por ejemplo, las heridas por explosión causadas por la onda de presión compleja generada por una explosión, y puede incluir heridas cerradas, como conmoción sin señales externas de traumatismo craneal. Otras fuerzas físicas que pueden actuar en el cerebro incluyen presión aumentada intracraneal debido a, por ejemplo, hemorragia subaracnoidea o intracraneal, crecimiento tumoral, ventriculomegalia, o edema cerebral. Daño cerebral severo puede ocurrir debido a laceraciones, fracturas de cráneo y, de manera inversa, incluso en ausencia de señales externas de traumatismo craneal. Las fuerzas físicas que resultan de un daño cerebral traumático causan sus efectos induciendo tres tipos de herida: fractura de cráneo, herida parenquimal y herida vascular.

40 [0017] Las heridas parenquimales incluyen conmoción, herida parenquimal directa y herida axonal difusa. Las conmociones se caracterizan por un síndrome clínico de alteración de conciencia secundario a un traumatismo craneal que normalmente resulta de un cambio en el impulso de la cabeza (movimiento de la cabeza detenido contra una superficie recalzada). La patogénesis de rotura repentina de actividad nerviosa se desconoce, pero las anomalías fisiológicas y bioquímicas que ocurren incluyen, por ejemplo, despolarización debido a flujos mediados por el ácido iónico del aminoácido excitatorio a través de membranas celulares, depleción de adenosina trifosfato mitocondrial y alteración en la permeabilidad vascular. El síndrome postconvulsivo puede mostrar una evidencia de una herida parenquimal directa, pero en algunos casos no hay evidencia de daño.

50 [0018] Contusión y laceraciones son condiciones en las que la herida parenquimal directa del cerebro ha sucedido, bien a través de la transmisión de energía cinética al cerebro y magullado análogo que se ve en el tejido blando (contusión) o por penetración de un objeto y desgarramiento del tejido (laceración). Un soplado en la superficie del cerebro conduce a desplazamiento rápido del tejido, rotura de canales vasculares y hemorragia posterior, herida tisular y edema. La evidencia morfológica de la herida en el cuerpo de la célula neuronal incluye picnosis de núcleo,

eosinofilia del citoplasma y desintegración de la célula. Además, la hinchazón axonal puede desarrollarse en la proximidad de las neuronas dañadas y también a grandes distancias del sitio del impacto. Este fenómeno se puede caracterizar como "herida neuronal difusa" y se provoca por extensión y corte del axón. La respuesta inflamatoria del tejido dañado sigue su curso normal con neutrófilos precedentes a la aparición de macrófagos.

5 [0019] Una herida isquémica al CNS se caracteriza por el hecho de que una insuficiencia o interrupción en el suministro de sangre en cualquier localización del cerebro, tal como, pero no limitado a, una localización del cerebro, cerebelo o tronco cerebral. La médula espinal, que es también una parte del CNS, es igualmente susceptible a la isquemia resultante de un flujo sanguíneo disminuido. Un episodio isquémico puede ser causado por una constricción u obstrucción de un vaso sanguíneo, como ocurre en el caso de un trombo o émbolo. Alternativamente, 10 el episodio isquémico puede resultar de cualquier forma de función cardíaca comprometida, paro cardíaco incluido. Cuando la deficiencia es suficientemente severa y prolongada, esto puede llevar a rotura de función fisiológica, muerte posterior de neuronas y necrosis (infarto) de las áreas afectadas. La extensión y el tipo de anomalía neurológica resultante de la herida depende de la ubicación y del tamaño del infarto o el foco de la isquemia. Cuando la isquemia se junta con un derrame cerebral, esto puede ser global o focal en la extensión.

15 [0020] Isquemia global, como se utiliza en este caso en referencia al CNS, se refiere a una condición que resulta de una disminución general de flujo sanguíneo a todo el cerebro, al cerebro anterior, o a la médula espinal, que causa la muerte retardada de neuronas, particularmente en aquellos lugares geométricos metabólicamente activos, en todos estos tejidos.

20 [0021] Isquemia focal, como se utiliza en este caso en referencia al CNS, se refiere a una condición que resulta del bloqueo de una única arteria que provee de sangre al cerebro o médula espinal, con el resultado la muerte de todos los elementos celulares (pan-necrosis) en el área suministrada por esa arteria.

[0022] Como se ha descrito anteriormente, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o la prevención del daño neuronal provocado por una herida isquémica o traumática al CNS, a través de la administración de una cantidad de progesterona terapéuticamente eficaz de manera que, antes de la terminación de 25 la administración de la progestina o el metabolito progestínico, la administración se reduce para evitar retiro. Como se describe con más detalle en la sección experimental más adelante, la presente invención se refiere al hallazgo de que, cuando se detiene la terapia de progesterona, la administración reducida de progesterona para evitar retiro resulta superior en eficacia para la terapia de progesterona en comparación con la terminación brusca de la administración.

30 [0023] Por "administración reducida" o "régimen de dosificación de administración reducida" se entiende dosis sucesivas reducidas y eliminación eventual de la progestina o metabolito progestínico, bien sobre un periodo temporal fijo o un tiempo determinado empíricamente por una evaluación del médico basada en el control regular de una respuesta terapéutica de un paciente a un herida isquémica o traumática del CNS. El periodo de la progestina reducida o la administración del metabolito progestínico pueden ser sobre 12,24,36,48 horas o más. 35 Alternativamente, el periodo de la progestina reducida o la administración de metabolito progestínico pueden oscilar entre aproximadamente de 1 a 12 horas, sobre 12 a 48 horas, o sobre 24 a 36 horas. En un aspecto de la invención, la administración reducida de una progestina o metabolito progestínico implica la administración reducida de progesterona.

[0024] El fármaco reducido empleado podría implicar progresivamente dosis administradas divididas por 50%. Por 40 ejemplo, tal graduación de 500 mg iría a 500, 250, 125, 62.5, etc. El fármaco reducido empleado podría ser un taper "lineal". Por ejemplo, un taper lineal "10%" de 500 mg iría a 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, etc. Alternativamente, un taper exponencial podría ser empleado, si el programa perfilado arriba se usa como un ejemplo, el taper exponencial sería, por ejemplo, 500, 450, 405, 365, 329, 296, 266, 239, etc. Por consiguiente, un taper exponencial o lineal sobre un 5%, 10%, 20%, 30%, o 40% podría ser empleado en los métodos de la 45 invención. Además, un taper exponencial o lineal de aproximadamente 1% a 5%, sobre 6% a 10%, sobre 11% a 15%, sobre 16% a 20%, sobre 21 % a 25%, sobre 26% a 30%, sobre 31% a 35%, sobre 36% a 40% podría ser empleado. Alternativamente, el plan reducido puede determinarse basándose en la evaluación por parte del médico que lleva a cabo el tratamiento de la respuesta del paciente a la terapia.

[0025] Los métodos de administración reducida de la presente invención se usan en combinación con administración 50 de progestina o terapias de metabolito progestínico para sujetos con herida isquémica o traumática del CNS. Tal y como se define aquí, el sujeto puede ser cualquier mamífero, preferiblemente un humano o un animal, incluyendo animales domésticos, agrícolas, o exóticos. En formas de realización específicas, el humano es un adulto (mayor de 18 años de edad), mientras que en otras formas de realización, el humano es un niño (menor de 18 años de edad). El niño pueden ser un neonato, bebé, niño, post-pubescente o pre-pubescente y oscilar entre la edad del nacimiento, 55 sobre 1 mes a 2 años, sobre 1 año a 5 años, sobre 4 años a 9 años, sobre 8 años a 14, o sobre 13 a 18 años de edad. Además, el humano pueden tener alrededor de 55 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 95 o más.

[0026] Antes de la administración reducida de la presente invención, la progesterona se administra a un nivel 60 terapéuticamente eficaz a un sujeto con la necesidad del mismo para el tratamiento de una herida del CNS. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende la concentración de una progestina o metabolito progestínico que es suficiente para suscitar un efecto terapéutico. Así, la concentración de progesterona en una unidad de dosis administrada conforme a la presente invención es eficaz en el tratamiento o la prevención del daño neuronal

después de una herida isquémica o traumática al CNS y, por lo tanto, suscita un efecto neuroprotector. La cantidad terapéuticamente eficaz dependerá de muchos factores, incluyendo, por ejemplo, la actividad específica de la progestina o metabolito progestínico, la gravedad, modelo y tipo de herida (p. ej., isquémica o traumática), el daño neuronal resultante, la receptividad del paciente, el peso del paciente entre otras variables intrapersonales, el método de administración y la progestina o la formulación del metabolito progestínico usados. Varios métodos para la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de progesterona para el tratamiento de la herida del CNS incluyen la determinación de la eficacia, dosificación y forma de administración, se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, solicitud de patente US n°. 60/664,728 solicitada el 24 de marzo 2005, y solicitud de patente US n°. 09/973,375, solicitada el 9 de octubre 2001. Cualquier protocolo terapéutico o régimen para la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de progesterona para el tratamiento de una herida isquémica o traumática del CNS se pueden utilizar en combinación con el método de administración reducida de la presente invención.

[0027] En una forma de realización de la invención, los métodos de administración reducida de la presente invención se usan en combinación con la administración de progesterona al menos una vez al día, incluyendo la administración una o varias veces al día. La duración del tratamiento puede ser de una vez al día para un periodo de dos a tres semanas y puede continuar por un periodo de meses o incluso años. La dosis diaria puede ser administrada bien en una única dosis en forma de una unidad de dosificación individual o en diferentes unidades de dosificación más pequeñas o por administración múltiple de dosificaciones subdivididas en intervalos determinados.

[0028] Por ejemplo, una unidad de dosificación se puede administrar de sobre 0 horas a 1 hr, sobre 1 hr a 24 horas, sobre 1 a 72 horas, sobre 1 a 120 horas, o sobre 24 horas hasta por lo menos 120 horas después de la herida. Alternativamente, la unidad de dosificación se puede administrar sobre 0,5,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11, 12,13, 14,15,16, 17, 18, 19,20, 21, 22, 23, 24, 30, 40, 48, 72, 96, 120 horas o más después de la herida. Unidades de dosificación posteriores pueden ser administradas en cualquier momento después de la administración inicial de manera que se consigue un efecto terapéutico. Por ejemplo, unidades de dosificación adicionales se pueden administrar para proteger al paciente de la onda secundaria de edema que puede ocurrir durante los primeros días después de la herida.

[0029] En otra forma de realización de la invención, los métodos de administración reducida de la presente invención se usan en combinación con un régimen de dosificación de progesterona constante. Por "régimen de dosificación de progesterona constante" se entiende que al paciente que experimenta la terapia con la progesterona o progestina sintética se le administra una dosis constante total por hora de la progesterona o progestina sintética sobre el curso del tratamiento. Esta dosis por hora de la progesterona se divide en una serie de dosis equivalentes que se administran según un horario de dosificación apropiado dependiendo del método de administración. La duración del régimen de dosificación de progesterona constante es sobre 12, 24, 36, 60, 72, 84, o 120 horas o sobre 1 a 24 horas, sobre 12 a 36 horas, sobre 24 a 48 horas, sobre 36 a 60 horas, sobre 48 a 72 horas, sobre 60 a 96 horas, sobre 72 a 108 horas, sobre 96 a 120 horas, o sobre 108 a 136 horas.

[0030] En otras formas de realización de la invención, los métodos de administración reducida de la presente invención se usan en combinación con un "régimen de dosificación de progesterona de dos niveles". Por "régimen de dosificación de progesterona de dos niveles" se entiende que al paciente que experimenta la terapia con la progesterona se le administra la progesterona durante periodos de dos tiempos de dosificación de progesterona. Los periodos de dos tiempos pueden tener una duración combinada de aproximadamente 12 horas a alrededor de 7 días, incluyendo, 1, 2, 3, 4, o 5 días o sobre 15, 15, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, o 144 horas o sobre 1 a 24 horas, sobre 12 a 36 horas, sobre 24 a 48 horas, sobre 36 a 60 horas, sobre 48 a 72 horas, sobre 60 a 96 horas, sobre 72 a 108 horas, sobre 96 a 120 horas, o sobre 108 a 136 horas. En una forma de realización, el régimen de dosificación de progesterona de dos niveles tiene una duración combinada de aproximadamente 1 día a alrededor de 5 días; en otras formas de realización, el régimen de dosificación de progesterona de dos niveles tiene una duración combinada de aproximadamente 1 día a alrededor de 3 días.

[0031] En una forma de realización, la dosis total por hora de la progesterona que debe ser administrada durante los primeros y segundos periodos de tiempo del régimen de dosificación de progesterona de dos niveles se elige de manera que una dosis total por hora de la progesterona más alta se da durante el primer periodo de tiempo y una dosis total por hora de la progesterona menor se da durante el segundo periodo de tiempo. La duración individual de los primeros y segundos periodos de tiempo del régimen de dosificación de progesterona de dos niveles pueden variar, dependiendo de la salud del individuo y la historia de la herida isquémica o traumática. Generalmente, al paciente se le administra una dosis de progesterona total por hora mayor durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 o 24 horas fuera del día 1 al día 5 del régimen de dosificación de progesterona de dos niveles. La longitud del segundo periodo de tiempo se puede ajustar por consiguiente, y oscila, por ejemplo, de sobre 12 hrs, 24 hrs, 36 hrs, 48 hrs, 60 hrs, 72 hrs, 84 hrs, 96 hrs, 108 hrs, 120 hrs o sobre 12 a sobre 36 hrs, sobre 24 a sobre 36 hrs, sobre 24 a sobre 48 hrs, sobre 36 hrs a sobre 60 horas, sobre 48 hrs a sobre 72 hrs, sobre 60 hrs a sobre 84 horas, sobre 72 hrs a sobre 96 hrs, o sobre 108 hrs a sobre 120 hrs. Así, por ejemplo, donde el régimen de dosificación de progesterona de dos niveles tiene una duración combinada de 3 días, las dosis totales de la progesterona más altas podrían ser administradas para la primera hora y la dosis total por hora de la progesterona menor podría ser administrada de 2 a 72 horas.

[0032] En todavía más formas de realización, la dosis total por hora de progesterona que debe ser administrada

durante los primeros y segundos periodos de tiempo del régimen de dosificación de progesterona de dos niveles se elige de manera que una dosis por hora menor de la progesterona se da durante el primer periodo de tiempo y una dosis por hora mayor de la progesterona se da durante el segundo periodo de tiempo.

5 [0033] Área bajo la curva (AUC) se refiere al área bajo la curva que sigue la concentración de suero (nmol/l) de la progesterona sobre un tiempo dado que sigue la administración del estándar de referencia de progesterona. Por "estándar de referencia de progesterona" se entiende la formulación de progesterona que sirve como base para la determinación de la dosis total por hora de progesterona que va a ser administrada a un paciente humano con una herida isquémica o traumática del sistema nervioso central, conforme a la constante deseada o al régimen de dosificación de progesterona de dos niveles para conseguir el efecto positivo deseado, es decir, una respuesta positiva terapéutica que es mejor con respecto a la que se observa sin administración de la progesterona. Por consiguiente, la dosis total por hora de progesterona que va a ser administrada durante el régimen de dosificación constante o de dos niveles de progesterona pueden, por lo tanto, permitir una concentración sérica final de la progesterona de aproximadamente 100 ng/ml a 1000 ng/ml, sobre 1100 ng/ml a 1450 ng/ml, 100 ng/ml a sobre 250 ng/ml, sobre 200 ng/ml a 350 ng/ml, sobre 300 ng/ml a 450 ng/ml, sobre 400 ng/ml a 550 ng/ml, sobre 500 ng/ml a 10 ng/ml, sobre 600 ng/ml a 750 ng/ml, sobre 700 ng/ml a 850 ng/ml, sobre 800 ng/ml a 950 ng/ml, sobre 900 ng/ml a 1050 ng/ml, sobre 1000 ng/ml a 1150 ng/ml, sobre 1100 ng/ml a 1250 ng/ml, sobre 1200 ng/ml a 1350 ng/ml, sobre 1300 ng/ml a 1500 ng/ml. En formas de realización específicas, la concentración sérica de la progesterona o progestina sintética comprende sobre 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml, 900 ng/ml, 1200 ng/ml, 1400 ng/ml, 1600 ng/ml.

20 [0034] Los métodos de administración reducida de la presente invención también contemplan formas de realización en las que a un paciente que experimenta una terapia de progesterona constante o un régimen de dosificación de progesterona de dos niveles se le da un periodo de tiempo fuera de dosificación de progesterona. Por ejemplo, cuando un régimen de dosificación de progesterona se realiza, el periodo de tiempo fuera de la progesterona puede ocurrir entre la conclusión del primer periodo de tiempo del régimen de dosificación de progesterona de dos niveles y el inicio del segundo periodo de tiempo del régimen de dosificación de progesterona de dos niveles. Por ejemplo, uno podría contemplar el primer periodo de tiempo administrado en un ajuste prehospital, por ejemplo, en el área del traumatismo. El segundo periodo de tiempo podría iniciarse después de la llegada a un hospital. En estas formas de realización, el régimen de dosificación de progesterona de dos niveles se interrumpe de manera que la dosificación de progesterona se detiene durante un periodo de aproximadamente 15 minutos, 30 minutos, 1 hr, 2 hrs, 3 hrs, 4 hrs.5 hrs, 6 hrs o más.

35 [0035] Si un paciente que experimenta la terapia conforme a los regímenes de dosificación mencionados previamente muestra una respuesta parcial, o una recaída después de la finalización de la terapia, cursos posteriores de progesterona o terapia de progestina sintética se pueden necesitar para conseguir una respuesta terapéutica parcial o completa. Así, después de un periodo temporal fuera del tratamiento, que puede haber comprendido un régimen de dosificación de progesterona constante o un régimen de dosificación de progesterona de dos niveles, un paciente puede recibir uno o más periodos de tratamiento adicionales que comprenden o bien regímenes de dosificación de progesterona constantes o de dos niveles. Este periodo temporal fuera de entre periodos de tratamiento se denomina en este caso como un periodo de tiempo de discontinuación. Se reconoce que la longitud del periodo de tiempo de discontinuación depende del grado de respuesta del paciente (es decir, completo frente a parcial) conseguido con cualquier periodo de tratamiento previo a la terapia de progesterona. También se conoce que antes de un periodo temporal fuera o discontinuación, la administración de la terapia de progesterona se puede reducir.

45 [0036] Para el uso con los métodos de administración reducida de la presente invención, sesiones de tratamiento múltiples se denominan en este caso como ciclos de mantenimiento, en los que cada ciclo de mantenimiento comprende un régimen de dosificación completado. Por "régimen de dosificación de dos niveles completado" se entiende que al paciente se le ha administrado el primer periodo y el segundo periodo de dosificación de progesterona. La necesidad para ciclos de mantenimiento múltiples se puede evaluar controlando la mejora conductual y fisiológica del paciente. La duración entre ciclos de mantenimiento puede ser sobre 1 hr, 15 hrs, 1 día, 2 día, 3 día, 4 día, 5 día, 6 día u otra caída de periodos de tiempo de este tipo en el intervalo de sobre 1 día a 14 días.

55 [0037] En los métodos de administración reducida de la presente invención, la progestina puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable orgánico o inorgánico, sólido o líquido. El portador puede también contener conservantes, agentes de humidificación, emulsionantes, agentes de solubilización, agentes estabilizantes, tampones, solventes y sales. Las composiciones se pueden esterilizar y existir como sólidos, particulantes o polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones. Además de los ingredientes mencionados, las composiciones de la invención pueden incluir además uno o más ingredientes de accesorio seleccionados del grupo que consiste en diluyentes, tampones, agentes aromatizantes, ligantes, desintegrantes, agentes activos de superficie, espesantes, lubricantes, conservantes (antioxidantes incluidos) y similares.

60 [0038] La progesterona se puede formular según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, tales como por la mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Vehículos adecuados y su formulación se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (16th ed., Osol, A. (ed.), Mack, Easton PA (1980). Para formar una composición farmacéuticamente aceptable adecuada

para una administración eficaz, estas composiciones contendrán una cantidad eficaz de la progestina o metabolito progestínico, bien solo, o con una cantidad adecuada de portador de vehículo.

5 [0039] El portador farmacéuticamente aceptable variará dependiendo del método de administración del fármaco y puede ser, por ejemplo, bien un sólido, líquido, o un tiempo de liberación. Portadores sólidos representativos son lactosa, terra alba, talco de sacarosa, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico, celulosa microcristalina, hidrogeles poliméricos y similares. Portadores líquidos típicos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, ciclodextrina y emulsiones similares. Los expertos en la técnica están familiarizados con soportes apropiados para cada uno de los métodos que se utilizan comúnmente para la administración. Además, se reconoce que la cantidad total de progestina o metabolito progestínico administrado como una dosis terapéutica efectiva dependerá de la composición farmacéutica que se administra (es decir, el portador que se usa) y del modo de administración.

15 [0040] Composiciones en los métodos de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, rectal, tópica, nasal, oftálmica, o parenteral (incluyendo intraperitoneal intravenosa subcutánea, o inyección intramuscular). Las composiciones pueden ser presentadas convenientemente en forma de dosificación unitaria y se puede preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen el paso de llevar el agente activo en la asociación con un portador que constituye uno o más ingredientes de accesorio. En general, las composiciones se preparan uniformemente e íntimamente llevando el compuesto activo en la asociación con un portador líquido, un soporte sólido finamente dividido o ambos y, luego, si es necesario, un modelado del producto en formulaciones deseadas.

20 [0041] Composiciones para administración oral se pueden presentar como unidades específicas, como cápsulas, sellos, comprimidos, pastillas y similares, cada con una cantidad predeterminada del agente activo como un polvo o gránulos; o una suspensión en una solución acuosa o líquido no acuoso, como un jarabe, un elixir, una emulsión, una sequía y similares. Una manera de hacer una pastilla por compresión o moldeo, opcionalmente uno o

25 [0042] Una pastilla puede hacerse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes de accesorio. Los comprimidos se pueden preparar por compresión en una máquina adecuada, con el compuesto activo que es en una forma de flujo libre, como un polvo o gránulos que opcionalmente se mezclan con un ligante, desintegrante, lubricante, diluyente inerte, agente activo de superficie o agente de dispersión. Comprimidos moldeados comprendidos con un portador adecuado pueden hacerse por moldeo en una máquina adecuada

30 [0043] Un jarabe puede hacerse añadiendo el compuesto activo a una solución acuosa concentrada de azúcar, por ejemplo, sacarosa, a lo que pueden también añadirse cualquier ingrediente de accesorio. Estos ingredientes de accesorio pueden incluir aromatizantes, conservantes adecuados, un agente para retardar la cristalización del azúcar y un agente para aumentar la solubilidad de cualquier otro ingrediente, como alcohol polihídrico, por ejemplo, glicerol o sorbitol.

35 [0044] Formulaciones adecuadas para administración parental comprenden convenientemente una preparación estéril acuosa del compuesto activo, que puede ser isotónica con la sangre del receptor.

[0045] Formulaciones de spray nasal comprenden soluciones acuosas purificadas del agente activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Estas formulaciones se ajustan preferiblemente a un pH y estado isotónico compatible con las membranas mucosas.

40 [0046] Formulaciones para administración rectal se pueden presentar como supositorio con un portador adecuado, como manteca de cacao, o grasas hidrogenadas o ácidos grasos carboxílicos hidrogenados.

[0047] Formulaciones oftálmicas se preparan por un método similar al spray nasal, excepto que el pH y los factores isotónicos se ajustan preferiblemente para corresponder con el del ojo.

45 [0048] Formulaciones tópicas comprenden el compuesto activo disuelto o suspendido en uno o más medios, tales como aceite mineral, petróleo, alcoholes polihidroxi u otras bases usadas para formulaciones tópicas. La adición de otros ingredientes de accesorio puede ser deseable como se ha indicado anteriormente.

50 [0049] Además, composiciones para uso en métodos de la presente invención incluyen formulaciones liposómicas. La tecnología para formar suspensiones liposómicas es bien conocida en la técnica. Cuando la sal de progesterona es una sal soluble en agua, por medio de tecnología de liposoma convencional, éste se puede incorporar en vesículas lípidas. En este ejemplo, debido a la solubilidad del agua del compuesto o de la sal, el compuesto o la sal serán arrastrados sustancialmente en el centro hidrofílico o en el núcleo de los liposomas. El estrato lípido empleado pueden ser cualquier composición convencional y puede contener colesterol o puede ser sin colesterol. Cuando el compuesto o sal de interés es insoluble en agua, nuevamente utilizando tecnología de formación de liposoma convencional, la sal puede ser arrastrada sustancialmente en la doble capa de lípido hidrofóbico que forma la estructura del liposoma. En ambos casos, los liposomas que se producen se pueden reducir en tamaño, a través del uso de técnicas de sonicación estándar y de homogenización. Las formulaciones liposómicas que contienen la progestina o metabolito progestínico o sales derivadas, se pueden liofilizar para producir un liofilizado que se puede reconstruir con un portador farmacéuticamente aceptable, como agua, para regenerar una suspensión liposómica.

[0050] Formulaciones farmacéuticas en los métodos de la presente invención también incluyen los que se adecuan para la administración, como un aerosol, por inhalación. Estas formulaciones comprenden una solución o

suspensión de la progestina deseada o metabolito progestínico o un derivado de sal o una pluralidad de partículas sólidas del compuesto o sal. La formulación deseada se puede colocar en una pequeña cámara y pulverizarse. La pulverización se puede realizar por aire comprimido o por energía ultrasónica para formar una pluralidad de gotitas líquidas o partículas sólidas que comprenden los compuestos o sales.

5 [0051] Más formulaciones farmacéuticas en los métodos de la presente invención incluyen preparaciones de liberación controladas. Estas preparaciones de liberación controladas se pueden conseguir con el uso de polímeros para formar complejos o absorber la progestina o metabolito progestínico. La entrega controlada se puede ejercer por macromoléculas apropiadas de selección (por ejemplo, poliésteres, ácidos poliamínicos, polivinilpirrolidona, etileno-vinilacetato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o sulfato de protamina). El índice de liberación del fármaco
10 puede también controlarse alterando la concentración de estas macromoléculas.

[0052] Otro método posible para el control de la duración de acción comprende incorporar los agentes terapéuticos en partículas de una sustancia polimérica, como, por ejemplo, poliésteres, ácidos poliamínicos, hidrogeles, poli(ácido láctico) o copolímeros de etileno vinilacetato. Alternativamente, es posible entrapar los agentes terapéuticos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo,
15 por el uso de celulosa hidroximetilica o microcápsulas de gelatina o microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, o en un sistema de administración de medicamentos de coloide, por ejemplo, liposomas, albúmina, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas, o en macroemulsiones. Estas instrucciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (1980).

[0053] En los métodos de la presente invención, composiciones que comprenden una concentración terapéuticamente eficaz de progesterona pueden ser administradas usando cualquier método aceptable conocido en la técnica. Así, por ejemplo, la composición farmacéutica que comprende progesterona se puede administrar por métodos que incluyen, intravenoso (IV) intramuscular (IM), subcutáneo (SC), intraperitoneal transdérmico bucal, vaginal, o administración intracerebroventricular. Cuando se administra por vía intravenosa, la composición farmacéutica que comprende progesterona se puede administrar por infusión sobre un periodo de aproximadamente
20 1 a 120 horas. En algunas formas de realización, la infusión de progesterona ocurre sobre un periodo de aproximadamente 24 a 72 horas, sobre un periodo de aproximadamente 48 a 96 horas, o sobre un periodo de aproximadamente 24 a 120 horas.

[0054] Una forma de realización de la presente invención se refiere a la administración de una progesterona o derivado análogo vía administración IV en una dosis de aproximadamente 0,1 ng a 100 g por kg de masa corporal, sobre 10 ng a 50 g por kg de masa corporal, de sobre 100 ng a 1 g por kg de masa corporal, de sobre 1 µg a 100 mg por kg de masa corporal, de sobre 1 µg a 50 mg por kg de masa corporal, de sobre 1 mg a 500 mg por kg de masa corporal; y de sobre 1 mg a 50 mg por kg de masa corporal. Alternativamente, la cantidad de progesterona administrada para conseguir una dosis terapéutica efectiva es sobre 0,1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 µg, 10 µg, 100 µg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 500 mg por kg de masa corporal o superior.
30 35

[0055] En otra forma de realización de la presente invención, se refiere a la administración de progesterona vía administración parenteral en una dosis de aproximadamente 0,1 ng a 100 g por kg de masa corporal, sobre 10 ng a 50 g por kg de masa corporal, de sobre 100 ng a 1 g por kg de masa corporal, de sobre 1 µg a 100 mg por kg de masa corporal, de sobre 1 µg a 50 mg por kg de masa corporal, de sobre 1 mg a 500 mg por kg de masa corporal; y de sobre 1 mg a 50 mg por kg de masa corporal. Alternativamente, la cantidad de progesterona administrada para conseguir una dosis terapéutica efectiva es sobre 0,1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 µg, 10 µg, 100 µg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 500 mg por kg de masa corporal o superior.
40

[0056] En más formas de realización de la presente invención, los métodos de administración reducida de la invención se usan en combinación con la progesterona usada y al menos un agente neuroprotector adicional para mejorar la neuroprotección después de una herida traumática o isquémica del CNS. Agentes neuroprotectores de interés incluyen, por ejemplo, compuestos que reducen la excitotoxicidad del glutamato y mejoran la regeneración neuronal. Estos agentes pueden seleccionarse de, pero no limitado a, el grupo que comprende factores de crecimiento. Por "factor de crecimiento" se entiende una molécula de señalización de polipéptido extracelular que estimula a una célula para que crezca o prolifere. Factores de crecimiento preferidos son aquellos a los que responden un intervalo amplio de tipos celulares. Ejemplos de factores de crecimiento neurotróficos incluyen, pero no limitan a, elementos de la familia del factor de crecimiento del fibroblasto, tales como el factor de crecimiento de fibroblasto básico (BFGF) (Abraham et al. (1986) Science 233:543-48), el factor de crecimiento de fibroblasto ácido (aFGF) (Jaye et al. (1986) Science 233:541-45), el hst/Krgf ne producto, FGF-3 (Dickson et al. (1987) Nature 326-833), FGF-4 (Zhan et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3487-3495), FGF-6 (delapeiriere et al. (1990) Oncogene 5:823-831), el factor de crecimiento del queranócito (KGF) (Finch et al. (1989) Science 245:752-755) y el factor de crecimiento inducido con andrógeno (AIGF) (Tanaka et al. (1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:8928-8923).
45 50 55

[0057] Agentes neuroprotectores adicionales incluyen, factor ciliar neurotrófico (CNTF), factor de crecimiento de nervio (NGF) (Seiler, M. (1984) Brain Research 300:33-39; Hagg T. et al. (1988) Exp Neurol 101:303-312; Kromer L. F. (1987) Science 235:214-216; y Hagg T. et al. (1990) J. Neurosci 10(9):3087-3092), factor derivado neurotrófico de cerebro (BDNF) (Kiprianova, I. et al. (1999) J. Neurosci. Res. 56:21-27), neurotrofina 3 (NT3), neurotrofina 4 (NT4),
60

- factor- β 1 de crecimiento de transformación (TGF- β 1) (Henrick-Noack, P. et al. (1996) *Stroke* 27:1609-14), proteína morfogénica de hueso (BMP-2) (Hattori, A. et al. (1999) *J. Neurochem.* 72:2264-71), factor derivado neurotrófico de línea de célula glial (GDNF) (Miyazaki, H. et al. (1999) *Neuroscience* 89:643-7), factor dependiente de actividad neurotrófico (ADNF) (Zamostiano, R. et al. (1999) *Neurosci Letter* 264: 9-12), factor de inhibición de leucemia de citocina (LIF) (Blesch, A. et al. (1999) *J. Neurosci.* 19:3356-66), oncostatina M, interleuquina, y los factores de crecimiento de tipo insulina 1 y 2.
- [0058] Otras formas de agentes neuroprotectores terapéuticos incluyen, por ejemplo, clometiazol (Zendra) (Marchal, J.W. et al. (1999) *Exp. Neurol.* 56:121-9); ácido quinurénico (KYNA) (Salvati, P. et al. (1999) *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 23:741-52), Semax (Miasoedova, N. F. et al. (1999) *Zh Nevrol Psikhiatr Imss Korsakova* 99:15-19), FK506 (tacrolimus) (Gold, B.G. et al. (1999) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289:1202-10), L-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3- morfolino-1-propanol (Inokuchi, J. et al. (1998) *Act Biochim Pol* 45:479-92), análogo de andrenocorticotropin-(4-9) (ORG 2766) y dizolcipina (MK-801) (Herz, R. C. et al. (1998) *Eur J. Pharmacol* 346:159-65), cerebral interleukina-6(Loddick, S.A. et al. (1998) *J. Cereb Blood Flow Metab* 18:176-9), selegilina (Semkova, L et al. (1996) *Eur J. Pharmacol* 315:19-30), MK-801 (Barth, A. et al. (1996) *Neuro Report* 7:1461-4) antagonista de glutamato, tal como NPS 1506; GV1505260; MK801 (Baumgartner, W.A. et al.(1999) *Ann Thorac Surg* 67:1871-3), GV150526 (Dyker, A.G. et al. (1999) *Stroke*30:986-92); AMPA antagonista, tal como NBQX (Baumgartner, W.A. (1999) et al. *Ann Thorac Surg* 67:1871-3) PD152247 (PNQX) (Schielke, G.P. et al. (1999) *Stroke* 30:1472-7), SPD 502 (Nielsen, E.O. et al. (1999) *J. Pharmacol Exp Ther* 289:1492-501), LY303070 y LY300164 (May, P.C. et al. (1999) *Neuroscience Lett* 262:219-221).
- [0059] Donde los métodos de administración reducida de la invención se usan en combinación con el uso de progesterona y al menos un agente neuroprotector adicional para mejorar la neuroprotección después de una herida isquémica o traumática del CNS, se reconoce que incluso menos progesterona se puede requerir para ser terapéuticamente eficaz.
- [0060] Los métodos de la presente invención encuentran uso en el tratamiento de una herida isquémica o traumática del sistema nervioso central. Métodos para cuantificar la extensión del daño del sistema nervioso central (es decir, neurodegeneración) y para determinar si el daño neuronal fue evitado o tratado después de la administración de una progestina o metabolito progestínico son bien conocidos en la técnica. Estos efectos neuroprotectores se pueden evaluar a varios niveles, incluyendo, por ejemplo, por promoción morfológica y conductual (es decir, viabilidad del tejido de mejora) recuperación después de traumatismo cerebral isquémico o traumático. Una variedad de ensayos anatómicos, inmunocitoquímicos e inmunológicos para determinar el efecto de la progestina o metabolito progestínico en la necrosis, apoptosis y reparación neuronal de neuroglía se conocen en la técnica. Como tal, la neuroprotección resultante de los métodos de la presente invención supondrá un aumento en al menos alrededor de un 10% a 20%, 20% a 30%, 30% a 40%, 40% a 60%, 60% a 80% o un aumento superior en la supervivencia neuronal y/o recuperación conductual en comparación con los grupos de control.
- [0061] Ensayos marcadores moleculares e histológicos para un aumento en la supervivencia neuronal son conocidos. Por ejemplo, la proteína asociada de crecimiento 43 (GAP-43) se puede usar como un marcador para el crecimiento axonal nuevo después de un ataque al CNS. Ver, por ejemplo, Stroemer et al. (1995) *Stroke* 26:2135-2144, Vaudano et al. (1995) *J. of Neurosci.* 15:3594-3611. Otros marcadores histológicos pueden incluir una reducción en la astrogliosis y microgliosis. Alternativamente, un retraso en la muerte celular puede ser evaluada usando etiquetado TUNEL en el tejido deteriorado. Más medidas anatómicas que pueden utilizarse para determinar un aumento en la neuroprotección incluyen contar los tipos específicos de célula neuronal para determinar si la progestina o metabolito progestínico preservan preferentemente un tipo de célula particular (p. ej., células colinérgicas) o neuronas en general.
- [0062] Además, ensayos conductuales pueden utilizarse para determinar el índice y la extensión del comportamiento de la recuperación en la respuesta al tratamiento. Habilidades motoras del paciente mejoradas, rendimiento de aprendizaje espacial, función cognitiva, percepción sensorial, habla y/o una reducción en la propensión al ataque pueden usarse también para medir el efecto neuroprotector. Estas pruebas funcional/conductuales usadas para valorar la función sensomotriz y de reflejo se describen en, por ejemplo, Bederson et al. (1986) *Stroke* 17:472-476, DeRyck et al. (1992) *Brain Res.* 573:44-60, Markgraf et al. (1992) *Brain Res.* 575:238-246, Alexis et al. (1995) *Stroke* 26:2336-2346; todos lo cuales se incorporan aquí como referencia. El realce de supervivencia neuronal puede también medirse usando la Escala Escandinava de Ictus (SSS) o el índice de Barthel. La recuperación conductual puede ser evaluada además usando las recomendaciones de la Subcomisión del NIH/NINDS Head Injury Centers in Humans (Hannay et al. (1996) *J. Head Trauma Rehabil.* 11:41-50), se incorpora aquí como referencia. La recuperación conductual puede ser evaluada también usando los métodos descritos en, por ejemplo, Beaumont et al. (1999) *Neurol. Res.* 21:742-754; Becker et al. (1980) *Brain Res.* 200:07-320; Buresov et al. (1983) *Techniques and Basic Experiments for the Study of Brain and Behavior*; Kline et al. (1994) *Pharmacol. Biochem. Behav.* 48:773-779; Lindner et al. (1998) *J. Neurotrauma* 15:199-216; Morris (1984) *J. Neurosci. Methods* 11:47-60; Schallert et al. (1983) *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18:753-759.
- [0063] Es reconocido que una herida traumática al CNS provoca múltiples eventos fisiológicos que impactan la extensión y el índice de neurodegeneración y, de este modo, el resultado clínico final de la herida. El tratamiento de una herida traumática al CNS, tal y como se define por la presente invención, abarca cualquier reducción y/o prevención en uno o más de los varios eventos fisiológicos que siguen al impacto inicial. Por lo tanto, los métodos de

la invención encuentran uso en la reducción y/o prevención de eventos fisiológicos que conducen a neurodegeneración después de una herida traumática al sistema nervioso central.

5 [0064] Por ejemplo, el edema cerebral se desarrolla frecuentemente después de una herida traumática al CNS y es una causa avanzada de muerte e incapacidad. Las contusiones corticales, por ejemplo, producen aumentos masivos en el contenido de agua del tejido cerebral que, a su vez, pueden provocar una presión intracraneal aumentada que conduce a un flujo sanguíneo cerebral reducido y pérdida adicional neuronal. Por lo tanto, los métodos de la invención encuentran uso en la reducción y/o eliminación del edema cerebral y/o reducir la duración del evento edémico después de una herida traumática al CNS. Ensayos para determinar una reducción en el edema se conocen en la técnica e incluyen, pero de forma no limitativa, una reducción en el contenido de agua del tejido 10 después de la administración de la progestina o metabolito progestínico (Betz et al. (1990) *Stroke* 21:1199-204, se incorpora aquí como referencia). Además, una mejora total en la recuperación conductual también puede usarse como una medida para una reducción en el edema. Una reducción en el edema en el tejido afectado en al menos alrededor de un 15% a 30%, sobre 30% a 45%, sobre 45% a 60%, sobre 60% a 80%, o sobre 80% a 95% o superior será terapéuticamente provechoso, como cualquier reducción en la duración del evento edémico.

15 [0065] Edema vasogénico después de un daño cerebral traumático ha sido asociado a daño a la vasculatura y rotura de la barrera hematoencefálica (BBB) (Duvdevani et al. (1995) *J. Neurotrauma* 12:65-75, incorporado aquí como referencia). La progesterona ha mostrado reducir la permeabilidad del BBB a macromoléculas, pero no a iones, tal como sodio in vitro (Betz et al. (1990) *Stroke* 21:1199-204; Beta et al. (1990) *Acta. Neurochir. Suppl.* 51:256-8;). Por lo tanto, los métodos de la invención encuentran uso en la reducción o eliminación del edema vasogénico después 20 de un daño cerebral traumático.

Ensayos para determinar una reducción en el edema vasogénico se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, una reducción en la extravasación de azul de Evans después de contusión cortical (Roof et al. (1994) *Society for Neuroscience* 20:91).

25 [0066] Más efectos fisiológicos de un daño cerebral traumático incluyen una respuesta inmunitaria. Ver, por ejemplo, Soares et al. (1995) *J. Neurosci.* 15:8223-33; Holmin et al. (1995) *Acta Neurochir.* 132:110-9; Arvin et al. (1996) *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20:445-52. Después de un impacto cortical, ocurren reacciones inflamatorias severas y gliosis en el área del impacto y a distal de áreas del cerebro en el área primaria de la herida. La respuesta inflamatoria se caracteriza por la expresión de moléculas de adhesión en las superficies vasculares, como resultado de la adherencia de células inmunitarias y extravasación posterior en la parénquima del cerebro. Por medio de 30 citocinas de liberación, los macrófagos de invasión y neutrófilos estimulan la astrocitosis reactiva. La liberación de diferentes quimiocinas por otros tipos celulares induce a estas células inmunitarias a hacerse fagocíticas, con la liberación simultánea de radicales libres y compuestos proinflamatorios, por ejemplo, citocinas, prostaglandinas y excitotoxinas (Arvin et al. (1996) *Neurosci. Biobehav. Ref.* 20:445-52; Raivich et al. (1996) *Kelo J. Med.* 45:239=47; Mattson et al. (1997) *Brain Res. Rev.* 23 :47-61).

35 [0067] Los métodos de la invención proporcionan unos medios para reducir o eliminar las reacciones inflamatorias inmunitarias después de una herida traumática del CNS. Además, reduciendo la respuesta inflamatoria después de una herida, la progestina o metabolito progestínico de la presente invención pueden reducir sustancialmente la hinchazón cerebral y la presión intracraneal y reducir la cantidad de sustancias neurotóxicas (p. ej., radicales libres y excitotoxinas) que son liberadas. Por lo tanto, reduciendo la respuesta inmuno/inflamatoria que después una herida 40 traumática al CNS, la supervivencia neuronal y/o la recuperación conductual mejorarán.

[0068] Ensayos que pueden utilizarse para determinar si la progestina o el metabolito progestínico de la invención están impartiendo un anti-inflamatorio y un efecto supresor no específico en el sistema inmunológico después de una herida traumática del CNS incluyen, por ejemplo, una reducción en la proliferación microglial inducida de citocina in vitro (Hoffman et al. (1994) *J. Neurotrauma* 11:417-31; Garcia-Estrada et al. (1993) *Brain Res.* 628:271-8); 45 una reducción en la generación de radicales citotóxicos libres por macrófagos activados (Chao et al. (1994) *Am. J. Reprod. Immunol.* 32:43-52; Robert et al. (1997) *Nitric Oxide* 1:453-62; Kelly et al. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239:557-61; Ganter et al. (1992) *J. Neurosci. Res.* 33:218-30; una reducción en la expresión de sintetasa de óxido nítrico inducible y la cantidad de liberación de óxido nítrico por macrófagos (Robert et al. (1997) *Nitric Oxide* 1:453-62; Miller et al. (1996) *J. Leukoc. Biol.* 59:442-50; la liberación de un "factor de bloqueo de progesterona inducida" que inhibe la actividad de la célula asesina natural (Cheek et al. (1997) *Am. J. Reprod. Immunol.* 37:17-20; Szekeres-Bartho et al. (1997) *Cell Immunol.* 177:194-9; Szekeres-Bartho et al. (1996) *Sen. J. Reprod. Immunol.* 35:348-51); una reducción en el número de astrocitos GFAP-positivos después de una herida del cerebro que es un indicio de daño secundario menor (Garcia-Estrada et al. (1993) *Brain Res.* 628:271-8; Garcia-Estrada et al. (1999) 50 *Int. J. Dev. Neurosci.* 17:145-51; Cheek et al. (1997) *Sen. J. Reprod. Immunol.* 37:17-20; Szekeres-Bartho et al. (1997) *Cell Immunol.* 177:194-9; Szekeres-Bartho et al. (1996) *Sen. J. Reprod. Immunol.* 35:348-51 ()); una reducción en el número de células inflamatorias inmunitarias (células OX42-positivas); una reducción en la pérdida de neuronas COX-positivas y chAT-positivas; una reducción en el número de neuronas MnSOD-positivas y TUNEL-positivas; y un aumento en la intensidad de succinato deshidrogenasa y actividad de citocromo-c-oxidasa.

60 [0069] Además, una reducción en las reacciones inflamatorias inmunitarias después de un daño cerebral traumático se puede evaluar midiendo el nivel de citocina después de la herida en los controles falsos contra sujetos tratados con progestina o con metabolito progestínico. Las citocinas son mediadoras de la inflamación y se liberan en concentraciones altas después de traumatismo cerebral. El nivel de citocinas proinflamatorias (p. ej., 1-beta de

interleuquina, factor de necrosis tumoral, e interleuquina 6) y el nivel de citocinas anti-inflamatorias (p. ej., interleuquina 10 y factor beta de crecimiento de transformación) pueden medirse. Por ejemplo, reacciones de cadena de polimerasa "real-time" (PCR) se pueden usar

5 para determinar niveles de proteína. Además, análisis histológico para tipos de célula inflamatoria diferentes (p. ej., astrocitos reactivos, macrófagos y microglia) pueden utilizarse para medir una reducción en la respuesta inflamatoria.

10 [0070] Otra consecuencia fisiológica de una herida traumática del CNS es un aumento en la peroxidación lipídica. Los métodos de la invención encuentran uso en la reducción en el daño de radical libre y, además, en disminuir o eliminar la peroxidación lipídica. Este efecto puede ocurrir a través de un realce de sistemas de depuración de radical libre endógeno. Ensayos para medir una reducción en la peroxidación lipídica en el cerebro homogeneizado y en la mitocondria se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, el método de ácido tiobarbitúrico (Roof et al. (1997) Mol. Chem. Neuropathol. 31:1-11; Subramanian et al. (1993) Neurosci. Lett. 155:151-4; Goodman et al. (1996) J. Neurochem. 66:1836-44; Vedder et al. (1999) J. Neurochem. 72:2531-8 y varios sistemas generadores de radical libre in vitro. Además, alteraciones en los niveles de enzimas depuradoras de radical libre crítico, tal como glutatona mitocondrial, pueden ser evaluadas. Ver, por ejemplo, Subramanian et al. (1993) Neurosci. Lett. 155:151-4; y Vedder et al. (1999) J. Neurochem. 72:2531-8.

15 [0071] Además, macrófagos cultivados estimulados con citocina producen nitrito, superóxido y peróxido de hidrógeno. Ya que los macrófagos se conocen por ser muy activos entre 48 horas y siete días después de un daño cerebral traumático, una reducción en estas células reactivas reducirían el daño secundario a neuronas. Ver, por ejemplo, Fulop et al. (1992) 22nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience 18:178; Soares et al. (1995) J. Neurosci. 15:8223-33; Holmin et al. (1995) Acta Neurochir. 132:110-9.

20 [0072] Se reconoce que una herida isquémica al CNS provoca su propio conjunto de eventos fisiológicos que impactaron la extensión y el índice de neurodegeneración, y así el resultado clínico final del herida. El tratamiento de una herida isquémica al CNS, tal y como se define por la presente invención, abarca cualquier reducción y/o prevención en uno o más de los varios eventos fisiológicos que siguen a la interrupción inicial en el suministro de sangre. Por lo tanto, los métodos de la invención encuentran uso en la reducción y/o prevención de eventos fisiológicos que conducen o se asocian a neurodegeneración después de una herida isquémica al sistema nervioso central.

25 [0073] Como se describe en otra parte de este documento, la herida isquémica del CNS se une con determinados eventos fisiológicos que conducen a neurodegeneración incluyendo, por ejemplo, liberación o sobreexpresión de proteínas, como NSE, proteína básica de la mielina, GFAP, proteína S-100, y PKCg, estimulación de degradación de fosfolípidos de la membrana y acumulación de ácidos grasos libres posterior, fallo de energía debido a depleción de ATP, acidosis celular, liberación de glutamato y excitotoxicidad, influjo de iones calcio y generación de radicales libres. Ensayos para determinar una reducción y/o prevención de eventos fisiológicos que conducen o se asocian a neurodegeneración después de una herida isquémica del CNS pueden dirigirse midiendo cualquiera de estos eventos fisiológicos. Por ejemplo, ensayos para medir niveles de NSE, proteína básica de la mielina, GFAP, proteína S-100 y PKCg se conocen bien en la técnica (ver, por ejemplo, Missler et al. (1997) Stroke, 28:1956-1960; Shashoua et al. (1984) J. Neurochem., 42:1536-1541; y patente US n.º. 6,268,223; todos estos se incorporan aquí como referencia). Ensayos para medir una reducción en los niveles de suero de ácidos grasos se puede determinar por métodos bien conocidos en la técnica, tal como se enseñan en las patentes US Nos. 4,071,413, 5,512,429, 5,449,607; y 4,369, 250, todas éstas se incorporan aquí como referencia.

30 [0074] Otros ensayos para determinar una reducción y/o prevención de eventos fisiológicos que conducen o se asocian a neurodegeneración después de una herida isquémica del CNS pueden dirigirse hacia valoraciones clínicas, por ejemplo, una reducción en el área del infarto, masa corporal mejorada y resultados neurológicos mejorados. Estos ensayos clínicos se conocen por expertos en la técnica.

35 [0075] Ahora que está descrita generalmente esta invención, ésta se entenderá mejor como referencia para ciertos ejemplos específicos que se incluyen aquí sólo con fines de ilustración.

EXPERIMENTAL

Ejemplo 1: Efectos de la progesterona en el daño necrótico y anomalías conductuales provocadas por TBI

40 Métodos:

[0076] Ratas Sprague-Dawley macho (300 g) fueron alojadas individualmente en jaulas de alambre y se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuro inverso (0800 - 2000 h). Los animales fueron asignados a uno de cuatro grupos: (1) lesión (n=7); (2) lesión + 3 días de progesterona (LP3 n=7); (3) lesión + 5 días de progesterona (LP5 n=7); y (4) falso (n=8). Todos los procedimientos que implicaban animales se conformaron según las pautas establecidas en la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (U.S. Department of Health and Human Services, Pub n.º. 85-23, 1985) y aprobadas por el Institutional Animal Care and Use Committee de la Universidad de Emory.

45 [0077] Contusiones bilaterales del córtex medial prefrontal fueron creados por un dispositivo neumático impactador tal y como se describe anteriormente [40]. Brevemente, las ratas fueron anestesiadas con ketamina/xilazina (90 mg/mg/kg; 10 mg/kg) y colocadas en un aparato estereotáxico. Una craneotomía (diámetro 6 mm) se realizó sobre la

línea media del córtex prefrontal con centro en 1,5 mm AP a bregma. Después de eliminar el hueso, la punta del impactador (diámetro 5 mm) fue movido a +3,0 mm AP; 1,0 mm ML (de bregma) y controlado para un espaciado adecuado. El traumatismo fue producido por activación neumática del pistón para impactar -2,0 mm DV (de dura) a una velocidad de 3 m/s con un tiempo de contacto de cerebro de 0,5 segundos.

- 5 [0078] La progesterona se disolvió en el aceite de cacahuete (Sigma; 4mg/kg) y se administraron inyecciones a 1 y 6 horas de después de la herida y luego una vez al día durante 3 o 5 días consecutivos. Los animales de control recibieron inyecciones de vehículo a puntos de tiempo similares. Los animales fueron codificados con respecto a la cirugía y el tratamiento para prevenir sesgo del experimentador durante el análisis conductual y el examen histológico.
- 10 [0079] Veintiún días después de la cirugía, los animales fueron perfundidos con 100 ml de solución salina 0,1 M tamponada con fosfato (PBS; pH 7.4) seguido de 400 ml 4% paraformaldehído en tampón de fosfato 0,1 M (PB; pH 7,4). Después de la crioprotección en sacarosa 30%, secciones coronales 40- μ m de grosor se realizaron con un micrótopo refrigerante, inmediatamente se montaron sobre portaobjetos revestidos de gel y se marcaron con tionina para Nissl para determinar la colocación y la extensión de la herida.
- 15 [0080] Mediciones del área media del tamaño de la lesión fueron cuantificadas en secciones a 15 niveles de caudal de rostral distanciado 300 μ m aparte. El perímetro de la cavidad necrótica (incluyendo la penumbra dañada) fue trazada en imágenes digitalizadas usando el software Jandel Scientific SigmaScan calibrado para calcular el área en mm² para cada nivel trazado. Perímetros del cuerpo estriado y los ventrículos laterales también se trazaron y se cuantificaron áreas medias de 7 niveles de caudal de rostral (300 μ m aparte).
- 20 [0081] Las células se contaron en un microscopio Olympus BH-2 equipado con una rejilla de micrómetro de ocular (área de muestra = 40 μ m² a ampliación 400). Las cuentas bilaterales de las células de las neuronas de Nissl-teñido se hicieron en 3 secciones separadas en cada una de los siguientes áreas: (1) STR (+1,8 a +1,2 mm AP), (2) GP (-0,3 a -1,2 mm AP), (3) DMN (-2,3 a -2,9 mm AP), y (4) VMN (-2.3 a -2.9 mm AP). Sólo células con núcleos neuronales y membranas intactas fueron contadas como neuronas.
- 25 [0082] A Individuos con experiencia que fueron ciegos a condiciones de tratamiento del estudio se les llevó a cabo todos los análisis conductuales e histológicos. Todos los datos fueron evaluados para normalidad y homocedasticidad antes de ser analizados por análisis paramétrico de la varianza (ANOVA). Los resultados MWM se analizaron usando separado factorial mixto (4 grupos x 5 días), análisis de la varianza (ANOVA) en cada uno de los dos periodos de análisis de 5 días (adquisición y retención respectivamente). Resultados de la tarea BSN se
- 30 analizaron usando la ANOVA factorial mixta (4 grupos x 2 ensayos de después de la herida). Comparaciones histológicas en grabaciones de densitometría medias, mediciones de área y cuentas celulares se realizaron usando una ANOVA unidireccional. Todas las comparaciones entre grupos fueron hechas usando múltiples pruebas Tukey post-hoc ($p < ,05$), en las que la ANOVA total fue significativa ($p < 05$) entre grupos. Coeficientes r de Pearson se calcularon para determinar si las correlaciones significativas podrían ser detectadas entre histológico (p. ej., tamaño de lesión y densidad celular) y parámetros conductuales (p. ej., adquisición y retención de la tarea MWM y medidas de negligencia sensorial).
- 35 [0083] Empezando una semana después de la cirugía, la capacidad de aprendizaje espacial se evaluó en la tarea del laberinto de agua de Morris (MWM) descrita previamente. Cada animal fue evaluado durante un total de 10 días en dos bloques de prueba de 5 días (adquisición y retención respectivamente). Los animales se colocaron en la piscina (la nariz enfrente del muro de la piscina) en una de las cuatro posiciones determinadas de forma aleatoria (p.ej. N, S, E, O). A cada rata se le permitió nadar libremente en la piscina hasta encontrar la plataforma oculta o hasta que transcurrieran 90 segundos. Si un animal no encontró la plataforma en 90 segundos, se le guió manualmente hasta ésta. Una vez en la plataforma, se le permitió a los animales descansar durante 10 segundos y luego se sacaron de la piscina y se colocaron cerca de una lámpara calorífica para calentarse. Cada rata participó
- 45 en dos ensayos al día con un intervalo de 20 segundos entre pruebas (ITI). Las medidas dependientes para esta tarea fueron latentes para encontrar la plataforma oculta y la estrategia de nado (p. ej., porcentaje de tiempo consumido en los anillos internos vs. anillos externos). Las mediciones de la velocidad de nado se registraron a diario para delinear disfunción motora de degradación de aprendizaje.
- 50 [0084] La medidas de capacidades atencionales, usando una tarea de negligencia sensorial bilateral (BSN), se registraron un día antes de la cirugía (línea base) y en los días postoperatorios 6 y 20. Papeles adhesivos circulares (2 cm dia) se unieron a las áreas distal-radiales de cada pata y se registraron las latencias de las ratas para eliminar los estímulos. Cada rata participó en cuatro ensayos (2-min ITI) por periodo de análisis con una longitud de prueba máxima de 2 minutos. Si las ratas no eliminaron los discos adhesivos en la hora estándar, un estado latente total de 2 minutos fue registrado durante esta prueba.
- 55 Resultados:
- [0085] Histología. En la mayoría de los animales, el tejido necrótico se restringió principalmente al medial prefrontal y al córtex cingulado. No obstante, en algunos casos, el daño tisular más severo se extendió en el corpus callosum y la mayoría de los aspectos dorsales del tabique medial y el cuerpo estriado (datos no mostrados). Un importante efecto principal en la formación de cavidad necrótica se observó entre los tres grupos deteriorados, ($F_{2,19} = 3,57$, $P < ,05$). El análisis Turkey post-hoc reveló una reducción dependiente de la dosis en la formación de la cavidad necrótica. Datos no mostrados. Sobre todo, todos los animales que recibieron progesterona tendieron a tener
- 60

lesiones más pequeñas en comparación con los animales dañados que recibieron inyecciones de vehículo. No obstante, sólo 5 días de progesterona resultaron dar reducciones significativas en la formación de cavidad total necrótica ($P < ,05$). También se observó ampliación de los ventrículos laterales en todos los grupos dañados en comparación con animales de control ($F_{3,25} = 5,28$, $P < 01$) pero la progesterona no tuvo ningún efecto en esta medida. Datos no mostrados. Ningunas diferencias entre grupos fueron mostradas en medidas de área estriada media.

[0086] ANOVA unidireccional reveló un efecto principal de la densidad celular media entre grupos en el recuento tomado en el STR ($F_{3,25} = 15,58$, $P < ,01$), GP ($F_{3,25} = 4,47$, $P < ,01$), DMN ($F_{3,25} = 5,37$, $P < ,01$), y VMN ($F_{3,25} = 8,68$, $P < 01$). Resultados de pruebas Tukey post-hoc mostraron que ambos tratamientos LP3 y LP5 resultaron tener una importante reducción en la herida inducida por la pérdida neuronal en todas las regiones de cerebro examinado. No obstante, 5 días de progesterona fueron más eficaces que 3 días para atenuar la pérdida neuronal en el VMN, el área más distal a penumbra dañada. Datos no mostrados.

[0087] Análisis conductual. En la tarea MWM, todos los grupos dañados mostraron déficits en el rendimiento de aprendizaje espacial en comparación con animales de control durante la fase inicial de adquisición de 5 días ($F_{3,25} = 19,45$, $P < ,01$). No obstante, pruebas Tukey post-hoc detectaron un rendimiento de aprendizaje espacial mejorado en animales LP5, pero no en LP3, durante el segundo bloque de prueba de 5 días ($F_{3,25} = 6,76$, $P < ,01$). Datos no mostrados.

[0088] ANOVA reveló un importante efecto principal en los modelos de nado durante la adquisición ($F_{3,25} = 28,23$, $P < 01$) y la retención ($F_{3,25} = 12,25$, $P < 01$) de la tarea MWM. Datos no mostrados. Todos los animales dañados mostraron tigmotáxico sostenido (wall-hugging) modelos de nado durante el primer bloque de prueba MWM de 5 días. Pero una reducción del comportamiento tigmotáxico se observó en los animales tratados con LP5 en los últimos 2 días de la segunda fase del análisis MWM ($P > ,05$ en comparación con controles) correspondiente con la reducción en el estado latente para encontrar la plataforma observada en este grupo. No había ninguna diferencia entre grupos en las mediciones de velocidad de nado en cualquier día del análisis.

[0089] No había ninguna diferencia entre grupos en la línea base de las mediciones de negligencia sensorial registradas un día antes de cirugía. Un importante efecto principal entre grupos ($F_{3,25} = 6,17$, $P < 01$) se observó en resultados de la tarea BSN después de la contusión cortical controlada del córtex medial prefrontal. El análisis Tukey post-hoc mostró que sólo los animales tratados con LP3 fueron perjudicados en esta tarea en comparación con animales de control en los días 6 y 20 después del daño (datos no mostrados).

[0090] También detectamos correlaciones significativas entre medidas histológicas y el rendimiento en la tarea MWM. Específicamente, hubo una correlación positiva entre la formación de cavidad necrótica y el rendimiento MWM mejorado durante el segundo bloque de prueba de 5 días, lo que sugiere que lesiones más pequeñas produjeron la retención mejorada de esta tarea ($r_{21} = +,44$, $P < 05$). De forma similar, observamos una correlación negativa entre la densidad celular y el rendimiento de aprendizaje espacial durante la segunda fase del análisis MWM ($r_{21} = -,50$, $P < ,05$) que indica que la preservación neuronal mediada por la progesterona permitió una recuperación funcional mayor (datos no mostrados). Finalmente, no observamos correlaciones significativas entre el tamaño de lesión o la densidad celular y las medidas de negligencia sensorial.

Resumen:

[0091] La reducción de la formación de cavidad necrótica de la herida inducida proporciona evidencias de que una intervención neuroesteroide de después de la herida puede reducir el volumen de la lesión que sigue al TBI en este modelo animal. En el presente estudio, observamos una reducción en la formación de la cavidad necrótica dependiente de la dosis en los animales tratados con progesterona. Específicamente, mientras las cavidades necróticas en los cerebros de los animales tratados sólo con 3 días de progesterona (LP3) tendieron a ser más pequeñas que en los cerebros de animales deteriorados, sólo el régimen de tratamiento de 5 días (LP5) produjo lesiones significativamente más pequeñas. Nuestro estudio proporciona ahora la primera evidencia de que la progesterona también puede atenuar la pérdida de tejido TBI-inducido.

[0092] En nuestro estudio, la progesterona también protegió contra la pérdida secundaria de célula en las regiones del cerebro proximal (por ejemplo, STR) y distal (p. ej., GP, DMN, y VMN) de la zona de herida. De manera interesante, en el presente estudio, los días 3 y 5 de progesterona, el tratamiento redujo la pérdida neuronal en el STR, GP y DMN, pero sólo tratamientos LP5 produjeron reducciones significativas en la pérdida celular del VMN en comparación con controles no tratados.

[0093] Y, finalmente, en el presente estudio, todos los grupos dañados fueron perjudicados en la fase de adquisición del análisis MWM. Los animales LP5 mostraron una clara mejoría, aunque no se controlaron los niveles, en el rendimiento espacial durante la fase de retención de esta tarea. Correlaciones significativas fueron encontradas entre parámetros neuropatológicos (p. ej., formación de cavidad necrótica y preservación neuronal) y el rendimiento del MWM demuestra que las reducciones mediadas por la progesterona en el tamaño de la lesión de la muerte celular produjeron reducciones concomitantes en el estado latente para encontrar la plataforma.

Ejemplo 2: Curvas de respuesta de dosificación durante la recuperación conductual que sigue al TBI sobre administración de progesterona en el vehículo de ciclodextrina

Métodos:

[0094] La cirugía para inducir un daño cerebral traumático se realizó como se explica en el ejemplo 1. El análisis de comportamiento que usa el laberinto de agua de Morris se realizó como se explica en el ejemplo 1 y los métodos durante la eliminación del adhesivo táctico se realizaron.

5 Resultados:

[0095] Las figuras 1A y 1B demuestran que a dosis bajas y moderadas de progesterona (8 mg/kg y 16 mg/kg en un vehículo con ciclodextrina) se produce una mejora consistente en el rendimiento de laberinto de agua de Morris, mientras que una dosis alta de progesterona (32 mg/kg en un vehículo con ciclodextrina) no produce ningún efecto provechoso.

10 [0096] La tarea de eliminación adhesiva es una prueba para negligencia sensorial, la cual es un déficit primario por herida frontal. En esta tarea todas las dosis inicialmente producen recuperación conductual, no obstante, el grupo que recibió una dosis alta de progesterona degradó a niveles de control de lesión y a dosis moderada, que inicialmente a niveles de control de lesión mejoró a niveles similares el día 21 después de la herida. Ver figura 2.

Ejemplo 3: Retiro de progesterona reducida que aumenta la recuperación después de daño cerebral traumático

15 Métodos:

[0097] Ratas macho Sprague-Dawley recibieron o una herida de córtex medial frontal o una cirugía falsa. Inyecciones se dieron a 1 y 6 horas después de la herida y cada 24 horas durante 7 días. Los grupos de tratamiento (n=8) abarcaron deteriorado (I) y falso (S) tratamientos de retiro agudo (AW), de retiro reducido (TW) y de vehículo (V). Inyecciones TW se dividieron progresivamente sobre el final de los dos tratamientos. El análisis conductual fue
 20 conducido después de la cirugía, a retiro medio y después del retiro. Las jaulas de la actividad se usaron para indagar movimientos verticales y exploración. Negligencia sensorial y comportamientos de ansiedad fueron también analizados. La colecta de cerebros se realizó a 8 días o 3 semanas después de la herida. Secciones de tejido perfundidas fueron analizadas para el volumen de lesión y la respuesta inmunohistoquímica. El tejido cerebral fresco se congeló en butano de 2-netilo frío y luego se homogenizó durante el análisis de transferencia Western.

25 Resultados:

[0098] Retiro agudo y herida (AWI) interactuaron para aumentar ansiedad, déficits locomotor y sensorial en comparación con retiro de progesterona reducido (TWI). Adicionalmente, falsos retiros agudos (AWS) tuvieron deterioros motorizados aumentados en comparación con todos los otros falsos, y ansiedad aumentada en comparación con ratas con progesterona reducida. Los factores neuroprotectores BDNF y HSP70 aumentaron para
 30 TWI sobre AWI sobre VI a 3 semanas después de la herida. Este efecto provechoso del tratamiento de hormona reducido guardaba correlación con la reconstrucción de la lesión y la coloración GFAP; animales TWI tuvieron el volumen de lesión más pequeño y menos astrocitos reactivos, después de AWI, mientras VI tuvo el volumen de lesión más grande y más astrocitos reactivos. Apoptosis e inflamación disminuyeron con TW, como demuestra p53, activo Caspase 3, TNF α y NF κ B.

35 Conclusión:

[0099] PW agudo tiene un efecto constrictivo en el comportamiento y la recuperación del tejido después de daño cerebral traumático. En el valor máximo de retiro, los animales sometidos a progesterona con síndrome de abstinencia muestran ansiedad aumentada, déficits sensoriales y locomotores; todos estos son además agravados con herida. Una semana más tarde, deterioros conductuales aumentados son todavía evidentes en los animales
 40 AWL. La transferencia de Western reveló expresión disminuida de proteínas apoptóticas e inflamatorias con retiro reducido, aunque todos los tratamientos de progesterona llevaron a mejores resultados en comparación con controles de un único vehículo. A 3 semanas después de la herida, el efecto compuesto de lesiones y el retiro de progesterona agudo continuó siendo motivo de déficits conductuales sobre aquellos animales con una reducción gradual en el tratamiento de progesterona. Estas conclusiones pueden dar a entender que en el análisis clínico, el
 45 retiro reducido de progesterona será más provechoso para la reparación del CNS que una terminación brusca del tratamiento al final del régimen de dosificación.

Ejemplo 4: El retiro reducido de progesterona promueve la recuperación a largo plazo después de daño cerebral traumático

[0100] Estando demostrado que después de TBI, AW causa un aumento en los comportamientos de ansiedad e inflamación cerebro-celular en comparación con TW (véase ejemplo 3), este estudio investigó los efectos celulares y conductuales de AW dos semanas después del final del tratamiento para determinar la influencia a largo plazo del
 50 retiro después de la herida.

[0101] Como se ha descrito anteriormente, el daño cerebral traumático después del tratamiento de progesterona y el derrame cerebral reduce los efectos de la herida secundaria y la necrosis (Asbury et al. (1998) Behav. Brain Res., 97:99-106; Attella et al. (1987) Behav. Neural. Biol., 48:352-367; Chen et al. (1999) J. Neurol. Sci., 171:24-30; Galani et al. (2001) Restor. Neurol. Neurosci., 18:161-166; Gibson et al. (2005) Exp. Neurol., 193:522-530; Gibson y Murphy (2004) J. Cereb. Blood Flow Metab., 24:805-813; Grossman et al. (2004) Brain Res., 1008:29-39; Kumon et al. (2000) J. Neurosurg., 92:848-852; Roof et al. (1994) Exp. Neurol., 129:64-69; Roof et al. (1994) "Progesterone
 55

Reduces BBB Damage Following Bilateral, Medial Frontal Contusion", in Twenty-first Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Miami Beach, FL, p. 191; Roof et al. (1997) *Mol. Chem. Neuropathol.*, 31:1-11; Shear et al. (2002) *Exp. Neurol.*, 178:59-67; Vink and Van Den Heuvel (2004) *Expert Opin. Investig. Drugs*, 13:1263-1274). AW, no obstante, provoca un aumento en la apoptosis, inflamación y comportamientos de ansiedad durante la fase de recuperación aguda después de TBI en comparación con TW (Cutler et al. (2005) *Exp. Neurol.*, 195(2):423-429). Todos los animales a los que se les dio progesterona, independientemente de su régimen de tratamiento, mostraron una mejora sobre animales tratados con vehículo, pero aquellos animales con TW tuvieron mejor recuperación como lo demuestra una menor inflamación, apoptosis y ansiedad funcional. AW causa ansiedad, depresión, y susceptibilidad de ataque aumentada debido a una reducción repentina en las interacciones GABA-A con alopregnanolona, un metabolito de progesterona (Foldvary-Schaefer et al. (2004) *Cleve. Clin. J. Med.*, 71:S11-18; Gulinello et al. (2003) *Eur. J. Neurosci.*, 17:641-648; Kulkarni y Reddy (1995) *Drugs Today*, 31:433-455; Rupprecht (2003) *Psychoneuroendocrinology*, 28:139-168; Herrero (2002) *Steroids*, 67:519-528). El aumento resultante en la activación NMDA conduce a un entorno excitatorio neuronal (Lukasiuk y Pitkanen (2000) *J. Neurochem.*, 74:2445-2454; Van Den Pol et al. (1996) *Neuroscience*, 74:653-674). Bajo el estrés añadido al traumatismo, este efecto se amplifica a una excitotoxicidad aumentada. Con retiro reducido, esta excitotoxicidad, herida secundaria e inflamación no se agravan.

[0102] En este estudio, los efectos de AW en la recuperación funcional medidos tres semanas después de TBI se estudiaron. Para el seguimiento del hallazgo de que Caspase-3, una proteína clave en la apoptosis (Budihardjo et al. (1999) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 269-290) aumenta en el momento del retiro, regulación a la alta o a la baja del número de un marcador a largo plazo de apoptosis, p53, se midió (Harris y Levine (2005) *Oncogene* 24:2899-2908). La proteína p53 altera la permeabilidad de las membranas mitocondriales, permitiendo la liberación de citocromo C, que induce la activación de proteasas apoptóticas, incluyendo caspase-3 (Mattson (2003) *Neuromolecular Med.* 3:65-94). También, para determinar si la neuroprotección mejora por TW, HSP70 y BDNF se midieron, al igual que el tamaño de la cavidad de la lesión necrótica y el gliosis reactivo. Ambos BDNF y HSP70 actuaron para promover la plasticidad sináptica y la liberación de factores tróficos (Binder y Scharfman (2004) *Growth Factors* 22:123-131; Feinstein et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:17724-17732), mientras una reducción en el tamaño de la lesión necrótica indica protección y preservación de células neuronales. Además, estudios anteriores han mostrado que la progesterona juega una parte en la reducción de astrocitos reactivos asociada con edema cerebral e inflamación (Djebaili et al. (2005) *J. Neurotrauma* 22:106-118); este beneficio también puede mejorarse con retiro reducido.

[0103] Dado los efectos difundidos de retiro agudo previamente señalado al valor máximo de retiro, se predijo que estos efectos se manifestarían por sí mismos en el análisis conductual a largo plazo después de que la cascada inicial de heridas secundarias ha cesado. Por consiguiente, la actividad locomotora y la negligencia somatosensora se evaluaron para grupos de sujetos con TW contra AW, de una a tres semanas después de la herida.

Materiales y métodos:

[0104] Sujetos. 60 ratas macho Sprague-Dawley con un peso de 290-310 g en el momento de la herida se usaron en este experimento. Alimentos y agua fueron proporcionados hasta libidum antes y después de la cirugía. Los animales fueron manejados y pesados a diario desde su llegada, siete días antes de la cirugía, para la extracción de cerebro tres semanas después de la cirugía. Los animales fueron manejados en grupos de 12, con n=10 por condición experimental. Todos los procedimientos animales fueron aprobados por el Animal Care and Use Committee de la universidad de Emory, protocolo #131-2002.

[0105] Cirugía. Anestesia de isofluorano fue inducida durante cuatro minutos y 45 segundos a 5% y mantenido a 2,5%. La temperatura corporal normal fue mantenida con una almohadilla eléctrica quirúrgica colocada debajo de las preparaciones estériles. El área de la incisión en el cuero cabelludo se afeitó y esterilizó con yodo e isopropanol. Una incisión de línea media se hizo a lo largo del cuero cabelludo y la fascia se despejó para exponer la superficie del cráneo. Coordenadas estereotáxicas mediales, laterales y dorsales se determinaron a bregma y una craneotomía bilateral de 5-7 mm de diámetro se realizó medio-sagitalmente, 3 mm anterior a bregma y una herida córtex medial frontal (MFC) con un dispositivo de contusión neumática cortical (5 mm diámetro) a una presión de 1,7 psi, sobre 50 ms con una velocidad de 2,25 m/s y a una profundidad de 2,5 mm. Se usaron suturas cerca de la incisión después de que el sangrado cesara. Los animales fueron colocados en jaulas de recuperación limpias e individualmente calentadas, hasta que se despertaron y se les retornó a las jaulas individuales con gránulos de alimento humedecidos accesibles. Los animales falsos fueron anestesiados y se realizó una incisión en la parte superior de la cabeza. La fascia se esclareció para exponer bregma, luego se suturó la incisión. Cirugías falsas se unieron a cirugías de lesión para todas las condiciones experimentales.

[0106] Tratamiento de progesterona. Animales falso (S) y lesión (L) se asignaron de manera aleatoria a uno de los tres grupos de tratamiento: vehículo (VS; VL), retiro agudo (AWS; AWL) y retiro reducido (TWS, TWL). Tratamientos de progesterona de dieciséis mg/kg fueron disueltos en 2-hidroxipropil- β -cilodextrin (HBC) 22,5% y se administró como se muestra en la tabla 2. La reducción se indujo como dosificaciones reducidas a la mitad sobre los últimos dos días de tratamiento. Diluciones durante tratamientos TW se hicieron con stocks de HBC. Todas las inyecciones fueron administradas intraperitonealmente una hora después de la herida y subcutáneamente seis horas después de la herida y cada 24 horas hasta el final del ciclo del tratamiento. Cinco grupos de 12 animales cada uno fueron usados, durante un total n=10 para cada grupo experimental durante todo el experimento. De estos animales, todos fueron usados para adquirir datos conductuales, cuatro muestras se usaron durante el análisis de proteína y seis

muestras se usaron durante el análisis histológico para cada prueba de condición.

Tabla 2. Plan de tratamiento de progesterona después de la cirugía

Administración de progesterona			
	Días 1-5	Día 6	Día 7
AW	16 mg/kg P	16 mg/kg P	16 mg/kg P
TW	16 mg/kg P	8 mg/kg P	4 mg/kg P
V	22,5% HBC	22,5% HBC	22,5% HBC

5 [0107] Jaulas Digiscan Locomoter Activity. Orden aleatorio, test ciego ocurrido bajo luz roja en un entorno tranquilo un día antes de la herida y uno y siete días después del retiro. Hasta cuatro animales fueron evaluados usando el Digiscan Activity Monitoring System (AccuScan Instruments, Inc. Columbus, OH) en cada prueba, con un total de tres ensayos por día de prueba. La ratas se colocaron en la esquina izquierda más lejana a la jaula Digiscan Activity. Entonces, el interruptor basculante se puso en la posición 'on'. A cinco minutos exactamente, el ordenador detuvo el análisis, asegurando que todas las pruebas tuvieran la misma longitud independientemente de la hora de comienzo. Los archivos se guardaron según la fecha y el número de prueba y el número de bolos fecales se registraron. Las jaulas de la actividad se limpiaron con etanol 70% y se secaron entre ensayos. El tiempo central se definió por el ordenador como la cantidad de tiempo de la exploración que el animal consumió explorando la jaula de actividad fuera de las esquinas.

15 [0108] Negligencia somatosensora de las patas. Orden aleatorio, test ciego ocurrido bajo luz roja en un entorno tranquilo a uno y siete días después del retiro, una hora después del análisis de actividad locomotora. Etiquetas circulares de 1,3 cm de diámetro se colocaron en la pata izquierda y la rata se colocó en la jaula de análisis de plexiglás claro. El estado latente requerido para cada rata para eliminar el adhesivo con su boca fue registrado, con una duración de prueba máxima de dos minutos. Cada animal fue evaluado tres veces, con un periodo de descanso de dos minutos entre ensayos. La jaula de análisis se limpió con etanol 70% y se secó entre ensayos.

20 [0109] Preparación del tejido. Todos los animales fueron decapitados después de una inyección letal 1 ml de Nembutal a tres semanas después de la herida. Se extrajo los cerebros para análisis histológico después de perfusión transcardial con paraformaldehído 4%. Después de 24 horas de post-fijación en paraformaldehído 4%, seguidos de sacarosa 10% y luego solución de sacarosa 20% en agua DI, los cerebros fueron montados y congelados en hielo seco. El cerebro anterior se cortó en secciones de 25 um en un criostato y se almacenaron a -80°C en portaobjetos revestidos de gelatina 1%. Igualmente, secciones distanciadas a 75 µm aparte se lavaron en una serie de alcohol graduado, alcohol 100% y 95% (2 x 5 min cada uno) y alcohol 70% (1 x 5 min) y teñido con tionina (1g de tionina, 1,2 g de acetato sódico, 0,4 ml de ácido acético glacial en 300 ml H2O DI) para reconstrucción de la lesión. Secciones teñidas con tionina de 4,2 - 2,2 mm anterior a bregma fueron identificadas y analizadas para el área de la lesión con el software Kodak ID. El área total del cerebro fue determinado normalizando el volumen de secciones de cerebro falsas.

30 [0110] Los cerebros para el análisis de proteína fueron seccionados en el área inmediata de la lesión y se congelaron en 2-metilbutano enfriado en el hielo seco. Las muestras se almacenaron a -80°C. Las secciones del cerebro se pesaron para asegurar la consistencia y se homogenizaron por medio de un vidrio Dounce en 800 ml del tampón de homogenización Tper (78510, Pierce, Rockford, IL) con 10 µl/ml de cóctel inhibidor de proteasa (P8340, Sigma, St. Luis, MO). Muestras de tejido homogenizadas se almacenaron a -20°C. BCA y Coomassie Protein assays (23235, Pierce) se realizaron por triplicado a tres diluciones en cada muestra para determinar la concentración de proteína. La cantidad de cerebro homogeneizado necesitado para estandarizar las muestras a 2 µg/µL para la transferencia de Western se calculó de los resultados de estos ensayos.

40 [0111] Inmunohistoquímica. Las secciones usadas para la coloración de inmunofluorescencia GFAP se enjuagaron en PBS, luego se incubaron en TritonX 0,2% en PBS durante 5-10 minutos y se enjuagaron otra vez. Las secciones se incubaron luego en albúmina de suero bovino (BSA) 1,0% en PBS durante 30 minutos y se dejaron durante toda la noche a 4°C bajo 1:2000 GFAP (MAB3402 Chemicon) en BSA 1%. Después de un enjuague en PBS y diez minutos de incubación en BSA 1%, las secciones fueron incubadas en 1:1000 AlexaFluor conjugado de ratón 594 (A21125, Invitrogen, Carlsbad, CA) solución de anticuerpo secundaria en BSA 1% durante toda la noche a 4°C. Los portaobjetos se cubrieron usando Vectashield Mounting Medium (H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Los portaobjetos fueron procesados a una ampliación 40x con un microscopio Nikon Olympus equipado con epifluorescencia. Antes de adquirir y analizar las imágenes el microscopio fue calibrado a 1 µm. Cuatro áreas separadas directamente adyacentes a la zona de la herida se analizaron por sección. La luminosidad fue

cuantificada para n=6 por grupo de tratamiento con Adobe Photoshop v. 6.0. Para cada 144k+ pixel de imagen, la estimación se determina y se hace un promedio por pixel sobre todo el conjunto.

5 [0112] Transferencia de Western. El tampón de muestra de reducción se preparó como Tris 0,625 M, Glicerol 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5% y bromofenol azul 0,001%. Las muestras se establecieron en 2 μ g/ μ l de concentración de proteína. A las muestras preparadas se les aplicó un gradiente de geles de TrisHCL 4-20% (345-0033, Biorad, Hercules, CA), y se les aplicó 200 mV durante aproximadamente una hora. Las proteínas se transfirieron luego sobre membranas PVDF en el módulo de transferencia Criterion Western (165-6001, BioRad), se bloquearon durante diferentes horas en el diluyente de proteínas de la leche (50-82-00, KPL, Gaithersburg, MD) y luego se incubaron en el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C, incluyendo p53 (SC-1312, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) BDNF (AB1534, Chemicon, Temecula, CA) y HSP70 (33-3800, Zymed, Carlsbad, CA). Anticuerpos secundarios conjugados con HRP (4-18-18, 14-13-06 KPL) se aplicaron el día después durante 2 horas y se agitaron a temperatura ambiente. Se desarrollaron manchas con sustrato SuperSignal Wes Dura (34076, Pierce) usando un escáner de Kodak y software Kodak ID durante el análisis de densitometría. Controles de carga fueron realizados con gestores de β -actina.

15 [0113] Estadística. Todos los resultados fueron expresados como una media más o menos del error típico de la media. La significación estadística se fijó a $p < 0,05$ durante las pruebas con dos colas y los datos se analizaron usando análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de pruebas post hoc LSD. Los valores F se presentan como un prefacio para un análisis post hoc con todos los grados de libertad para la transferencia de Western a (5,18) y para comportamiento a (5,26). Los resultados LSD se usaron para demostrar la importancia.

20 Resultados

[0114] Ensayos conductuales. Los datos de la negligencia somatosensora se muestran a un día (Figura 3A) y a una semana (Figura 3B) después del retiro. A ambos puntos de tiempo, TWS y VS no mostraron ninguna diferencia. A un día después del retiro, AWS demostró elevadas deficiencias sensoriales en comparación con los grupos TWS y VS (*, $p < 0,05$, $F = 8,97$), no obstante, a una semana después del retiro estas diferencias ya no eran evidentes. A ambos puntos de tiempo, AWL y VL no mostraron diferencias, no obstante, ambos se redujeron de uno a siete días. TWL, no obstante, se mantuvo durante el curso del experimento y las deficiencias disminuyeron en comparación con VL y AWL (#, $p < 0,05$, $F = 10,71$; 8,85) a ambos tiempos.

30 [0115] El tiempo central, como determinan las jaulas Digiscan Locomoter Activity, siguieron un modelo similar al visto en la progresión de la negligencia sensorial entre uno (Figura 4A) y siete (Figura 4B) días después del retiro. A un día, los animales AWS demostraron significativamente menos tiempo central en comparación con otros falsos (*, $p < 0,05$, $F = 6,79$); a siete días todos los animales falsos consumieron un tiempo central equivalente. Animales TWS no aumentaron el tiempo central a un día en comparación con los animales VS (#, $p < 0,05$, $F = 10,13$). Esto indicó un efecto anxiogénico de retiro de progesterona más allá del valor máximo de retiro. A ambos puntos de tiempo, los animales TWL demostraron un tiempo central aumentado sobre animales de AWL (**, $p < 0,05$, $F = 7,74$, 5,33), que a su vez aumentaron el tiempo central en comparación con animales de VL (###, $p < 0,05$, $F = 8,91$, 10,77).

35 [0116] Análisis de proteína. La figura 5 muestra p53, un marcador a largo plazo de apoptosis. A dos semanas después del retiro, todos los animales tratados con progesterona tenían niveles p53 indistinguibles de los falsos de vehículo. Los animales VL, no obstante, tenían niveles p53 más altos que todos los otros grupos (*, $p < 0,05$, $F = 8,67$). HSP70, una proteína neuroprotectora, se aumentó en animales TWL (*, $p < 0,05$; $F = 26,94$) sobre VL y AWL (Figura 6). Animales falsos no mostraron ninguna diferencia entre grupos de tratamiento.

[0117] La figura 7 demuestra un aumento en niveles BDNF para TWL sobre AWL (*, $p < 0,05$; $F = 6,88$) y AWL sobre VL (#, $p < 0,05$, $F = 6,57$). Animales falsos no mostraron ninguna diferencia entre grupos de tratamiento. Junto con datos HSP70, éste indica que las propiedades neuroprotectores de la progesterona mejoran con un régimen de tratamiento reducido.

45 [0118] Histología. La reconstrucción de la lesión se realizó a +2,2; +3,2, y +4,2 mm de bregma. La proporción de volumen de lesión a volumen total fue determinado para un n=4 para cada profundidad. La figura 8A muestra imágenes representativas de las secciones seleccionadas anteriores a bregma, y los datos cuantificados para cada grupo de lesión se muestran en la figura 8B. Los cerebros TWL tenían un volumen de lesión más pequeño que los de AWL y animales VL (*, #, $p < 0,05$, $F = 7,32$), mientras el volumen de la lesión de AWL disminuyó en comparación con animales VL (*, $p < 0,05$, $F = 4,55$).

50 [0119] La figura 9 demuestra astrocitos reactivos relativos determinados por coloración inmunofluorescente GFAP a tres semanas después de la herida. La figura 9A muestra vistas representativas de cada grupo en el área de la lesión o el tejido correspondiente en animales falsos, mientras que la figura 9B muestra la luminosidad cuantificada calculada según el promedio sobre n=6. GFAP fue regulada al alza en animales VL (A) sobre animales AWL (B), y en AWL en comparación con animales TWL (C) (*, $p < 0,05$, $F = 16,24$, 27,96). Animales AWS (E) tuvieron un aumento en la reactividad GFAP sobre ambos grupos VS (D) y TWS (F) (#, $p < 0,05$, $F = 9,71$). Los grupos TWS y VS no mostraron diferencias.

Discusión

[0120] Este estudio investigó los efectos de retiro de progesterona agudo tres semanas después de la herida y

encontró repercusiones selectivas a largo plazo. Diferentes medidas de comportamiento conductual a largo plazo, anatómico y funciones moleculares se investigaron para indicar la recuperación de la actividad, respuesta celular y sensorial.

5 [0121] Para determinar respuestas conductuales a largo plazo de retiro de progesterona agudo contra reducido, pruebas de actividad locomotora y de negligencia somatosensora se realizaron. Los animales con retiro reducido de progesterona realizado mejor un día y una semana después del retiro para recuperación de la función sensorial y de la actividad locomotora. Además, a un día después del retiro los animales falso-operados que fueron sometidos a retiro de progesterona agudo demostraron más deficiencias en estos ensayos que animales reducidos o falsos de vehículo; este efecto desapareció una semana más tarde. Una observación interesante inmediatamente después del
10 retiro fue un aumento en el tiempo consumido en el centro de la jaula de actividad para falsos reducidos sobre falsos de vehículo. Este comportamiento exploratorio aumentado se puede deber a un efecto excitador moderado del retiro reducido, a diferencia del más severo excitotóxico y efecto imitado del retiro agudo. Además, la excitación moderada puede mejorar también la recuperación de la función a largo plazo, como el ejercicio retardado después de TBI mejora la función de recuperación (Griesbach et al. (2004) *Neuroscience*, 125:129-139; Kleim et al. (2003) *Neurochem. Res.*, 28:1757-1769; Will et al. (2004) *Prog. Neurobiol.*, 72:167-182).

[0122] Efectos selectivos de PW agudo contra reducido también se vieron en términos de análisis moleculares tres semanas después de la herida. Aunque la apoptosis aumentó durante PW agudo en comparación con reducido al momento del retiro (Cutler et al. (2005) *Exp. Neurol.*, 195:423-429), este efecto ya no fue tan evidente dos semanas más tarde, determinado por niveles de proteína p53. Los animales tratados de vehículo, no obstante, mantuvieron la
20 apoptosis elevada en comparación con tratamientos de progesterona.

[0123] Una consecuencia mayor a largo plazo de retiro agudo se vio en cuanto a neuroprotección. BDNF y HSP 70, ambos indicadores de neuroprotección, aumentaron durante retiro reducido en comparación con agudo, mientras todos los tratamientos de progesterona produjeron HSP70 aumentado en comparación con animales tratados con el vehículo. Específicamente, BDNF actúa para proteger el tejido de "error" y permiten la plasticidad neuronal post-traumática a través de varios mecanismos (Binder y Scharfman (2004) *Growth Factors*, 22:123-131; Chuang (2004) *Crit. Rev. Neurobiol.*, 16:83-90; Gonzalez et al. (2004) *Neuroscience*, 125:605-614), mientras HSP 70 actúa como un agente neuroprotector para respuestas inflamatorias supresoras y citotoxicidad (Feinstein et al. (1996) *J Biol. Chem.*, 271:17724-17732). En conjunto, las presentes conclusiones moleculares y el volumen de la lesión necrótica
25 disminuido durante reducido sobre progesterona aguda sobre tratamiento de vehículo, demostraron una imagen total de neuroprotección mejorada y neuroplasticidad con administración de progesterona reducida.

[0124] La coloración inmunofluorescente para GFAP indica la extensión de la reactividad del astrocito adyacente al área de la herida. Mientras un aumento en GFAP puede ser una marca del contraste de factores tróficos aumentados, también indica cicatrización glial, inflamación y edema cerebral (Hatten et al. (1991) *Glia*, 4:233-243; Leme y Chadi (2001) *Arq. Neuropsiquiatr.*, 59:483-492). Tal como se predijo, en el presente estudio una respuesta
35 aumentada para animales de lesión tratados con vehículo y una reacción GFAP disminuida para animales de lesión agudos tratados con progesterona se observó. La respuesta GFAP disminuyó también para animales de lesión reducida tratados con progesterona.

[0125] Debería asimismo observarse que un aumento en la luminosidad de Inmunofluorescencia GFAP fue encontrada en el grupo falso PW agudo. Sin estar unido a la teoría, el mecanismo de respuesta falsa se puede basar
40 solamente en efectos derivados de PW agudo. Después de retiro de progesterona agudo, aumentó la acción de NMDA y los receptores sigma crearon un entorno de excitación neuronal. El grado de esta excitación depende de diferentes factores, incluyendo dosificación y duración de la administración (Rupprecht et al. (2001) *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 37:59-67; Rupprecht y Holsboer (2001) *Int. Rev. Neurobiol.* 46:461-477) y pueden también estar compuestos por eventos externos como el traumatismo. Por consiguiente, un efecto de la recuperación de un
45 entorno excitotóxico podría aumentar la liberación del factor trófico (Acarin et al. (1999) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 58:389-397; Horvath et al. (2000) *Eur. J. Pharmacol.* 405:33-42), tal como se observa en animales falsos PW agudo.

[0126] Estos datos inmunohistológicos y moleculares combinados apoyan las conclusiones precedentes anteriormente descritas (ver experimento 3; Cutler et al. (2005) *Exp. Neurol.*, 195(2):423-429), muestran que
50 mientras la progesterona puede ser un tratamiento terapéutico vital, sus efectos provechosos son otro añadido para reducir las complicaciones secundarias atribuibles a agudo PW. Las implicaciones clínicas de estas conclusiones prometen diseñar una respuesta eficaz a los requisitos rehabilitativos a largo plazo e inmediatos después de TBI. Para optimizar el tratamiento y promover todos los estadios de recuperación funcional, el presente estudio podría ser aplicado para abarcar rehabilitación post-traumática, incluyendo los efectos de ejercicio y ambientes enriquecidos (Griesbach et al. (2004) *Neuroscience*, 125:129-139; Kempermann et al. (2000) *Prog. Brain Res.*, 127:35-48; et al. (2004) *Prog. Neurobiol.*, 72:167-182). También, mientras jóvenes adultos son el demográfico mayor durante TBI, los
55 pacientes mayores y los inmaduros contribuyen significativamente a la estadística TBI a través del síndrome de niño sacudido, accidentes y caídas (CDC; 2004) pueden también beneficiar a estas estrategias terapéuticas.

[0127] En conclusión, ambos índices a corto y largo plazo de recuperación mejoran con tratamiento de progesterona reducida. Este conocimiento abre la puerta a un diseño y a una investigación más eficaces y a una implementación
60 de un tratamiento clínico seguro y eficaz para TBI.

Resumen

[0128] Ratas macho adultas Sprague-Dawley recibieron o una contusión de córtex bilateral frontal (L) o una cirugía (S) falsa. A las ratas se les inyectó a una y seis horas después de la herida, luego cada 24 horas durante seis días.

- 5 Ratas tratadas de vehículo (V) recibieron 9 inyecciones de ciclodextrina 22,5%, mientras que ratas AW recibieron 9 inyecciones de 16 mg/kg de progesterona y ratas TW recibieron 7 inyecciones de progesterona a 16 mg/kg, después de una a 8 mg/kg y de una a 4 mg/kg. En el día 8, la negligencia sensorial y las pruebas de actividad locomotora se iniciaron. Se mató a los animales 22 días después de TBI y los cerebros se prepararon para análisis molecular o histológico. La transferencia de Western reveló BDNF y HSP 70 aumentados en animales TW vs. AW. P53 se aumentó en los animales de VL, mientras todos los grupos tratados con progesterona fueron equivalentes a falsos.
- 10 Animales TW habían disminuido notablemente la negligencia sensorial en comparación con animales AW y aumentó el tiempo central en los ensayos de actividad locomotora. Además, la reconstrucción de la lesión revela un tamaño de la lesión disminuido para TWL sobre AWL sobre animales VL. La coloración inmunofluorescente GFAP siguió este modelo también. En conclusión, después de TBI, AW afecta a los comportamientos seleccionados y los marcadores moleculares en el periodo de recuperación crónico.
- 15 [0129] Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la especificación son indicativas del nivel para expertos en la técnica a los que esta invención pertenece.

[0130] Aunque la invención precedente ha sido descrita en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, es obvio que determinados cambios y modificaciones se podrían practicar.

REIVINDICACIONES

1. Progesterona para uso en el tratamiento de una herida traumática del sistema nervioso central, caracterizada por el hecho de que dicha progesterona se prepara para la administración a un sujeto, dicha administración comprendiendo un régimen de dosificación de administración reducida antes de la terminación de la administración.
- 5 2. Progesterona según la reivindicación 1, caracterizada por el hecho de que dicha herida traumática del sistema nervioso central es un daño cerebral traumático.
3. Progesterona según la reivindicación 2, caracterizada por el hecho de que dicho daño cerebral traumático es el resultado de una contusión fuerte.
- 10 4. Progesterona según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el hecho de que dicho régimen de dosificación de administración reducida comprende progresivamente dosis administradas de progesterona divididas por 50%.
5. Progesterona según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, caracterizada por el hecho de que dicho régimen de dosificación de administración reducida comprende una reducción lineal.
- 15 6. Progesterona según la reivindicación 5, caracterizada por el hecho de que dicha reducción lineal es una reducción lineal del 10%.
7. Progesterona según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, caracterizada por el hecho de que dicho régimen de dosificación de administración reducida comprende una reducción exponencial.
8. Progesterona según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el hecho de que dicha administración de progesterona comprende un régimen de dosificación de progesterona constante antes del régimen de dosificación de administración reducida.
- 20 9. Progesterona según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8, caracterizada por el hecho de que dicha administración de progesterona comprende un régimen de dosificación de progesterona de dos niveles antes del régimen de dosificación de administración reducida.
- 25 10. Uso de progesterona en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una herida traumática del sistema nervioso central, caracterizada por el hecho de que dicho medicamento se prepara para la administración a un sujeto, dicha administración comprendiendo un régimen de dosificación de administración reducida antes de la terminación de la administración.
11. Uso según la reivindicación 11, caracterizado por el hecho de que dicha herida traumática del sistema nervioso central es un daño cerebral traumático.
- 30 12. Uso según la reivindicación 12, caracterizado por el hecho de que dicho daño cerebral traumático es el resultado de una contusión fuerte.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones de 11 a 13, caracterizado por el hecho de que dicho régimen de dosificación de administración reducida comprende dosis administradas progresivamente de progesterona divididas por 50%.
- 35 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones de 11 a 13, caracterizado por el hecho de que dicho régimen de dosificación de administración reducida comprende una reducción lineal.
15. Uso según la reivindicación 15, caracterizado por el hecho de que dicha reducción lineal es una reducción lineal del 10%.
- 40 16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones de 11 a 13, caracterizado por el hecho de que dicho régimen de dosificación de administración reducida comprende una reducción exponencial.
17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones de 13 a 18, caracterizado por el hecho de que dicha administración de progesterona comprende un régimen de dosificación de progesterona constante antes del régimen de dosificación de administración reducida.
- 45 18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones de 13 a 18, caracterizado por el hecho de que dicha administración de progesterona comprende un régimen de dosificación de progesterona de dos niveles antes del régimen de dosificación de administración reducida.

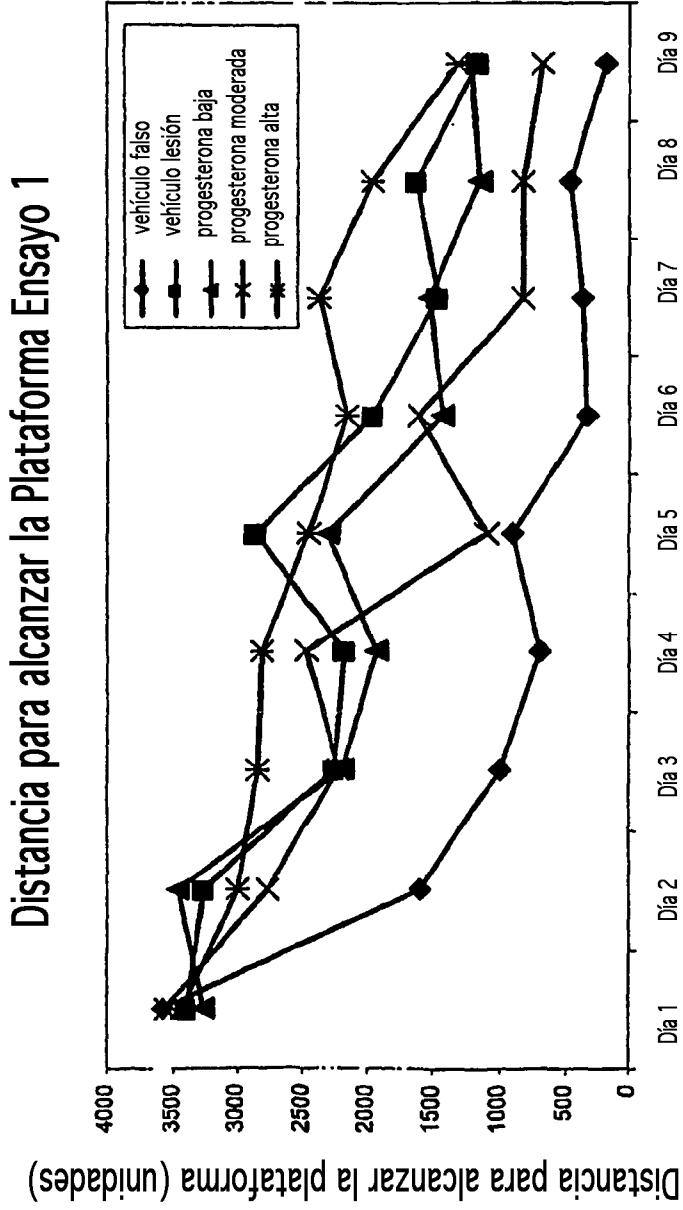


FIGURA 1A

Porcentaje de tiempo gastado en anillos externos (Media de ensayos 2)

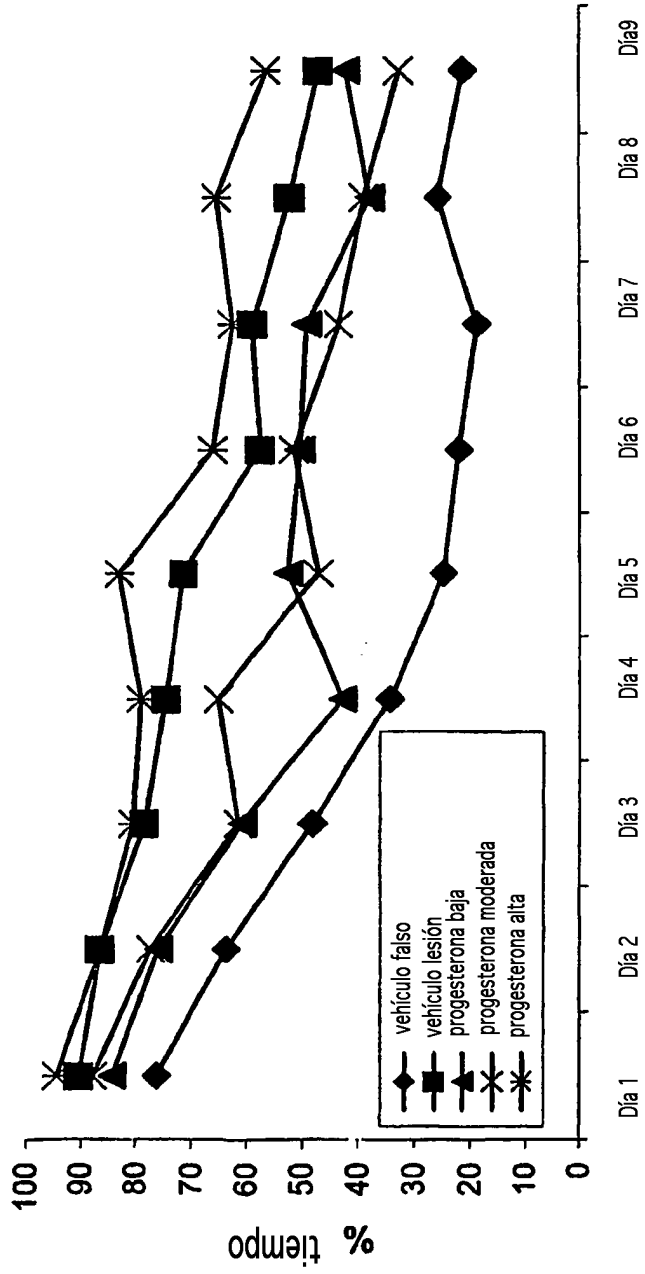


FIGURA 1B

Latencia media para eliminar adhesivo con 600 segundos de tiempo límite

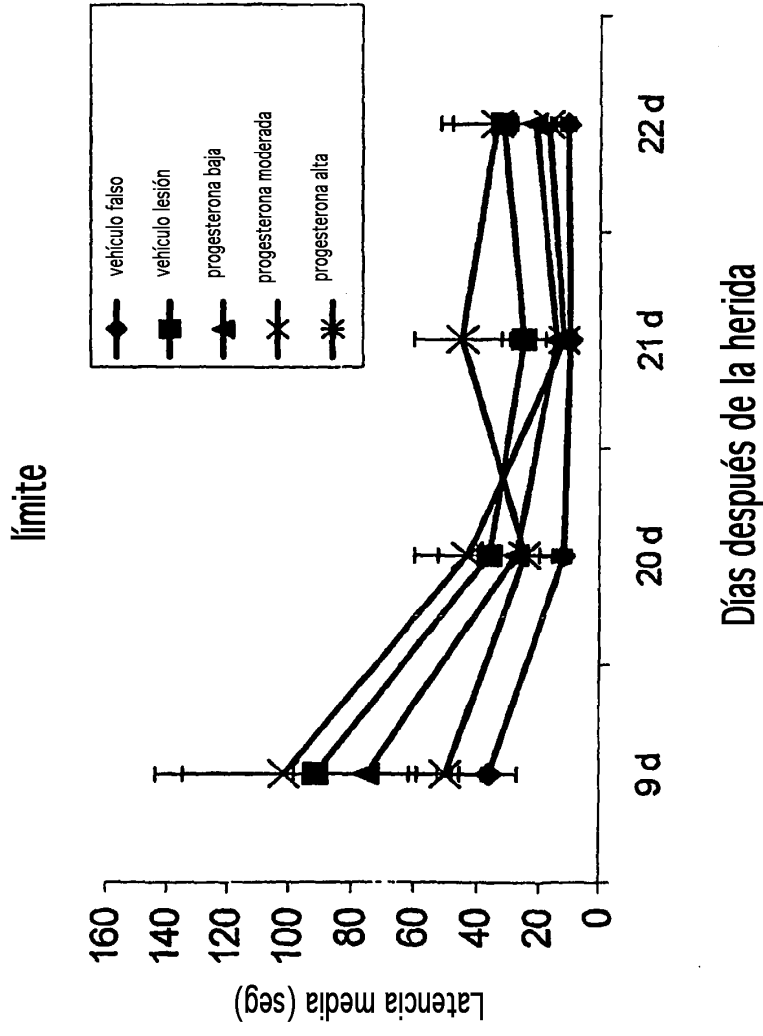
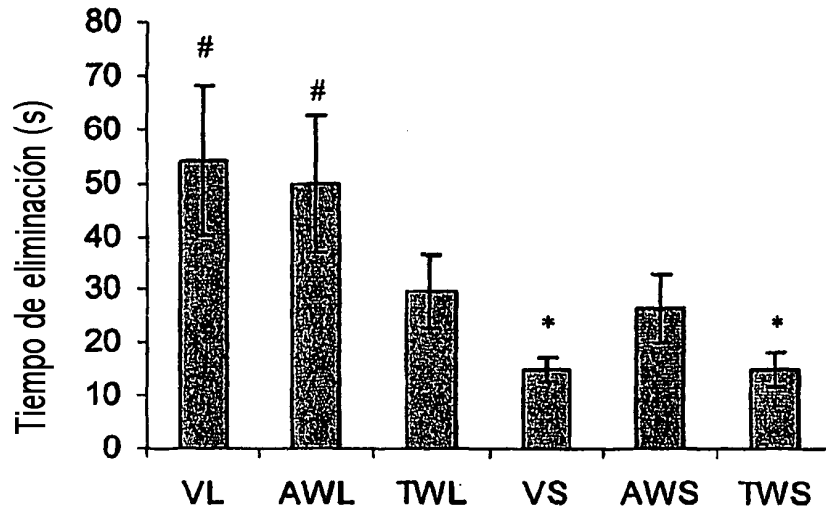


FIGURA 2

Figura 3

A.



B.

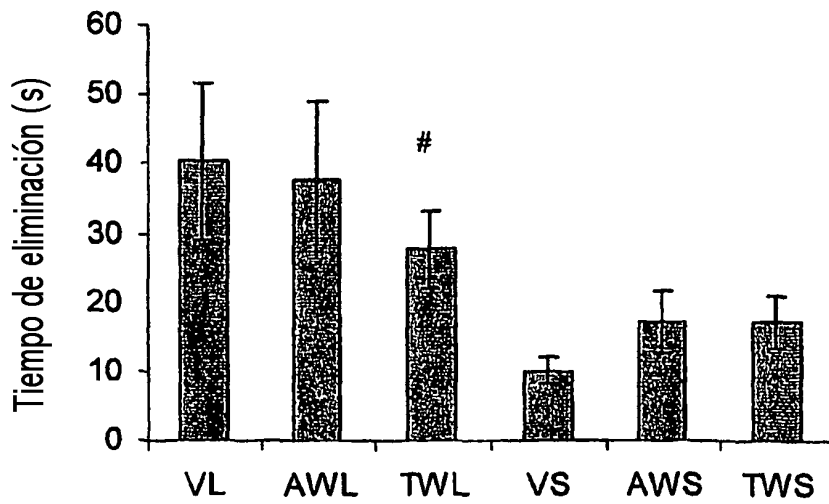
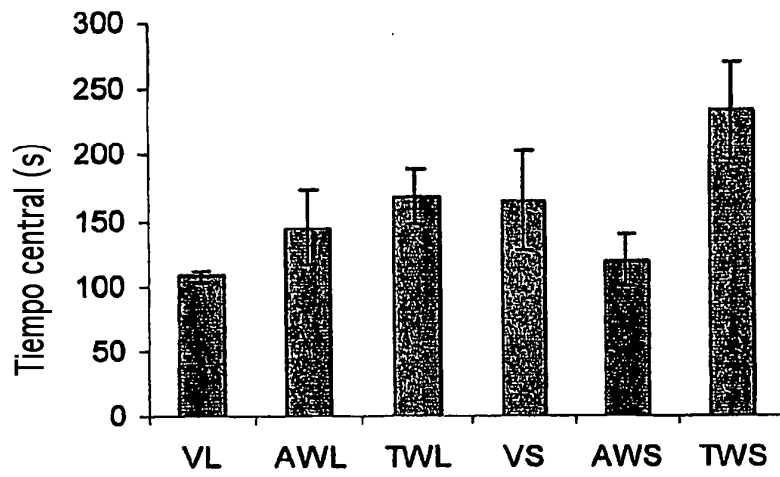


Figura 4

A.



B.

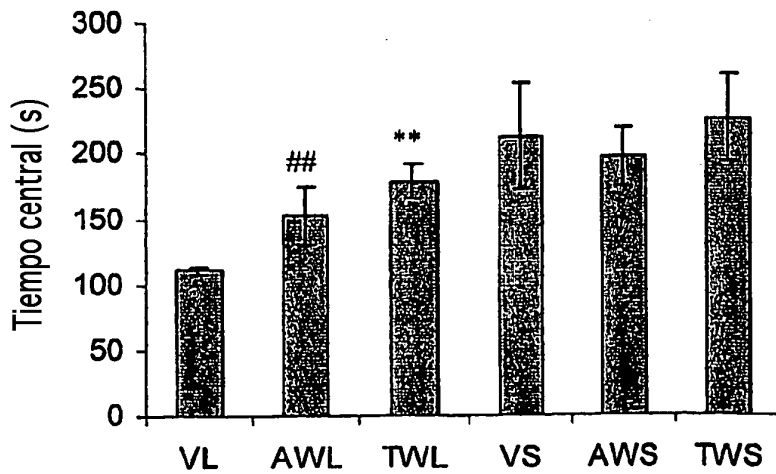


Figura 5

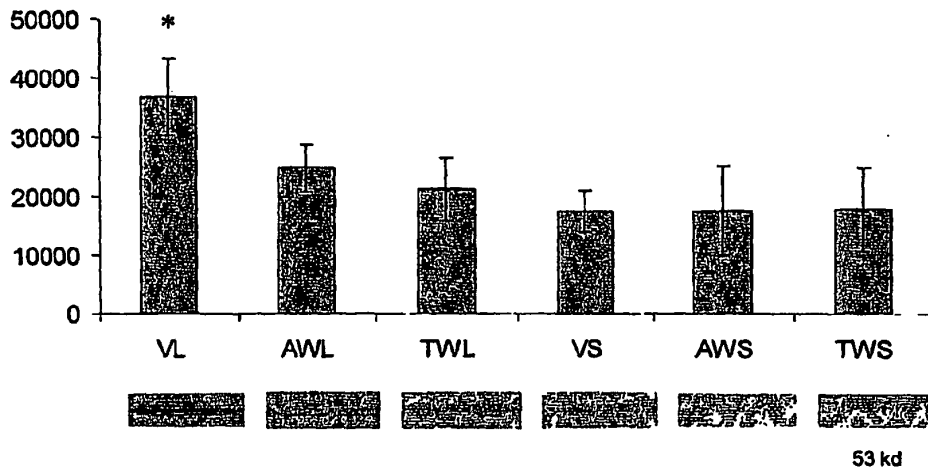


Figura 6

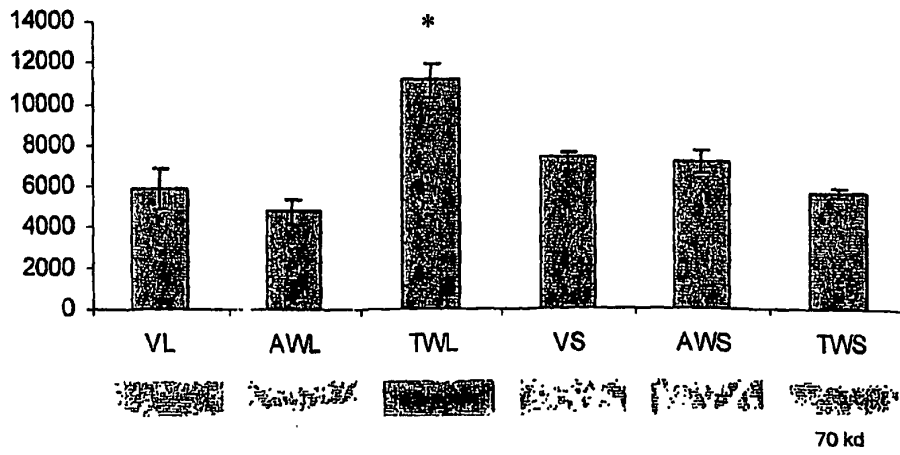


Figura 7

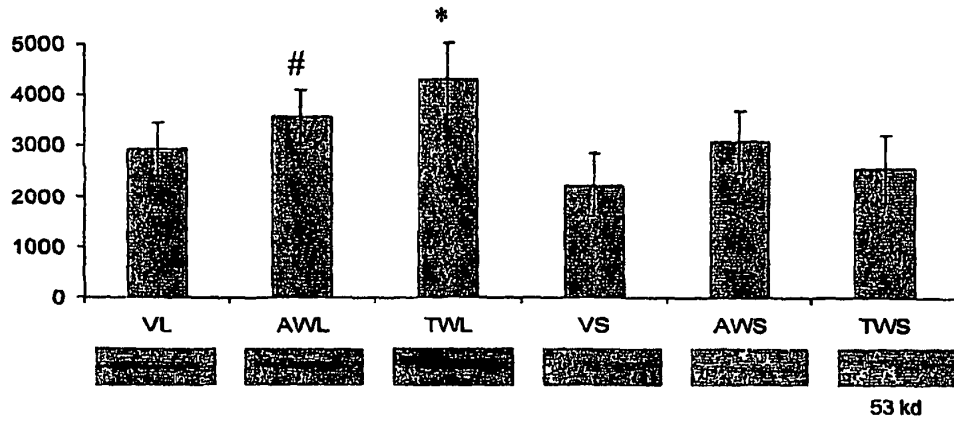
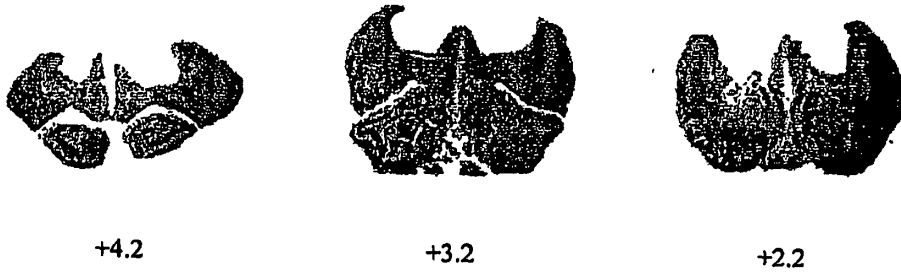


Figura 8

A.



B.

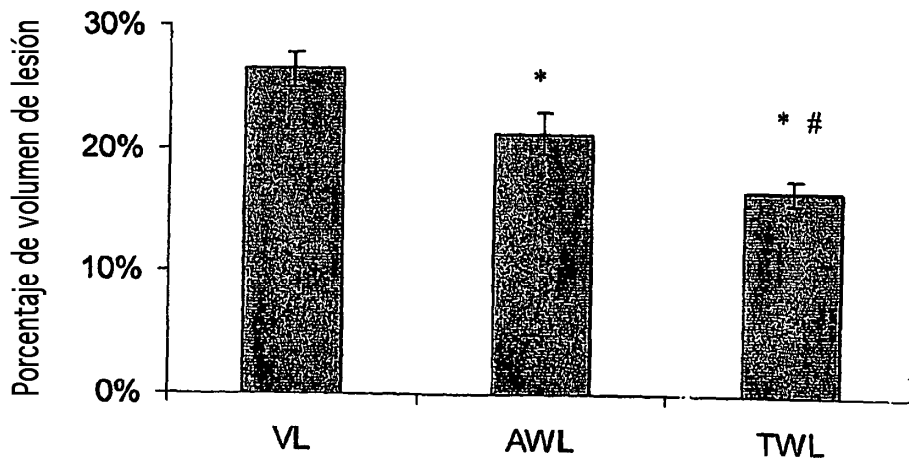


Figura 9

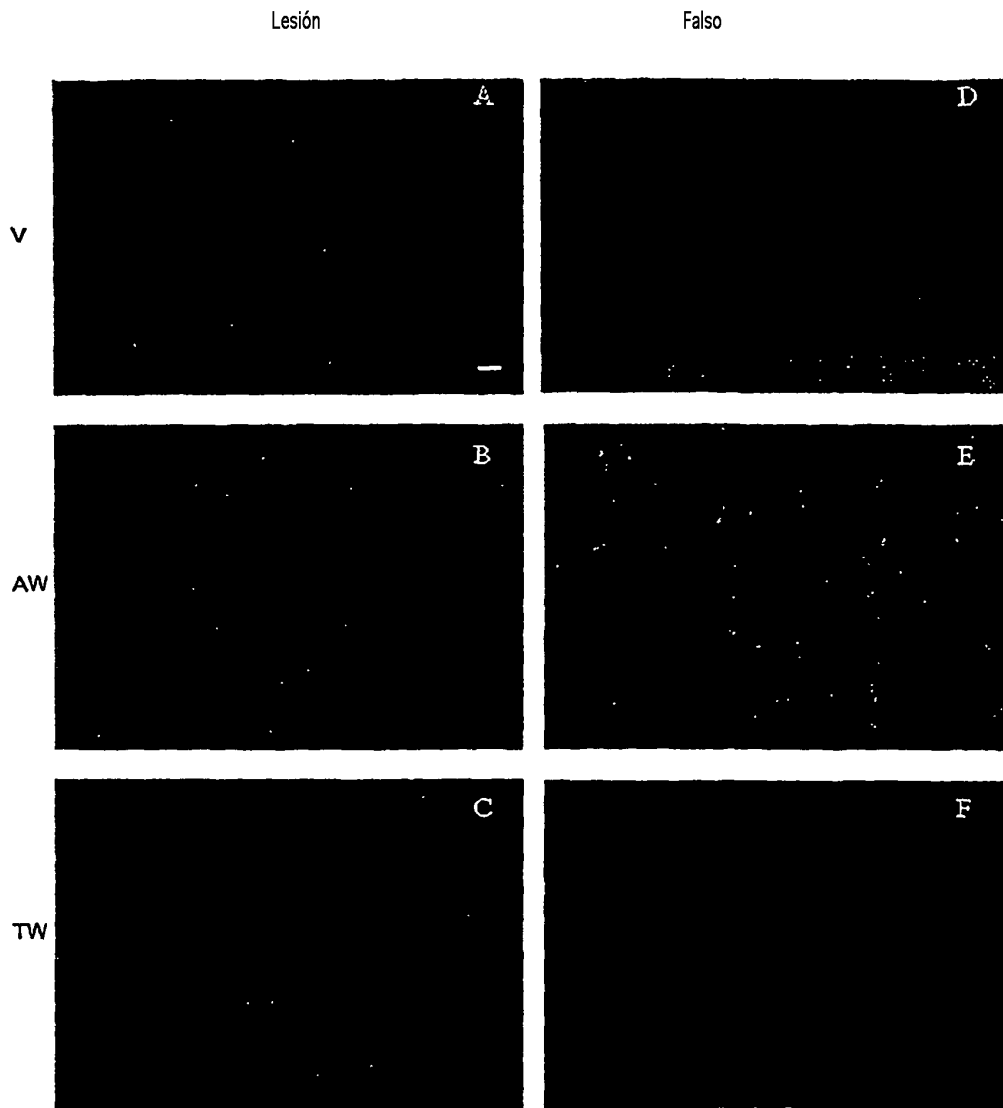


Figura 10

