

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 467**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 31/64 (2006.01)
A61P 7/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2003 E 03718003 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 1529058**

54 Título: **Un canal catiónico no selectivo en células neurales y antagonistas de Sur1 para el tratamiento de la inflamación del cerebro**

30 Prioridad:

20.03.2002 US 365933 P

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

02.01.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MARYLAND BALTIMORE (50.0%)
Office of Research and Development, 620 West
Lexington Street, 4th Floor
Baltimore, MD 21201-1691, US y
THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF
VETERANS AFFAIRS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SIMARD, J. MARC y
CHEN, MINGKUI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 436 467 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

Un canal catiónico no selectivo en células neurales y antagonistas de Sur1 para el tratamiento de la inflamación del cerebro

5

Campo de la invención

La presente invención hace referencia a la prevención y el tratamiento de la inflamación de las células neurales en el cerebro de un sujeto.

10

Antecedentes de la invención

Después de lesión cerebral e ictus, la respuesta normal del cerebro circundante consiste en montar una respuesta celular que incluye la formación de astrocitos reactivos que se cree que son importantes para "contener" y "limpiar" el lugar de la lesión. La inflamación de las células neurales es parte de la respuesta citotóxica o de inflamación celular que caracteriza a la lesión del cerebro en la isquemia cerebral y la lesión traumática del cerebro, y es una causa principal de morbilidad y mortalidad. Véanse, Staub et al., 1993; Kimelberg et al., 1995. Se han identificado numerosos mediadores que inician la inflamación de las células neurales, incluyendo la elevación de K^+ extracelular, acidosis, liberación de neurotransmisores y ácidos grasos libres. Véanse, Kempinski et al., 1991; Rutledge y Kimelberg, 1996; Mongin et al., 1999. El edema citotóxico es un fenómeno bien reconocido clínicamente que ocasiona inflamación en el cerebro, que empeora las consecuencias e incrementa la morbilidad y la mortalidad en lesiones del cerebro e ictus.

Se han estudiado los mecanismos subyacentes a la muerte apoptótica de los astrocitos reactivos. Véanse, Tanaka et al., 2000; Yu et al., 2001. Los mecanismos responsables de la muerte celular necrótica no han sido caracterizados. La muerte celular apoptótica está precedida de una contracción de la célula y una pérdida neta de K^+ . Véanse, Yu et al., 1997; Yu et al., 1999. Por el contrario, en la muerte celular necrótica, la membrana plasmática se rompe, ocasionando la liberación del contenido citosólico y desencadenando de ese modo la inflamación del tejido. Véase, Leist y Nicotera, 1997. La muerte celular necrótica puede ser más perjudicial para los tejidos viables próximos, dada la lesión inflamatoria secundaria que se inicia.

La muerte celular necrótica se inicia por medio de la inflamación osmótica que sigue al influjo de Na^+ , la mayor parte osmolito extracelular. En la mayoría de los tipos de células, se considera la acumulación de Na^+ intracelular como un proceso pasivo que no requiere activación de los efectores específicos, sino que se debe, en lugar de eso, a un bombeo defectuoso de Na^+ hacia afuera en condiciones de $[ATP]_i$ baja. Véanse, Leist y Nicotera, 1997; Trump et al., 1997. El burbujeo celular o la inflamación, una indicación de sobrecarga de Na^+ intracelular, se considera generalmente como un signo temprano de muerte celular necrótica. Véanse, Leist y Nicotera, 1997; Majno y Joris, 1995.

La inhibición de la síntesis de ATP o el agotamiento de ATP también ocasionan inflamación de las células neurales, burbujeo y, si es suficientemente grave, desorganización de la membrana plasmática y muerte celular. Véase, Jurkowitz-Alexander et al., 1993. Los mecanismos de la inflamación de las células neurales asociados con el agotamiento del ATP aún no se han caracterizado completamente. Véanse, Lomneth y Gruenstein, 1989; Juurlink et al., 1992; Rose et al., 1998.

Un mecanismo potencial sería cambios en la concentración de Na^+ y K^+ debidos a la inhibición de la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa. No obstante, un grado equivalente de inflamación osmótica inducida por la inhibición mediada por ouabaína de la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa en las células neurales no produce una gran despolarización, burbujeo o muerte celular. Véanse, Jurkowitz-Alexander et al., 1992; Brismar y Collins, 1993. Por lo tanto, el fallo de la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa, no es el mecanismo crítico para la inflamación de las células neurales. Ninguno de estos estudios ha identificado el mecanismo celular decisivo en la inflamación celular que está asociada con la lesión en el cerebro en la isquemia cerebral y la lesión traumática del cerebro.

Un subtipo de canal catiónico sensible a ATP es el canal catiónico no selectivo, que es un canal que es sensible a Ca^{2+} y a ATP. Más específicamente, los canales catiónicos no selectivos son activados por el Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) e inhibidos por el ATP intracelular ($[ATP]_i$). Aunque los canales catiónicos sensibles a Ca^{2+} y ATP han sido identificados en numerosos tipos de células no neurales, no han sido identificados en astrocitos ni en cualquier otro tipo de células neurales. Véanse, Sturgess et al., 1987; Gray y Argent, 1990; Rae et al., 1990; Champigny et al., 1991; Popp y Gogelein, 1992; Ono et al., 1994, cada uno de los cuales se incorpora a la presente como referencia en su totalidad. Estos canales que no son de astrocitos comprenden un grupo heterogéneo con características definidas de manera incompleta. Muestran conductancias de un único canal en el intervalo de 25-35 pS, discriminan escasamente entre Na^+ y K^+ , son impermeables a los aniones, la mayor parte impermeables a cationes divalentes, y son bloqueados por concentraciones similares de nucleótidos de adenina ATP, ADP y AMP en el lado citoplásmico. La función de estos canales catiónicos sensibles a ATP no selectivos en estos tipos de células no neurales sigue

siendo un enigma, en parte debido a que generalmente se requieren concentraciones de Ca^{2+} no fisiológicas para la activación del canal.

Otro subtipo de canal catiónico sensible a ATP es el canal de potasio sensible a ATP (canales K_{ATP}) de las células β pancreáticas. Una clase de secretagogos de insulina, las sulfonilureas antidiabéticas, se utiliza para inhibir estos canales K_{ATP} y estimular la liberación de insulina en la diabetes mellitus. Véase, Lebovitz, 1985. Las sulfonilureas antidiabéticas median su efecto sobre los canales K_{ATP} a través de un receptor de sulfonilurea de alta afinidad (SUR). Véanse, Panten et. al., 1989; Aguilar-Bryan et. al., 1995. Se han identificado y clonado varias isoformas de SUR, denominadas SUR1, SUR2A, SUR2B, y SUR2C. Véanse, Aguilar-Bryan et. al., 1995; Inagaki et. al., 1996; Isomoto et. al., 1996; Lawson, 2000. Estos receptores pertenecen a la familia de transportadores con una casete de unión a ATP (ABC), de la cual también es miembro el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), otro modulador del canal iónico. Véanse, Higgins, 1992; Aguilar-Bryan et. al., 1995. Notablemente, el CFTR tiene una mayor importancia terapéutica, puesto que su ausencia genética ocasiona fibrosis quística, una enfermedad fatal.

El receptor de sulfonilurea confiere sensibilidad a las sulfonilureas antidiabéticas tales como la glibenclamida y la tolbutamida. Asimismo, SUR es responsable de la activación del canal de potasio por medio de un grupo químicamente diverso de agentes denominados abridores del canal de K^+ (activadores SUR), tales como diazóxido, pinacidil, y cromacalina. Véanse, Aguilar-Bryan et. al., 1995; Inagaki et. al., 1996; Isomoto et. al., 1996; Nichols et. al., 1996; Shyng et. al., 1997b. En diversos tejidos, SUR molecularmente distintos se acoplan a radicales de canales distintos para formar diferentes canales K_{ATP} con características fisiológicas y farmacológicas distinguibles. El canal K_{ATP} en las células pancreáticas 3 está formado por SUR1 conectado con un canal K^+ , mientras los canales K_{ATP} cardíacos y de la musculatura lisa se forman a partir de SUR2A y SUR2B, respectivamente, conectados a canales K^+ . Véase, Fujita ad Kurachi, 2000.

De este modo, existe la necesidad de una diana fisiológica decisiva en la inflamación celular que está asociada con la lesión en el cerebro en la isquemia cerebral y la lesión traumática en el cerebro y en la consiguiente morbilidad y mortalidad. También existe la necesidad de tratamientos específicos para el edema citotóxico que ocasiona la inflamación del cerebro, que empeora las consecuencias e incrementa la morbilidad y la mortalidad en la lesión del cerebro y el ictus. Asimismo existe la necesidad de compuestos terapéuticos capaces de modular la actividad de esta diana con el fin de prevenir la lesión en el cerebro.

La Patente de los Estados Unidos Núm. 5.215.985 está relacionada con un método para el tratamiento del insulto neuronal, tal como el causado por la carencia de oxígeno, administrando un bloqueador del canal de potasio sensible a ATP, tal como una sulfonilurea, por ejemplo tolbutamida.

Plangger, Acta Neurochir. (1994) [Supl] 60: 519-520 informa sobre el efecto de la torasemida sobre la presión intracraneal, la presión arterial sistémica y la presión por perfusión cerebral en edema de cerebro experimental de rata.

Khan et al., Journal of China Pharmaceutical University 2000, 31(4), 289-293 informan sobre la comparación de los efectos terapéuticos por el bloqueador del canal de K^+ minoxidil y el bloqueador gliburida sobre la isquemia cerebral producida por la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) y la levo-tiroxina en ratas.

Chen y Simard, J. Neuroscience 21(17): 6512-6521, Septiembre de 2001 informan de que un canal catiónico no selectivo activado por Ca^{2+} interno y bloqueado por ATP interno es expresado en astrocitos reactivos nativos de cerebro adulto dañado y que este canal está implicado en la inflamación secundaria de las células al agotamiento de ATP.

Compendio de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que el canal catiónico monovalente sensible a calcio y ATP no selectivo, que se denomina canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ y, que está presente en células neurales, está ligado a un SUR. Es posible escrutar o identificar antagonistas de la actividad del canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$. Adicionalmente, la invención se refiere al uso terapéutico de antagonistas, tales como sulfonilureas y otros bloqueadores SUR1, para inhibir la actividad de este canal y de ese modo evitar la inflamación de las células neurales y la muerte celular y la lesión del sistema nervioso concomitante que incluye inflamación del cerebro y lesión del cerebro.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un antagonista de SUR1 que bloquea el canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de la inflamación de las células neurales en el cerebro de un ser humano resultante de una lesión traumática del cerebro o una isquemia cerebral, en cuyo método se administra el antagonista de SUR1 después de la lesión traumática del cerebro o la isquemia cerebral.

El canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ de la presente invención se distingue por ciertas características funcionales, cuya combinación lo distingue de los canales iónicos conocidos. Las características que distinguen el canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ incluyen, pero no están necesariamente limitadas a, las siguientes: 1) es un canal catiónico no selectivo que permite fácilmente el paso de Na, K y otros cationes monovalentes; 2) es activado por un incremento en el calcio intracelular, y/o por una disminución en el ATP intracelular; 3) está regulado por el receptor de sulfonilurea de tipo 1 (SUR1), que hasta ahora se había considerado que estaba asociado exclusivamente con canales K_{ATP} tales como los encontrados en las

células pancreáticas β .

Más específicamente, el canal NC_{Ca-ATP} tiene una conductancia del canal individual para el ión potasio (K^+) entre 20 y 50 pS. El canal NC_{Ca-ATP} también es estimulado por Ca^{2+} en el lado citoplásmico de la membrana celular en un intervalo de concentración fisiológica, donde dicho intervalo de concentración es de 10^{-8} a 10^{-5} M. El canal NC_{Ca-ATP} también es inhibido por el ATP citoplásmico en un intervalo de concentración no fisiológico, donde dicho intervalo de concentración es de 10^{-1} a 10 M. El canal NC_{Ca-ATP} también es permeable a los siguientes cationes; K^+ , Cs^+ , Li^+ , Na^+ ; hasta el punto de que la razón de permeabilidad entre dos cualesquiera de dichos cationes es mayor de 0,5 y menor de 2.

Los compuestos que modulan la actividad del canal NC_{Ca-ATP} , en particular los antagonistas de SUR1, se pueden utilizar para tratar la inflamación del cerebro. De este modo es posible evitar la inflamación del cerebro y la lesión del cerebro resultante a través del uso terapéutico de antagonistas del canal NC_{Ca-ATP} . En una realización, el antagonista terapéutico se puede administrar a o dentro del cerebro. Semejante administración al cerebro incluye la inyección directamente al cerebro, concretamente en el caso en el que el cerebro se ha dejado accesible a la inyección debido a un trauma en el cráneo. La invención proporciona el uso terapéutico de compuestos de sulfonilurea como antagonistas para el canal NC_{Ca-ATP} para evitar la inflamación de las células en el cerebro. En una realización el compuesto de sulfonilurea es glibenclamida. En otra realización, el compuesto de sulfonilurea es tolbutamida.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 (que comprende las Figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E y 1F); la Figura 1A muestra el registro de la fijación de corriente de células completas antes y después de la exposición a ouabaína y antes y después de la exposición a NaN_3 . La Figura 1B muestra los registros de fijación de voltaje de células completas durante los pulsos en rampa (a) antes y (b) después de la exposición a NaN_3 ; (c) es la diferencia de corriente. La Figura 1C muestra los registros de fijación de voltaje de células completas durante los pulsos de la etapa (a) antes y (b) después de la exposición a NaN_3 ; (c) es la diferencia de corriente. La Figura 1D muestra el registro del parche anclado a la célula de aperturas del canal iónico individual inducidas por NaN_3 a potenciales de membrana de (3) -80 mV y (4) 80 mV, en comparación con parches de control a potenciales de membrana de (1) 80 mV y (2) -80 mV. La Figura 1E muestra las corrientes del parche anclado a la célula de la Figura 1D, mostradas a una resolución de tiempo mayor. La Figura 1F muestra la relación de corriente-voltaje de un solo canal del parche anclado a la célula.

Figura 2 (que comprende las Figuras 2A y 2B): la Figura 2A muestra las corrientes de un solo canal registradas en un parche interior-fuera a diferentes potenciales de membrana; la línea discontinua indica el cierre del canal. La Figura 2B es un gráfico de la amplitud del canal individual en el parche interior-fuera vs. potenciales de membrana.

Figura 3 (que comprende las Figuras 3A, 3B, 3C y 3D); la Figura 3A muestra corrientes de un solo canal registradas en un parche interior-fuera con diferentes iones alcalinos que sustituyen a K^+ en la pipeta; la línea discontinua indica el cierre del canal. La Figura 3B es un gráfico de la amplitud del canal vs. el potencial de membrana con diferentes iones alcalinos que sustituyen a K^+ en la pipeta. La Figura 3C es un gráfico de la amplitud del canal medida en parches interior-fuera vs. el voltaje con Ca^{2+} y Mg^{2+} que sustituyen a K^+ en la pipeta. Para estimar el tamaño del poro del canal, la Figura 3D es un gráfico que ilustra la relación entre la permeabilidad (con respecto a Cs^+) y el radio molecular de una serie de cationes orgánicos monovalentes, que incluían: (a) metanolamina, (b) guanidío, (c) etanolamina, (d) dietilamina, (e) piperazina, (f) Tris, y (g) N-metilglucamina, datos que indican un tamaño de poro equivalente de 0,67 nm.

Figura 4 (que comprende las Figuras 4A y 4B); la Figura 4A muestra registros de un solo canal en un parche interior-fuera en ausencia de ATP citoplásmico. La Figura 4B es un gráfico de la probabilidad de un canal abierto normalizada ($n \cdot Po$) vs. la concentración de ATP citoplásmico.

Figura 5 (que comprende las Figuras 5A y 5B); la Figura 5A muestra registros de corriente de un parche interior-fuera expuesto a diferentes concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$. Figura 5B valores de $n \cdot Po$ medido a los potenciales de membrana y $[Ca^{2+}]_i$ indicados.

La Figura 6 es un gráfico de las amplitudes de los canales individuales medias obtenidas en una configuración de parche interior-fuera a diferentes potenciales y con diferente $[Mg^{2+}]_i$; la línea discontinua indica la conductancia 35 pS.

La Figura 7 (que comprende las Figuras 7A y 7B) muestra la presencia de ARNm de SUR1 y las ausencias de Kir6.1 y Kir 6.2 en astrocitos reactivos. Las calles 3 y 5 de la Figura 7A muestran la presencia de SUR1 en células RIN-m5f de insulinoma y NRA, respectivamente. Las calles 4 y 6 de la Figura 7A demuestran que SUR2 está ausente en ambos tipos de células. Las calles 3 y 4 de la Figura 7B demuestran que Kir6.1 está presente en células RIN-m5f de insulinoma y Kir6.2 está ausente de las células de insulinoma, respectivamente. Las calles 5 y 6 de la Figura 7B demuestran que ni Kir6.1 ni Kir6.2 están presentes en NRA, respectivamente.

La Figura 8 muestra registros de corriente en un parche interior-fuera para ilustrar los efectos de la digestión con tripsina sobre la sensibilidad del canal a la glibenclamida y el ATP.

5 La Figura 9 (que comprende las Figuras 9A y 9B) demuestra que el activador del canal diazóxido puede lograr actividades del canal en una configuración de registro de parche exterior-fuera. La Figura 9A muestra los registros del parche exterior-fuera con azida de Na y diazóxido aplicados al lado extracelular de la membrana. La Figura 9B muestra los registros de corriente obtenidos a partir de los segmentos marcados con los correspondientes números en la Figura 9A, a una resolución temporal mayor.

10 Figura 10 (que comprende las Figuras 10A, 10B y 10C): la Figura 10A muestra registros en un parche exterior-fuera (a) antes, (b) durante, y (c) después de la aplicación de glibenclamida al lado extracelular de la membrana. La Figura 10B muestra los registros de corriente de la Figura 10A a una resolución temporal mayor. La Figura 10C muestra un gráfico de las amplitudes del canal individual medias a diferentes potenciales estudiados; la pendiente de los datos indica una conductancia de 35 pS del canal sensible a glibenclamida.

15 La Figura 11 (que comprende las Figuras 11A y 11B) demuestra que los compuestos de sulfonilurea inhiben las actividades del canal. La Figura 11A muestra los registros del parche exterior-fuera con diferentes concentraciones de tolbutamida aplicada al lado extracelular de la membrana. La Figura 11B muestra las curvas dosis-respuesta para la inhibición de la probabilidad de canal abierto por medio de glibenclamida y tolbutamida para proporcionar una probabilidad de canal abierto normalizada ($n \cdot P_o$); los datos se ajustaron a una ecuación logística convencional, con un coeficiente de Hill de 1 y una inhibición semi-máxima de 48 nM y 16,1 μ M; los valores trazados son las medias (\pm ET) de los parches 3 y 5 parches para Glibenclamida y Tolbutamida, respectivamente.

20 Figura 12 (que comprende las Figuras 12A, 12B, 12C, 12D, 12E, 12F, 12G, 12H y 12I); las Figuras 12A, 12B y 12C muestran la probabilidad de apertura del canal en presencia de tolbutamida 0 μ M, 3 μ M, y 30 μ M, respectivamente.

25 Las Figuras 12D, 12E y 12F muestran la distribución de los tiempos exposición del canal abierto en presencia de tolbutamida 0 μ M, 3 μ M, y 30 μ M, respectivamente.

30 Las Figuras 12G, 12H y 12I muestran la distribución de los tiempos de exposición del canal cerrado en presencia de tolbutamida 0 μ M, 3 μ M, y 30 μ M, respectivamente.

35 Figura 13 (que comprende las Figuras 13A, 13B y 13C): la Figura 13A muestra los registros del parche exterior-fuera con diazóxido aplicado al lado extracelular de la membrana.

La Figura 13B muestra registros de corriente a una resolución temporal mayor después de la aplicación de diazóxido y a diferentes potenciales de membrana.

40 La Figura 13C muestra un gráfico de las amplitudes del canal individual medias a los diferentes potenciales estudiados; la pendiente indica una conductancia de 35 pS del canal sensible a glibenclamida.

45 Las Figuras 14A, 14B y 14C son microfotografías electrónicas de barrido de astrocitos reactivos nativos recién aislados. La Figura 14A muestra las células cuando se inició la fijación con formaldehído-glutaraldehído en condiciones de control; la Figura 14B muestra las células fijadas 5 min después de la exposición a NaN₃ 1 mM. La Figura 14C muestra las células fijadas 25 min después de la exposición a NaN₃ 1 mM. Bar, 12 μ m.

50 Figura 15 (que comprende las Figuras 15A, 15B y 15C); la Figura 15A tiene fotomicrografías de las imágenes de epifluorescencia de células expuestas a diferentes compuestos y marcadas con yoduro de propidio (panel superior a, b y c) o anexina V (panel inferior d, e y f). Los compuestos fueron: control (a y d), azida de Na 1 mM (b y e), azida de Na 1 mM mas glibenclamida 1 μ M (c y f). La Figura 15B tiene gráficos de barras que muestran los recuentos de células para el marcaje con yoduro de propidio; comparaciones múltiples por pares indicadas a una diferencia significativa ($p < 0,05$) con tratamiento de azida de Na; la Figura 15C tiene gráficos de barras que muestran los recuentos celulares para la tinción con anexina V; las comparaciones múltiples por pares indicaron una diferencia no significativa con cualquier tratamiento.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

60 Algunas de las realizaciones preferidas de la presente invención se describirán con detalle con referencia a los dibujos adjuntos. Esta invención se puede plasmar de muchas formas diferentes y no se debe considerar que esté limitada a las realizaciones mostradas en la presente memoria.

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención hace referencia a un canal iónico novedoso cuya función subyace a la inflamación de las células neurales de mamífero, por ejemplo en respuesta al agotamiento de

ATP. Aparte del uso del canal para escrutar inhibidores del canal, e inhibidores del canal y especialmente antagonistas de SUR1, funcionan evitando esta respuesta de inflamación celular, que caracteriza al daño del cerebro en la isquemia cerebral y la lesión traumática del cerebro.

5 La azida de sodio (NaN_3) es una toxina metabólica utilizada para inducir "hipoxia química" por medio del agotamiento de ATP intracelular. Véase, Swanson, 1992. Las respuestas morfológicas y electrofisiológicas de las células neurales a NaN_3 se examinan en una preparación de células novedosa. Se utilizan astrocitos reactivos nativos recién aislados (NRA) de cerebro de rata adulta y se estudian en un estado nativo inmediatamente después de su aislamiento. Los astrocitos reactivos son astrocitos que han sido activados o estimulados in vivo, tales como
10 aquellos asociados con la lesión del cerebro o neural. En cerebros post-mortem de pacientes con lesión traumática del cerebro (TBI), los astrocitos reactivos se encuentran en las proximidades de la lesión: La mayoría de los astrocitos reactivos que rodean el lugar de una lesión en el cerebro son astrocitos reactivos. Los astrocitos reactivos de tipo 1 comprenden >80% de astrocitos reactivos recuperables, mientras los astrocitos reactivos de tipo 2 comprenden aproximadamente 5%. Los astrocitos reactivos están normalmente polarizados en condiciones
15 quiescentes.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "células neurales" incluye astrocitos. El término "astrocitos reactivos" representa los astrocitos encontrados en el cerebro en el lugar de una lesión o isquemia. El término "astrocitos reactivos nativos" o "NRA" representa astrocitos reactivos que están recién aislados del cerebro. El
20 término "recién aislados" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a NRA que han sido purificados del cerebro, concretamente NRA que fueron purificados de aproximadamente 0 a aproximadamente 72 horas antes. Cuando se hace referencia a NRA que están "purificados a partir del cerebro" la expresión "purificado" significa que los NRA están aislados de otro tejido del cerebro y/o implantados en gelatina o esponja, y no hace referencia a un proceso que simplemente cosecha una población de células sin aislamiento adicional de las células. Como se describe en la presente memoria, el canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ encontrado en los astrocitos reactivos está presente solamente en células recién aisladas; el canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ se pierde poco después de cultivar las células. Los NRA proporcionan un modelo in vitro que es más similar a los astrocitos reactivos ya que existen in vivo en el cerebro, que los astrocitos desarrollados en cultivo. Los términos "nativo" y "recién aislado" se utilizan como sinónimos. Según se
25 utiliza en la presente memoria, el término "células neurales aisladas" representa células neurales aisladas de cerebro.
30

Los astrocitos reactivos son producidos in vivo y cosechados del cerebro de acuerdo con un sistema de métodos similar al descrito por Perillan. Véase, Perillan et al., 1999; Perillan et al., 2000. Las células cosechadas se aíslan a continuación y no se cultivan; en vez de eso, los astrocitos reactivos recién aislados se estudian en un estado nativo
35 inmediatamente después de su aislamiento del cerebro.

Los Ejemplos descritos en la presente memoria revelan que los NRA de cerebro de rata adulta expresan un canal catiónico no selectivo que es activado por el agotamiento de $[\text{ATP}]_i$ a concentraciones fisiológicas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este canal de $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ de la presente invención, que está recién identificado en los NRA y está presente en >90% de los
40 parches de membrana de tales células, se distingue de los canales de calcio y ATP no selectivos referidos previamente por mostrar propiedades significativamente diferentes. Estas propiedades distintivas del $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ de la presente invención incluyen: estar activado por $[\text{Ca}]_i$ submicromolar y mostrar una sensibilidad diferente al bloqueo por diferentes nucleótidos de adenina. La apertura del canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ de la presente invención por el agotamiento de ATP causa una profunda despolarización de la membrana que precede al burbujeo de la membrana celular. Tras el
45 agotamiento del ATP, el canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ se abre para permitir el influjo de Na^+ que conduce a la inflamación de la célula. Este canal está regulado por el receptor de sulfonilurea de tipo 1 (SUR1). El canal puede ser bloqueado por sulfonilurea, tal como glibenclamida y tolbutamida; el tratamiento con glibenclamida da como resultado una reducción significativa en la inflamación y el burbujeo inducidos por el agotamiento químico de ATP. Este canal participa en el flujo de cationes implicado en la inflamación celular. Los compuestos de sulfonilurea pueden inhibir el
50 flujo de corriente a través del canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ e inhibir el burbujeo relacionado con la apertura del canal. Asimismo, el uso de compuestos de sulfonilurea y otros compuestos que inhiben el flujo de corriente a través del canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$, puede de este modo tener un efecto preventivo terapéutico sobre la inflamación celular en el cerebro.

Se puede proporcionar una composición que comprende una preparación de membrana que expresa el canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$. Por ejemplo, la preparación de membrana deriva de células neurales, tales como astrocitos reactivos nativos aislados (NRA), preferiblemente astrocitos reactivos nativos recién aislados. El canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ de la composición tiene las siguientes características: (a) es un canal de tipo 35 pS; (b) es estimulado por Ca^{2+} citoplásmico; (c) se abre cuando el ATP citoplásmico es menor de aproximadamente 0,8 μM ; y (d) es permeable a los cationes monovalentes K^+ , Cs^+ , Li^+ y Na^+ y puede ser bloqueado por antagonistas del receptor de sulfonilurea de tipo 1.
55

Además, es posible escrutar los antagonistas del canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$, mediante un método que comprende: (a) poner en contacto un compuesto de ensayo con una composición que comprende el canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$; y (b) identificar compuestos de ensayo que inhiben la actividad de dicho canal midiendo dicha actividad en presencia y ausencia de dicho compuesto de ensayo, en donde un compuesto de ensayo que inhibe dicha actividad es identificado como un
60

antagonista del canal NC_{Ca-ATP} . Por ejemplo, la composición puede contener una preparación de células neurales que expresan el canal NC_{Ca-ATP} o una preparación de membrana que expresa el canal NC_{Ca-ATP} , tal como una preparación de membrana derivada de astrocitos reactivos nativos aislados (NRA). El efecto del compuesto sobre este canal puede incluir: (a) el bloqueo del canal NC_{Ca-ATP} ; (b) el cierre del canal NC_{Ca-ATP} ; (c) la prevención de la apertura del canal NC_{Ca-ATP} ; y (d) la reducción de la magnitud de la corriente de membrana a través del canal NC_{Ca-ATP} . También es posible identificar un compuesto que es antagonista SUR1. Los compuestos que inhiben la inflamación de las células neurales pueden ser identificados de este modo.

De acuerdo con la presente invención, no obstante, la inflamación de las células neurales del cerebro de un sujeto se puede evitar administrando al sujeto una formulación que contenga una cantidad eficaz de un compuesto que bloquee el canal NC_{Ca-ATP} , en particular un antagonista de SUR1, y un portador farmacéuticamente aceptable. De este modo, se pueden aliviar los efectos negativos de la lesión en el cerebro o la isquemia cerebral que derivan de la inflamación de las células neurales en un sujeto. Semejante administración puede ser mediante liberación directamente en el cerebro, administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracutánea, intragástrica y oral. Los ejemplos de los antagonistas de SUR1 son las sulfonilureas como glibenclámda y tolbutamida, así como repaglinida, nateglinida, meglitinida, LY397364, LY389382, gliclazida, glimepirida, MgADP, y combinaciones de los mismos.

De este modo se puede proporcionar una formulación para prevenir o inhibir la inflamación celular en el cerebro de un sujeto, utilizando una formulación que incluye semejante compuesto que bloquea el canal NC_{Ca-ATP} y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la cantidad de dicho compuesto es al menos 10 veces mayor que la cantidad de dicho compuesto en las formulaciones para tratar la diabetes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención, y no para limitar la invención. Los ejemplos proporcionados en la presente memoria tienen fines ilustrativos solamente, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención. Si bien la invención se ha descrito con detalle, y con referencia a realizaciones específicas de la misma, será evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar varios cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de la misma. A continuación se describen experimentos y procedimientos ilustrativos que proporcionan un soporte de habilitación adicional para la presente invención. En particular, se describen estudios in vitro que utilizan astrocitos reactivos recién aislados y estudios in vivo que utilizan modelos animales apropiados.

Métodos generales

Preparación de células

Los astrocitos reactivos se producen in vivo y se cosechan de cerebro adulto de la siguiente manera: se implantan esponjas de gelatina (Gelfoam®, Upjohn Co., Kalamazoo MI) en una herida de arma blanca en el lóbulo parietal de ratas Wistar de 8 semanas de edad como se describe en la presente memoria. Los trozos de esponja se cosechan a los 8 días y se lavan tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) para eliminar el tejido adherente. Dependiendo del número de NRA requeridos para el estudio concreto, se pueden recoger los trozos de esponja antes o después tras la implantación en una herida de arma blanca, llevándose a cabo la cosecha preferida de aproximadamente 2 días a aproximadamente 30 días después de la implantación, y siendo el intervalo más preferido de aproximadamente 2 días a aproximadamente 3 días después de la implantación.

Los NRA se aíslan inmediatamente de los trozos de esponja de la siguiente manera: los trozos lavados se colocan en un tubo Eppendorf que contiene fluido cerebrospinal artificial (aCSF) compuesto por (mM): NaCl 124 mM, $MgCl_2$ 5,0 mM, 1,3 mM, $CaCl_2$ 2,0 mM, $NaHCO_3$ 26 mM, y D-glucosa 10 mM; a pH 7,4, ≈ 290 mOsm, en donde el aCSF contiene papaína 20 U/ml, inhibidor de tripsina 10 mg/ml y ADNasa al 0,01% (Worthington, Lakewood, NJ), refiriéndose el conjunto como "sistema de digestión". Este sistema de digestión es transferido a una incubadora (humidificada al 90%/aire 10%/CO₂, 37°C) durante 20 minutos, y se tritura suavemente cada 5 minutos. La suspensión celular se centrifuga a 3.000 rpm durante 1 minuto. Las células sedimentadas se resuspenden en aCSF y se almacenan a 4° C hasta su estudio.

Para algunos estudios, antes de la resuspensión en aCSF, las células sedimentadas se pueden purificar adicionalmente eliminando los glóbulos rojos de la sangre (RBC) utilizando una centrifugación en gradiente de densidad en Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). Este proceso de purificación adicional puede producir una población de células en las que $\ll 1\%$ son RBC, como se determina mediante microscopía de contraste de fases.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para estudiar el burbujeo y la inflamación celular, se exponen las células recién aisladas a la temperatura ambiente

a NaN_3 a continuación, después de diferentes intervalos de tiempo, las células se fijan utilizando formaldehído al 4% helado + glutaraldehído al 1% durante 24 horas, después se deshidratan utilizando concentraciones seriadas (35, 50, 75, 95, 100%) de etanol. Los especímenes se secan en el punto crítico (Tousimis), se recubren de oro (Technics), y se visualizan utilizando un microscopio electrónico de barrido AMR 1000.

5

Electrofisiología

Los experimentos se llevan a cabo a la temperatura ambiente, 22-25°C, utilizando NRA en el plazo de 24 horas desde el aislamiento celular. Se coloca una alícuota de estos NRA recién aislados en la cámara de registro cargado con solución de baño extracelular que contiene (mM): NaCl 130, KCl 10, CaCl_2 1, MgCl_2 1, HEPES 32,5, glucosa 12,5, pH 7,4. Después de que las células viables se adhieran a la superficie, el enjuagado con solución en exceso lava cualquier desecho celular residual no eliminado previamente mediante centrifugación. Las corrientes de la membrana se amplifican (Axopatch 200A, Axon Instruments, Foster City, CA) y se toman muestras en línea a 5 kHz utilizando un microordenador equipado con un tablero digitalizado (Digidata 1200A, Axon Instruments) y haciendo funcionar el programa Clampex (versión 8.0, Axon Instruments). Las corrientes de membrana se registran en células intactas utilizando las configuraciones de células completas tanto ancladas a membrana como perforadas con nistatina, de acuerdo con los métodos descritos por Horn y Marty, 1988. Las corrientes de membrana se registran en parches de membrana aislados libres de células, utilizando las configuraciones tanto interior-fuera como exterior-fuera, tal como describen Hamill et al., 1981. Las pipetas para el pinzamiento zonal, extraídas de vidrio de borosilicato (Kimax, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), tienen resistencias de 6-8 M Ω para los registros de un solo canal y de 2-4 M Ω para experimentos que utilizan la técnica de las células completas perforadas con nistatina. El electrodo del baño es un sedimento de Ag/AgCl (Clark Electromedical, Reading, Inglaterra) que se coloca directamente en el baño excepto cuando [Cl⁻] del baño es alterada, en cuyo caso se utiliza un puente de agar elaborado con KCl 3 M para conectar con el baño.

25

Los términos "intracelular" y "citoplásmico" son indistintos, como lo son los términos "extracelular" y "externo". Los términos "voltaje" y "potencial" son indistintos cuando hacen referencia al voltaje de membrana o al potencial de membrana. "Fijar" una membrana celular hace referencia a mantener el voltaje constante a través de la membrana celular y medir los cambios en la corriente de membrana a medida que la resistencia de la membrana cambia debido a la apertura y cierre del canal iónico ("fijación del voltaje") o mantener constante la corriente a través de la membrana celular y medir los cambios en el voltaje de membrana a medida que la resistencia de la membrana cambia debido a la apertura y cierre del canal iónico ("fijación de la corriente"). Cuando se impone un voltaje de membrana sobre la célula con una "rampa" o "pulso", se entiende que la membrana celular ha sido sometida a fijación del voltaje y que se está midiendo la corriente de membrana. Cuando se mide el "potencial en reposo" de la membrana, se entiende que la membrana celular ha sido sometida a fijación de la corriente y se está midiendo el voltaje de membrana.

35

La configuración experimental de "células completas" hace referencia a una situación en la que una pipeta de registro atraviesa la membrana celular de manera que la solución de la pipeta es continua con el citoplasma o la membrana bajo la pipeta es perforada utilizando nistatina, la solución externa está en contacto con la membrana extracelular, y los registros de corriente o voltaje representan las mediciones de la membrana celular completa. La configuración experimental de "parche anclado a la célula" hace referencia a una situación en la que la pipeta entra en contacto con la célula de manera que el parche todavía forma parte de la membrana celular intacta y se registran los canales del parche. La configuración experimental de "parche exterior-fuera" hace referencia a una situación en la que un parche escindido de la membrana celular es sellado a la punta de la pipeta de registro de manera que la solución de la pipeta está en contacto con el lado extracelular de la membrana, la solución externa está en contacto con el lado citoplásmico de la membrana, y los registros de corriente o voltaje representan mediciones del parche de membrana escindido. La configuración experimental de "parche interior-fuera" hace referencia a una situación en la que un parche escindido de la membrana celular es sellado a la punta de una pipeta de registro de manera que la solución de la pipeta está en contacto con el lado citoplásmico de la membrana, la solución externa está en contacto con el lado extracelular de la membrana, y los registros de corriente o voltaje representan mediciones del parche de membrana escindido.

40

El término "parches" incluye, pero no está limitado a: parches interior-fuera, parches exterior-fuera, un parche escindido de una membrana celular, o un parche anclado a una célula. El término "preparación de membrana" incluye parches así como membranas celulares aislados de células o tejidos de mamífero. Las membranas celulares de mamífero aisladas se producen mediante métodos bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de semejante preparación de membrana es una fracción microscópica purificada a partir de células desorganizadas o una muestra de tejido por medio de centrifugación en gradiente de sacarosa discontinua.

55

Se descartan los parches con una resistencia de sellado de <3 G Ω y una resistencia al acceso de >50 M Ω . Las corrientes de membrana macroscópicas se miden durante pulsos por etapas (600 ms) o durante pulsos en rampas (-140 a +50 mV a 0,32 mV/ms) desde un potencial mantenido de -67 mV.

Soluciones de registro

60

Para los registros macroscópicos de células completas, se utiliza una técnica de parche perforado con nistatina, con una solución de baño que contiene (mM): NaCl 130, KCl 10, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, HEPES 32,5, glucosa 12,5, pH 7,4. La solución de la pipeta contiene (mM): KCl 55, K₂SO₄ 75, MgCl₂ 8, y HEPES 10, pH 7,2. La nistatina, 50 mg (Calbiochem) se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO), 1 ml. Las soluciones de la formulación se elaboran antes del experimento añadiendo 16,5 µl de solución de partida de nistatina a 5 ml de la solución de la pipeta base para dar una concentración final de nistatina de 165 µg/ml y DMSO 3,3 µl/ml. Esta composición de la solución de la pipeta incluye K₂SO₄ en lugar de la porción de KCl que incluiría de otro modo. El anión SO₄²⁻, a diferencia de Cl⁻, no penetra a través del poro de nistatina. La reducción de la pipeta [Cl⁻] reduce la fuerza impulsora para Cl⁻ al interior de la célula, minimizando de ese modo la inflamación osmótica de la célula que se podría producir de otro modo durante el registro electrofisiológico (Horn y Marty, 1988).

Para el registro de parches anclados a células, se utiliza una solución de baño que contiene (mM): NaCl 130, KCl 10, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, HEPES 32,5, glucosa 12,5, pH 7,4. La pipeta contiene (mM): KCl 145, MgCl₂ 1, CaCl₂ 0,2, EGTA 5, HEPES 10, pH 7,28. La osmolaridad medida de la solución extracelular es ≈ 300 mOsm (Precision Systems, Natick, MA).

Para la mayor parte de los registros de parche interior-fuera, se utiliza una solución de baño que contiene (mM): CsCl 145, CaCl₂ 4,5, MgCl₂ 1, EGTA 5, HEPES 32,5, glucosa 12,5, pH 7,4. La pipeta contiene (mM): CsCl 145, MgCl₂ 1, CaCl₂ 0,2, EGTA 5, HEPES 10, pH 7,28. Para otros registros de parches interior-fuera, se reemplaza el Cs⁺ de las soluciones anteriores por K⁺ equimolar. Para los experimentos de sustitución de cationes inorgánicos, el Cs⁺ de la pipeta se reemplaza por concentraciones equimolares de iones de ensayo individuales, excepto cuando se utiliza Ca²⁺ o Mg²⁺, en cuyos casos se utiliza una concentración 75 mM para facilitar la formación del sellado (Cook et al., 1990).

Para el registro de parche exterior-fuera, la solución de la pipeta contiene (mM): CsCl 145, MgCl₂ 1, CaCl₂ 0,2, EGTA 5, HEPES 10, pH 7,28. La solución de baño convencional contiene (mM): CsCl 145, CaCl₂ 4,5, MgCl₂ 1, EGTA 5, HEPES 32,5, glucosa 12,5, pH 7,4. Para los experimentos de sustitución de cationes orgánicos, se reemplaza el Cs⁺ del baño por concentraciones equimolares de catión de ensayo.

Para los experimentos que requieren una baja concentración de Ca²⁺ libre en la solución de baño, se emplea solución tamponada Ca²⁺-EGTA, y se calcula [Ca²⁺] libre utilizando el programa WEBMAXC v2.10 (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>). Para [Ca²⁺]=1 µM, se utiliza EGTA 5 mM y sal de Ca²⁺ 4,5 mM. También se utiliza [Ca²⁺]=1 µM en soluciones para someter a ensayo las actividades del ATP intracelular y Mg²⁺.

Las amplitudes de un solo canal utilizadas para calcular la conductancia en pendiente se obtienen ajustando una función Gaussiana a un histograma de todos los datos de amplitud de los registros obtenidos a diferentes potenciales. Para calcular la probabilidad de canal abierto (n·Po) a diversos potenciales y con diferentes agentes de ensayo, se ajusta el histograma de todos los puntos a una función Gaussiana y se divide el área bajo la curva ajustada para el canal abierto por el área bajo la curva ajustada para el canal cerrado más abierto. Los valores de n·Po a diferentes concentraciones de agentes de ensayo se ajustan a una ecuación logística convencional utilizando un método de mínimos cuadrados.

Para estimar las permeabilidades iónicas de los diversos cationes con respecto a la de K⁺, se obtiene cada permeabilidad (Px/PK) a partir de su potencial de reversión (Erev) ajustando la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) bien conocida en la técnica. Véanse Goldman 1943; Hodgkin y Katz, 1949. Los datos de corriente-voltaje se ajustan a la ecuación GHK, suponiendo que tanto K⁺ como el ión de ensayo son permeantes.

Para estimar el tamaño de poro del canal NC_{Ca-ATP} de la presente invención, se evalúan las permeabilidades relativas de los cationes orgánicos. Se calcula el radio de Stokes-Einstein (r_{SE}) a partir de las conductividades limitantes (*) de los iones con la fórmula: r_{SE}·λ= constante. La constante se determina a partir del comportamiento de TEA a 25° C, para el cual λ=44,9 cm²Ω⁻¹, r_{SE}=0,204 nm. El radio de Stokes-Einstein se convierte a continuación en el radio molecular utilizando factores de corrección leídos en la Figura 6.1 en Robinson y Stokes, 1970. Se proporciona la conductancia limitante equivalente para la etanolamina (ídem) y las de los otros iones se calculan a partir de su peso molecular por medio de la fórmula, PM 0,5·λ=constante. La constante se determina por el valor para la etanolamina a 25°C: PM=62,1 y λ=4,42 cm²Ω⁻¹ equiv⁻¹. Las permeabilidades relativas (Px/PCs) se trazan a continuación frente a los radios iónicos calculados. El efecto del tamaño del soluto sobre la tasa de penetración (permeabilidad) a través de los poros se expresa por medio de la ecuación de Renkin (Renkin, 1955):

$$a/a_0 = [1-(r/R)]^2 \cdot [1-2,104(r/R) + 2,09 (r/R)^3 - 0,95 (r/R)^5] \quad (1)$$

en donde a, a₀, r, y R son las áreas eficaces del poro, el área transversal total del poro, el radio del soluto, y el radio del poro, respectivamente.

Los potenciales en la intersección se determinan con un electrómetro midiendo el potencial de difusión establecido a

través de una membrana de diálisis y se restan cuando es apropiado. Las corrientes de mantenimiento no se restan de ninguno de los registros. Se obtienen corrientes diferencia simplemente restando los registros de corriente antes y después de la perfusión de NaN_3 , sin emplear ningún otro proceso.

5 **Resultados**

Papel del canal $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ en la inflamación de las células neurales

Caracterización del canal

10

Ejemplo 1 Cambios morfológicos con agotamiento de ATP utilizando NaN_3

15

Se ha demostrado que las células neurales cultivadas se inflaman tras el agotamiento del ATP. Véanse, Jurkowitz-Alexander et al., 1992; Jurkowitz-Alexander et al., 1993. Los NRA recién aislados con el ATP agotado también dan como resultado inflamación celular. La isquemia o la lesión traumática del cerebro también ocasionan agotamiento de ATP en las células neurales del cerebro.

20

Las superficies de los NRA recién aislados son muy complejas, mostrando pequeñas evaginaciones de membrana y procesos finos que decoran toda la superficie celular, como se muestra en la micrografía electrónica de barrido en la Figura 14A. La exposición de los NRA a NaN_3 (1 mM) ocasiona cambios en la apariencia de la superficie, caracterizados temprano por la pérdida de la estructura compleja y el desarrollo de burbujas en la superficie (Figura 14B), seguido más tarde de una apariencia extremadamente inflamada con una pérdida completa de la estructura fina y la formación de múltiples burbujas grandes (Figura 14C). Por lo tanto, los NRA experimentan burbujeo e inflamación después del agotamiento del ATP inducido por NaN_3 .

25

La microscopía de contraste de fases también es útil para evaluar este proceso, aunque la estructura fina no se puede resolver. El burbujeo es visiblemente evidente 10-15 minutos después de la exposición a NaN_3 . Los cambios morfológicos de esta clase son atribuibles a la pérdida de la integridad del citoesqueleto, combinada con la acción de una fuerza osmótica que ocasiona la inflamación de la célula.

30

Para evaluar la contribución del gradiente osmótico a la inflamación de la célula, se repite el experimento en presencia de manitol, un agente oncótico no permeante. El manitol (50 mM), a una concentración suficiente para incrementar la osmolaridad de la solución extracelular de 300 a 350 mOsm, retrasa la formación de la burbuja >30 minutos después de la exposición a NaN_3 . El ATP celular también se puede agotar utilizando la exposición a NaCN (2,5 mM) más 2-desoxiglucosa (10 mM). Véase, Johnson et al., 1994. Se obtienen cambios morfológicos similares, incluyendo el burbujeo de la membrana celular y el retraso del burbujeo por manitol después de la exposición a NaCN y 2-desoxiglucosa. Esto demuestra que el efecto de NaN_3 se debe de hecho al agotamiento de ATP y no a ningún efecto no específico del NaN_3 .

35

40

Ejemplo 2 Propiedades electrofisiológicas generales de los NRA

Las corrientes macroscópicas de las preparaciones de células completas de NRA se caracterizan por pequeñas corrientes hacia adentro a potenciales negativos, grandes corrientes hacia afuera a potenciales positivos, y una región "meseta" plana a potenciales intermedios. Los NRA muestran corrientes macroscópicas que coherentes con las observaciones en células cultivadas primarias del mismo origen. Véanse, Perillan et al., 1999; Perillan et al., 2000. Las corrientes hacia adentro mostradas por los NRA negativas para el potencial en equilibrio de K^+ (E_{K}) son normalmente <100 pA, mucho más pequeñas que los valores referidos en astrocitos neonatales cultivados (Ransom y Sontheimer, 1995), pero coherentes con los descubrimientos en astrocitos recién aislados de cerebro lesionado (Bordey y Sontheimer, 1998; Schroder et al., 1999). Las grandes corrientes hacia afuera en los NRA son parcialmente bloqueadas por caribdotoxina (100 nM), iberiotoxina (100 nM) y cloruro de tetraetilamonio (5 mM), coherentes con la presencia de un gran canal de K^+ activado por conductancia de Ca^{2+} . Véase, Perillan et al., 1999. La corriente hacia afuera que permanece en presencia de caribdotoxina se puede bloquear adicionalmente por medio de 4-aminopiridina (5 mM), y muestra propiedades cinéticas típicas de un canal de K^+ rectificador retardado. Coincidiendo con un informe previo (Perillan et al., 1999), se observan corriente dependientes del voltaje hacia adentro atribuibles a canales de Na^+ en menos del 1% de los NRA.

50

55

NaN_3 logra despolarizar la corriente hacia adentro debida al canal 35 pS

Los registros de la fijación de corriente se utilizan para investigar el efecto del agotamiento de ATP por NaN_3 en NRA. Para estos experimentos, se utiliza un método de parche perforado con nistatina para garantizar que la desorganización metabólica procede de la aplicación del fármaco y no de la diálisis celular. La aplicación extracelular de NaN_3 (1 mM; temperatura ambiente) da como resultado una despolarización grande y rápida de las células (Fig. 1A). NaN_3 despolariza rápidamente las células a $E_{\text{m}} \approx 0$ mV (-4,3±0,9 mV). La despolarización normalmente comienza ~1 minuto después de la adición de NaN_3 , se completa en < 3 minutos, y es irreversible tras el lavado del fármaco.

60

La ouababina es un bloqueador de Na^+/K^+ -ATPasa conocido. Véase, Brismar y Collins, 1993. La magnitud de la despolarización observada con NaN_3 excede bastante la pequeña despolarización reversible inducida por la ouababina (1 mM). Esto indica que la gran despolarización observada después de la exposición a NaN_3 no está causada por un fallo en la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa.

El curso de tiempo para la despolarización con NaN_3 es apreciablemente más rápido que el curso de tiempo para el desarrollo del burbujeo de la membrana celular observado con el mismo tratamiento. Asimismo, ni el curso de tiempo ni la magnitud de la despolarización están afectados por la elevación de la osmolaridad extracelular con manitol 50 mM, un tratamiento que retrasa sustancialmente la formación de burbujas. De este modo, la despolarización es un evento primario, no secundario a la inflamación o el alargamiento celular.

Los registros de la fijación del voltaje muestran que la exposición a NaN_3 da como resultado un incremento neto de la corriente hacia adentro en los NRA. Los registros obtenidos utilizando pulsos tanto en rampa (Fig. 1B) como por etapas (Fig. 1C) muestran corrientes significativamente más grandes después del tratamiento con NaN_3 , como se muestra por medio de la comparación de los registros antes (a) y después (b) del tratamiento con NaN_3 . Un gráfico de las "corrientes diferencia", obtenido restando la curva de corriente-voltaje antes del fármaco a la de después del fármaco (línea c de la Fig. 1B), indica que la nueva corriente activada por NaN_3 revierte cerca de 0 mV. Un potencial de reversión próximo a 0 mV es indicativo de que la corriente inducida por NaN_3 es el resultado de una conductancia catiónica no específica.

Para caracterizar adicionalmente la corriente inducida por NaN_3 , se utilizan registros de parche anclados a células. La exposición a NaN_3 provoca corrientes de un solo canal en parches que no muestran corrientes de un solo canal antes de la adición del fármaco (Fig. 1D). Después de la adición de NaN_3 , los registros a una baja resolución temporal revelan un gran incremento en la varianza de la corriente que, después de incrementar la resolución temporal, se revela que se debe a eventos de un solo canal (Fig. 1E en 3 y 4). Las amplitudes de los eventos de un solo canal registrados a diferentes potenciales de membrana se trazan en la Fig. 1F, que demuestra que NaN_3 activa una conductancia de un solo canal de ≈ 35 pS que muestra una rectificación débil hacia adentro cuando se mide en la configuración anclada a células.

Se llevan a cabo experimentos adicionales en la configuración anclada a células con la solución de la pipeta con un suplemento de diferentes fármacos. Las corrientes de un solo canal inducidas por NaN_3 no son bloqueadas por TEA 10 mM, 4-AP 5 mM, iberiotoxina 100 nM, caribdotoxina 100 nM, o tetrodotoxina 1 μM (4-6 parches para cada compuesto). Estos experimentos que indican que no está implicado un canal de K^+ o Na^+ típico. Asimismo, debido a que se incluye en la solución de la pipeta Ca^{2+} 0,2 mM, es improbable que estas aperturas de un solo canal se deban al influjo de cationes monovalentes a través de un canal de Ca^{2+} de tipo L.

Se obtienen una despolarización similar y una activación del canal 35 pS cuando se agota el ATP celular utilizando la exposición a NaCN (2,5 mM) más 2-desoxiglucosa (10 mM). Esto demuestra que el efecto de NaN_3 está causado por el agotamiento de ATP y no por cualquier otro efecto no específico de NaN_3 .

Aparte del agotamiento de ATP, la escisión del parche es también un método altamente fiable para la activación del canal. De las más de 120 células estudiadas en la configuración de anclaje a las células, se detecta actividad espontánea del canal atribuible a una conductancia ≈ 35 pS solamente en 2 células. De este modo, el canal NCCa-ATP de la presente invención es típicamente silencioso en células metabólicamente sanas. En contraste, una canal ≈ 35 -pS se encuentra presente en $>90\%$ de los parches interior-fuera formados a partir de los NRA no expuestos a NaN_3 u otras toxinas metabólicas, demostrando de este modo que un elemento intracelular perdido en la escisión del parche normalmente evita la activación del canal.

Otro mecanismo potencial de activación del canal distinto de la escisión del parche es la disminución de volumen regulador (RVD). La inflamación celular es ampliamente reconocida como estímulo que inicia la RVD, un fenómeno acompañado por la activación de diferentes corrientes, incluyendo una canal catiónico no selectivo en algunos sistemas. Véase, Ono et al., 1994. Cuando se estudian parches de membrana en una configuración anclada a la célula, la estimulación hiposmótica (210 mosmoles/kg H_2O) activa los eventos de un solo canal, pero ninguno muestra una conductancia ≈ 35 pS. Este descubrimiento indica que la despolarización y la activación del canal observadas con NaN_3 no son parte de una respuesta de RVD secundaria a la inflamación celular inducida por NaN_3 , y se ajusta a la observación previamente indicada de que la despolarización inducida por NaN_3 precedía a la inflamación celular. Este hecho está apoyado por la observación de que el canal de NCCa-ATP es raramente observado en parches anclados a células, pero se vuelve evidente en $>90\%$ de los parches después de la conversión en una configuración interior-fuera. Asimismo, el canal de NCCa-ATP se pierde poco después de cultivar los astrocitos reactivos.

Ejemplo 3 Permeabilidades relativas y tamaño del poro

El canal se caracteriza adicionalmente utilizando parches de membrana en la configuración interior-fuera. Los

registros obtenidos durante los pulsos de ensayo a diversos potenciales con igual $[K^+]$ a ambos lados de la membrana se muestran en la Fig. 2A. Se construyen histogramas de amplitud de los eventos observados a potenciales de -140 mV a +100 mV, y se trazan los valores (media \pm ET) para 4 parches y se muestran en la Fig. 2B. El ajuste de los datos a una ecuación lineal indica una conductancia en pendiente de 35 pS, con un potencial de reversión extrapolado (E_{rev}) de +0,1 mV, próximo al potencial de reversión de K^+ esperado (E_K) de 0 mV.

Además de conducir K^+ , el canal transporta una variedad de iones alcalinos (Fig. 3A), indicando que es un canal catiónico no selectivo. En los parches interior-fuera, la conductancia del canal se mide con diversos iones alcalinos en la solución de la pipeta, incluyendo Cs^+ , Na^+ , Rb^+ , K^+ , y Li^+ , siempre con K^+ equimolar en la solución de baño. Los datos de corriente-voltaje se ajustan a la ecuación GHK. Se demuestra que el Na^+ tiene una conductancia en pendiente casi igual (32,6 pS) en comparación con K^+ (35,2 pS), pero la conductancia en pendiente se reduce con otros cationes (Fig. 3B). Las mediciones de E_{rev} se utilizan para estimar las permeabilidades relativas para la serie de iones alcalinos. Los valores para las permeabilidades relativas derivadas de la ecuación GHK son $P_{Cs^+}/P_{K^+}=1,06$, $P_{Na^+}/P_{K^+}=1,04$, $P_{Rb^+}/P_{K^+}=1,02$, y $P_{Li^+}/P_{K^+}=0,96$, indicando que este canal es casi igual de permeable a todos los cationes monovalentes.

También se evalúa la permeabilidad del canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención a los aniones, tales como Cl^- . Después de medir las amplitudes de corriente de un solo canal a diferentes potenciales con KCl 145 mM, se cambia la solución de baño por gluconato de K^+ equimolar. Cuando se utiliza un puente de agar, el cambio de solución da como resultado un cambio en $E_{rev} < 0,5$ mV, indicando que el canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención es esencialmente impermeable a los aniones.

También se investiga la permeabilidad del presente canal a los cationes divalentes, Ca^{2+} y Mg^{2+} (Fig. 3C). Cuando el ión potasio de la solución de la pipeta se reemplaza por Ca^{2+} o Mg^{2+} 75 mM, no se detectan corriente hacia adentro. El ajuste a la ecuación GHK proporciona mejores valores de ajuste para $E_{rev} < -65$ mV para Ca^{2+} y Mg^{2+} respectivamente, proporcionando permeabilidades relativas con respecto a K^+ de $< < 0,001$, indicando que este canal es esencialmente impermeable a cationes divalentes.

Debido a que el canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención discrimina muy poco entre los cationes inorgánicos monovalentes (Figs. 3A y B), se llevan a cabo experimentos para determinar el tamaño de poro equivalente del canal midiendo la permeabilidad del canal, con respecto a Cs^+ , para una amplia gama de cationes orgánicos. Utilizando una configuración de parche exterior-fuera, se trazan las relaciones corriente-voltaje de un solo canal para obtener E_{rev} para numerosos cationes orgánicos. Las razones de permeabilidad se obtienen a continuación a partir de los ajustes a la ecuación GHK. Para cada uno de los cationes orgánicos (a) metanolamina, (b) guanidino, (c) etanolamina, (d) dietilamina, (e) piperazina, (f) Tris, y (g) N-metilglucamina, se traza el valor medio de la permeabilidad relativa medida frente a su radio molecular hidratado (Fig. 3D, círculos vacíos). Las razones de permeabilidad definen una serie de valores que decaen suavemente que están bien ajustados por la ecuación de Renkin. La ecuación de Renkin describe la penetración de una esfera rígida a través de un poro cilíndrico. Renkin, 1955. El ajuste a la ecuación de mínimos cuadrados, indica un radio del poro equivalente de 0,67 nm para el canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención. Un radio de poro de 0,67 nm es similar a tamaños de poro de 6 Å, encontrados para el canal de Ca^{2+} (McCleskey y Almers, 1985) y 7,4 Å, encontrado para el canal de nAChR (Adams et al., 1980). Los potenciales en la intersección determinados de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria generalmente no excedieron de 5 mV.

Ejemplo 4 Inhibición por [ATP]_i

El canal de NC_{Ca-ATP} es inhibido por ATP intracelular, basándose en el descubrimiento de que este canal se activa después del agotamiento de ATP intracelular por exposición a NaN_3 (Véanse las Figs. 1B, 1C, 1D y 1E) o a NaCN más 2-desoxiglucosa. Este hecho está apoyado por la observación de que el canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención es raramente observado en parches anclados a células procedentes de células sanas, pero se vuelve evidente en >90% de los parches después de la conversión en una configuración interior-fuera.

Los parches interior-fuera se utilizan para demostrar que el canal es sensible al bloqueo por ATP en el lado citoplásmico de la membrana. Los parches se estudian utilizando Cs^+ como portador de carga, para asegurarse de que ningún canal de K^+ , tal como $Kir2.3$ o K_{ATP} , está contribuyendo a la actividad del parche. Sin ATP y con Ca^{2+} 1 μM en el baño, el canal de NC_{Ca-ATP} muestra aperturas vigorosas. El ATP 1 mM causa una disminución profunda en la actividad del canal, un efecto que es fácilmente revertido tras el lavado (Fig. 4A); no obstante, la disponibilidad del canal no resulta afectada por AMP o ADP 1 mM. La probabilidad de apertura del canal ($n \cdot Po$) se mide a diferente $[ATP]_i$, y estos valores se normalizan con respecto al obtenido a $[ATP]_i = 0$ mM, y se ajustan a una ecuación logística convencional. Como se muestra en la Fig. 4B, el canal de NC_{Ca-ATP} es bloqueado por $[ATP]_i$ de una manera dependiente de la dosis. La inhibición semi-máxima (CI_{50}) se observa a $[ATP]_i = 0,79$ μM con un coeficiente de Hill de 1, y la actividad del canal se anula completamente a $[ATP]_i > 30$ μM . El ADP y el AMP, no tienen efecto sobre la actividad del canal de NC_{Ca-ATP} en los parches interior-fuera.

Este análisis in vitro para determinar la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semi-

máxima de la actividad del canal (Cl_{50}) se puede utilizar para formular dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la Cl_{50} .

Ejemplo 5 Activación por $[Ca^{2+}]_i$

También se ha encontrado que la concentración de Ca^{2+} al lado citoplásmico de la membrana regula la actividad del canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención. La relación entre la actividad del canal de NC_{Ca-ATP} y $[Ca^{2+}]_i$ se examina utilizando parches interior-fuera estudiados a un potencial de membrana (E_m) = -80 mV. El cambio en $[Ca^{2+}]_i$ afecta claramente a la actividad del canal de NC_{Ca-ATP} (Fig. 5A). Cuando $[Ca^{2+}]_i$ libre es <30 nM, no hay actividad aparente del canal. Con $[Ca^{2+}]_i$ >30 nM, la probabilidad de apertura ($n \cdot Po$) se incrementa de acuerdo con la $[Ca^{2+}]_i$, hasta $\approx 1 \mu M$ de $[Ca^{2+}]_i$, a la cual la actividad es próxima al máximo.

Se ha encontrado que el efecto de Ca^{2+} sobre la disponibilidad del canal depende del voltaje de la membrana. Los valores de $n \cdot Po$ de 4-9 parches obtenidos a tres potenciales diferentes, E_m = -40 mV, -80 mV y -120 mV, se normalizan con respecto a los valores observados con $[Ca^{2+}]_i$ 3 μM . Estos datos se ajustan a una ecuación logística convencional utilizando un coeficiente de Hill de 1,5 y valores semi-máximos de 0,12 μM , 0,31 μM y 1,5 μM a -40 mV, -80 mV y -120 mV, respectivamente (Fig. 5B). Estos datos indican que la actividad del canal es fuertemente dependiente de $[Ca^{2+}]_i$ a concentraciones fisiológicamente relevantes, y que el efecto de Ca^{2+} depende del voltaje, coincidiendo con un sitio de unión a Ca^{2+} en el interior del campo eléctrico de la membrana.

Ejemplo 6 El Mg^{2+} interno ocasiona una rectificación

Debido a que ciertos canales son sensibles al Mg^{2+} intracelular (Chuang et al., 1997; Perillan et al., 2000), se llevan a cabo experimentos para determinar si la rectificación del canal observada en los registros de parches anclados a células (véase la Fig. 1F) podría estar debida al Mg^{2+} intracelular. Utilizando parches interior-fuera estudiados con K^+ equimolar a ambos lados de la membrana, se varía $[Mg^{2+}]_i$ al lado citoplásmico. Se muestran los registros de un solo canal y las amplitudes de canal observadas con $[Mg^{2+}]_i$ diferentes (Fig. 6). No hay una rectificación evidente con $[Mg^{2+}]_i \approx 30 \mu M$, pero a $[Mg^{2+}]_i \approx 100 \mu M$, está presente una fuerte rectificación creciente. A 100 μM , el Mg^{2+} parece producir un bloqueo intermitente.

Ejemplo 7 Identificación de la presencia de SUR en los NRA

Para determinar si los receptores SUR se encuentran presentes en los NRA, se evalúa la unión de la glibenclamida a estas células mediante microscopía de fluorescencia. Se lesionaron ratas Wistar de ocho semanas de edad mediante una herida con arma blanca en la materia blanca subcortical e implantación de una esponja de gelatina como se ha descrito previamente en la presente memoria. Ocho días más tarde, se incuban secciones de tejido de cerebros fijados con formaldehído de los animales lesionados durante 60 minutos a la temperatura ambiente con glibenclamida conjugada con FITC 20 nM. Una imagen de fluorescencia de la esponja de gelatina muestra células marcadas revistiendo las cavidades de la esponja. En cerebro adyacente a la lesión, esencialmente no es evidente la unión a glibenclamida. Estos datos indican que SUR, que normalmente no está presente en la materia blanca subcortical, son expresados en las células neurales después de la lesión traumática.

RT-PCR

El ARN total extraído de las células y utilizado para sintetizar ADNc, que se amplifica a partir de astrocitos reactivos, se analiza mediante RT-PCR sobre un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La Fig. 7A es una fotografía del gel que muestra la RT-PCR para SUR1 y SUR2. La Figura 7B es una fotografía de un gel que muestra la RT-PCR para Kir6.1 y Kir6.2. Las calles 3 y 4 de las Figs. 7A y 7B muestran la RT-PCR para células de insulinoma. Las calles 5 y 6 muestran la RT-PCR para astrocitos reactivos. La calle 1 de las Figs. 7A y 7B representa marcadores de tamaño en escala; La calle 2 de las Figs. 7A y 7B es un blanco de control. En la Fig. 7A, las calles 3 y 4 muestran los experimentos con SUR1 y SUR2, respectivamente, en células de insulinoma. Se sabe que las células de insulinoma expresan SUR1, pero no SUR2. Las calles 5 y 6 de la Fig. 7A muestran los experimentos con SUR1 y SUR2 en astrocitos reactivos, respectivamente. La Fig. 7A demuestra que el ARNm de SUR1 está presente en astrocitos reactivos, así como en las células de insulinoma de control. SUR2 está ausente en ambos tipos de células. En la Fig. 7B, las calles 3 y 4 muestran los experimentos con Kir6.1 y Kir6.2 en células de insulinoma, respectivamente. Kir6.1 está presente en células de insulinoma, pero Kir6.2 no. Kir6 es el canal de potasio asociado con SUR1 en células de insulinoma. Las calles 5 y 6 de la Fig. 7B demuestran que ni Kir6.1 ni Kir6.2 están presentes en astrocitos reactivos. Por lo tanto, los astrocitos reactivos expresan ARNm de SUR1, pero el ARNm de Kir6.1 y Kir6.2 está ausente de las células.

La presencia de SUR1 en astrocitos reactivos combinada con la regulación del canal de NC_{Ca-ATP} en astrocitos por los antagonistas de SUR indican que SUR regula el canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención.

Ejemplo 8 Productos digeridos con tripsina

Un rasgo característico de la función de K_{ATP} regulada por SUR es que la digestión con tripsina de la cara citoplásmica del canal, pero no de su cara extracelular, ocasiona una pérdida de inhibición por sulfonilureas, sin alterar la sensibilidad al ATP y sin cambiar las propiedades biofísicas del canal. El efecto de la tripsina sobre la función del NC_{Ca-ATP} se muestra en la Fig. 8. En las condiciones de control, la actividad del canal en la configuración de parche interior-fuera es fuertemente inhibida por glibenclamida $1\mu M$. La exposición a $100\mu g/ml$ de tripsina en el lado citoplásmico de la membrana durante 3 minutos da lugar a un parche que todavía muestra una fuerte actividad del canal, pero la actividad del canal todavía está completamente no afectada por la glibenclamida. Después de semejante tratamiento con tripsina del lado citoplásmico, las propiedades biofísicas del canal, incluyendo la conductancia del canal abierto, los tiempos de canal abierto, la activación mediada por Ca^{2+} permanecen inalteradas, y el canal todavía mantiene su típica sensibilidad al ATP. En contraste, la exposición del lado extracelular de la membrana no tiene efecto sobre la inhibición por glibenclamida. Estos datos de la digestión con tripsina del canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención proporcionan una evidencia adicional que apoya que SUR1 está implicado en la regulación del canal de NC_{Ca-ATP} , debido a que los resultados se comparan con los descubrimientos anteriores de los canales de K_{ATP} regulados por SUR1. La conexión de un SUR con un canal catiónico sensible a ATP no selectivo no ha sido demostrada previamente.

Análisis para compuestos o composiciones que bloquean el canal de NC_{Ca-ATP} e inhiben la inflamación de las células neurales

Ejemplo 9 Efectos de los compuestos de sulfonilurea

Se sabe que los compuestos de sulfonilurea modulan el receptor de sulfonilurea. Un receptor de sulfonilurea está generalmente asociado con canales de K_{ATP} como componente regulador, y se encuentra en diversos tejidos, incluyendo NRA de rata. Notablemente, los canales de K_{ATP} Kir6.1 y Kir6.2 no están presentes en NRA de rata (Fig. 7B). Es posible activar el canal de NC_{Ca-ATP} con el ligando de SUR diazóxido en parches exterior-fuera (Figs. 9A y 9B). NaN_3 no provoca la actividad del canal en parches de membrana aislados, indicando que funciona a través del agotamiento de ATP en lugar de cualquier efecto directo sobre el canal.

Ejemplo 10 Análisis in vitro para determinar el bloqueo dependiente de la dosis del canal de NC_{Ca-ATP}

Se sabe que los compuestos que bloquean SUR1, tales como la glibenclamida y la tolbutamida, tienen un efecto inhibitorio sobre los canales de K_{ATP} . En una realización, la presente invención llega a los objetivos de la invención proporcionando un método en el que se determina el efecto inhibitorio directo de la glibenclamida y la tolbutamida sobre los canales de NC_{Ca-ATP} (Figs. 10 y 11). Se utilizan parches interior-fuera para mostrar el efecto inhibitorio de las sulfonilureas. Para garantizar que ningún canal de K^+ , concretamente K_{ATP} está contribuyendo a la corriente del parche, se utiliza Cs^+ como portador de carga. La actividad del canal es profundamente reducida por la adición de glibenclamida $10\mu M$ (Figs. 10A a b), y se demuestra que la actividad es debida a un canal catiónico $35 pS$, lo que es consistente con el canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención (Fig. 10C). También se ha demostrado que otra sulfonilurea, la tolbutamida, inhibe la actividad del canal de NC_{Ca-ATP} (Figs. 11A y 11B). Como se muestra en la Fig. 11B, el canal de NC_{Ca-ATP} es bloqueado por las sulfonilureas de una manera dependiente de la dosis. Con la tolbutamida, la inhibición semi-máxima (CE_{50}) se observa a $16,1\mu M$ con un coeficiente de Hill de 1,3, y la actividad del canal se pierde completamente a concentraciones $>300\mu M$. Con la glibenclamida, la CE_{50} se observa a $48 nM$ con un coeficiente de Hill de 1,2. La sensibilidad del canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención al bloqueo en los NRA con estos dos compuestos de sulfonilurea se corresponde estrechamente con lo referido en las células β pancreáticas y en los sistemas de expresión con SUR1, pero no con SUR2.

Este análisis in vitro para determinar la concentración del compuesto de ensayo que logra la inhibición semi-máxima de la actividad del canal se puede utilizar para formular la dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante.

Ejemplo 11 Mecanismo de regulación del canal por las sulfonilureas

El canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención muestra dos estados abiertos, con un tiempo de permanencia más corto y más largo, cada uno de menos de 10 ms. La Figura 12 muestra los datos de un parche que muestra una probabilidad de canal abierto ($n \cdot Po$) de 0,63, con valores de tiempo de permanencia abierto τ_{0-1} y τ_{0-2} de 1,9 y 8,2 ms. Después de la aplicación sucesiva de tolbutamida $3\mu M$ (Figs. 12B y 12E) y tolbutamida $30\mu M$ (Figs. 12C y 12F), $n \cdot Po$ disminuía a 0,44 y 0,09, respectivamente, pero los valores de tiempo de permanencia abierto no resultan afectados apreciablemente por el fármaco. Los tiempos de permanencia del canal cerrado se incrementan en duración y frecuencia con la tolbutamida (Figs. 12H y 12I). De este modo, el canal de la presente invención muestra una forma de inhibición del canal en la que el compuesto bloqueador no tiene efecto sobre los tiempos de permanencia del canal abierto y un incremento progresivo en los cierres prolongados. Esta forma de inhibición del canal es similar a la producida por sulfonilureas que actúan sobre el canal de K_{ATP} en las células β pancreáticas. Véanse, Gillis et. al., 1989; Babeenko et. al., 1999).

Ejemplo 12

La aplicación de 100 μM del activador de SUR diazóxido activa el canal de 35pS de la presente invención, ocasionando una débil rectificación hacia el interior en los parches anclados a células (Figs. 13A, 13B y 13C). Para determinar el tipo de SUR que afecta a la activación del canal de $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ de la presente invención, se llevan a cabo experimentos utilizando compuestos de sulfonilurea que activan preferentemente SUR 2 sobre SUR1, esto cromakalina, y pinacidil. Tanto la cromakalina como el pinacidil no tuvieron efecto sobre el canal de $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ de la presente invención, lo que es coherente con otros datos descritos en la presente memoria que indican que SUR1 está asociado con el canal de $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ de la presente invención, y la activación del canal no está mediada por SUR2.

Ejemplo 13 Inflamación celular mediada por SUR

Después de la adición de NaN_3 para agotar el ATP de las células, el burbujeo celular típicamente se vuelve evidente en 7-10 minutos. El diazóxido es un agonista de SUR1 o un activador de SUR1. Cuando se añade diazóxido solo a las células, se produce el burbujeo incluso sin agotamiento del ATP, por lo tanto el Diazóxido, abre el canal directamente sin agotamiento del ATP por medio de la activación con SUR1. Sin embargo, cuando las células se pretratan con glibenclamida, la adición de NaN_3 no ocasiona burbujeo, ni siquiera después de 30 minutos. De este modo, la activación del canal de $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ por agotamiento del ATP o por el abridor del canal, diazóxido, puede producir burbujeo e inflamación de los NRA, y que la inflamación pueda ser evitada mediante el bloqueo del canal con glibenclamida. El agotamiento del ATP por azida de Na puede dar como resultado la muerte de las células necróticas de los NRA. Este descubrimiento se ajusta a los datos descritos en la presente memoria de que la glibenclamida protege de la apertura del canal de $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ después del agotamiento del ATP, y de que la apertura de este canal es responsable del burbujeo celular.

El antagonista utilizado en los métodos de la presente invención incluye un compuesto que interfiere en la función de $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$. Típicamente, el efecto de un antagonista se observa en forma de un bloqueo de la corriente en $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ en condiciones en las que el canal ha sido activado y se puede medir la corriente en ausencia del antagonista.

Además de los compuestos de sulfonilurea específicos de SUR1, los agentes que bloquean SUR1, también incluyen compuestos que no están relacionados estructuralmente con las sulfonilureas. Tales bloqueadores de SUR1 incluyen una clase de compuestos secretagogos de insulina que se unen a SUR, que fueron identificados y desarrollados para el tratamiento de la diabetes de tipo 2. Los derivados de benzamida: repaglinida, nateglinida, y meglitinida representan una de tales clases de secretagogos de insulina, que se unen a SUR. La nateglinida es un derivado de aminoácido. Asimismo, se han identificado derivados de imidazolina que interaccionan con la subunidad 1 del receptor de sulfonilurea (SUR) tal como midaglizol (KAD-1229), LY397364 y LY389382.

En una realización preferida de la presente invención, los compuestos que bloquean preferentemente SUR1, pero no SUR2, se utilizan en el método de la presente invención. Tales compuestos incluyen tolbutamida y gliclazida. Los siguientes compuestos bloquean tanto SUR1 como SUR2: glibenclamida, glimepirida, repaglinida, and meglitinida. En otra realización más del método de la presente invención, la administración se combina con MgADP, que se ha demostrado que produce un incremento evidente de la eficacia de la sulfonilurea sobre los canales que contienen SUR1, pero no SUR2.

Ejemplo 14

Para determinar si la activación de $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ por agotamiento del ATP inicia la necrosis de los astrocitos reactivos que expresan este canal, se llevan a cabo estudios para determinar si la glibenclamida es capaz de proteger a los astrocitos reactivos de la muerte celular inhibiendo la actividad del canal de $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ por medio de su acción sobre SUR1. Se evalúan dos tipos de muerte celular, apoptosis y necrosis, después del agotamiento del ATP.

De este modo, la activación del canal de $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$ es responsable de la muerte necrótica de los NRA después del agotamiento del ATP, y de que la glibenclamida pueda evitar esta forma de muerte celular.

En este ejemplo, la preparación de NRA recién aislados se purificó adicionalmente mediante eliminación de los RBC, como se describe en la presente memoria, para proporcionar una población celular que tenga <1% de RBC. Más del 95% de las células tuvieron potenciales en reposo próximos a E_K , sugiriendo que el método de disociación enzimática no había perjudicado apreciablemente a las células. Más del 95% de las células son positivas para el marcador de astrocitos, la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) como se determinó mediante inmunofluorescencia. Cuando se examinan mediante microscopía de fases, los NRA tienen diferentes tamaños, que oscilan entre 11 y 45 μm de diámetro, algunos de los cuales están en fase brillante y otros en fase oscura. Un subgrupo de las células en fase brillante tuvo procesos celulares cortos pero claros que son más cortos que el soma de la célula. En este ejemplo, solamente se estudian las células en fase brillante más grandes ($\approx 30 \mu\text{m}$ de diámetro), con procesos cortos

(<1 longitud de la célula). Esta población de NRA expresa de forma fiable los canales de NC_{Ca-ATP} .

Se llevan a cabo experimentos a la temperatura ambiente (22-25°C) en el plazo de 24 hr desde el aislamiento celular. Se coloca una alícuota de células en un portaobjetos para cámara (LAB-TEK, Naperville, IL) cargado con solución de extracelular que contiene (mM): NaCl 130, KCl 10, $CaCl_2$ 1, $MgCl_2$ 1, HEPES 32,5, glucosa 12,5, pH 7,4. Después de que las células viables se adhieran a la superficie, se lava cualquier desecho residual que no se haya eliminado previamente mediante centrifugación arrastrando con solución en exceso. Las células se someten a agotamiento de ATP por medio de azida de Na para activar (abrir) los canales de NC_{Ca-ATP} , y a continuación se incuban con glibenclamida (1 μ M).

Después de eso, se examinan las células mediante tinción con yoduro de propidio (PI) para evidenciar la permeabilización de la membrana celular, una indicación de muerte celular oncótica o necrótica temprana. Véase, Barros et al., 2001. Las células también se examinan mediante unión a anexina V etiquetada con fluoresceína para evidenciar la externalización del fosfoaminoácido fosfatidilserina procedente de la cara interna de la membrana plasmática hacia la superficie externa, una indicación temprana de apoptosis. Véanse, Clodi et al., 2000; Rucker-Martin et al., 1999. El procedimiento de tinción se lleva a cabo de acuerdo con las directrices del fabricante (Vybrant Apoptosis Assay Kit 2, Molecular Probes). Los portaobjetos se montan utilizando medio de montaje anti-apagamiento ProLong (Molecular Probes). Las señales se visualizan utilizando un microscopio epifluorescente Nikon Diaphot (Leitz Wetzlar). Las imágenes se capturan y se almacenan utilizando una cámara digital SenSys (Roper Scientific Inc.) y el programa IPLab (versión 3.0; Scanalytics Inc.). Las células positivas para Anexina V o las células positivas para PI se cuentan en 20 campos individuales utilizando una lente de objetivo 20 \times . Los valores medios de las células positivas en los 20 campos para diferentes grupos de tratamiento se comparan utilizando comparaciones múltiples ANOVA por pares, considerándose $p < 0,05$ una indicación de diferencia significativa.

Las fotografías de la microscopía de fluorescencia mostradas en la Fig. 15A demuestran que en las condiciones de partida (control), las células tanto positivas para anexina V como positivas para PI (fotos a y d, respectivamente) son raras en los productos aislados celulares. Después de una incubación de 10 min con azida de Na (1 mM), el número de células positivas para PI aumentó sustancialmente ($p < 0,05$) (Fig. 15A de la foto b y Fig. 15B). Esto indica que el agotamiento de ATP desencadena la muerte necrótica en estas células. En contraste, el tratamiento con azida de Na hizo que el número de células positivas a anexina V aumentara ligeramente; no siendo estadísticamente significativo el aumento ($p > 0,05$) (Fig. 15A de la foto e y Fig. 15C). Esto indica que la muerte apoptótica no fue un criterio de valoración fundamental del agotamiento de ATP en estas células.

El pretratamiento de las células con glibenclamida (1 μ M) en el momento de la administración de azida de Na aumentó de manera espectacular el número de células positivas para PI ($p < 0,05$; Fig. 15A de la foto c y Fig. 15B), indicando una protección significativa frente a la muerte necrótica después del agotamiento de ATP. El número de NRA que experimentaron muerte apoptótica también disminuyó con la glibenclamida, como se indica mediante el marcaje con anexina V (Fig. 15A de la foto f y Fig. 15C), pero los valores de este grupo no fueron significativamente diferentes.

Estos datos indican que el canal de NC_{Ca-ATP} está implicado en el mecanismo de muerte celular necrótica de los astrocitos reactivos. Este Ejemplo demuestra que la muerte celular necrótica, en lugar de la apoptótica, es el criterio de valoración principal del agotamiento de ATP en estas células. Por lo tanto, el agotamiento de ATP por azida de Na inicia la muerte celular por eliminación del bloqueo de ATP del canal de NC_{Ca-ATP} , iniciando de ese modo la inflamación de las células oncóticas. La implicación de este canal en la inflamación de las células oncóticas se confirma demostrando que la muerte necrótica también puede ser inducida por diazóxido, el abridor del canal que activa el canal de NC_{Ca-ATP} en estas células, y podría ser bloqueada por glibenclamida, que evita la apertura del canal de NC_{Ca-ATP} . La implicación del canal de NC_{Ca-ATP} en la muerte celular de los astrocitos reactivos proporciona un mecanismo y una diana de muerte en estas células, así como la importancia de bloquear el canal de NC_{Ca-ATP} para prevenir la muerte de los astrocitos reactivos, que se produce en la lesión traumática del cerebro.

Ejemplo 15

Análisis in vitro para determinar la capacidad de un compuesto de ensayo para proporcionar el bloqueo dependiente de la dosis del canal de NC_{Ca-ATP}

Los compuestos que bloquean los canales de NC_{Ca-ATP} pueden ser identificados por un método en el cual se determina el efecto inhibitor directo del compuesto de ensayo sobre los canales de NC_{Ca-ATP} . Los parches interior-fuera se utilizan para mostrar el efecto inhibitor del compuesto. Para garantizar que el canal de K^+ , concretamente K_{ATP} contribuye a la corriente del parche, se utiliza Cs^+ como portador de carga. Los compuestos que disminuyen profundamente la actividad del canal, y se demuestra que la actividad se debe a un canal catiónico de 35 pS, se identifican como compuestos que bloquean los canales de NC_{Ca-ATP} y son capaces de inhibir la inflamación de las células neuronales y la inflamación del cerebro. Se utilizan concentraciones variables del compuesto para determinar si el canal de NC_{Ca-ATP} es bloqueado por el compuesto de una manera dependiente de la dosis. Se determinan la

5 concentración a la cual se observa una inhibición semi-máxima (CE_{50}) y la concentración a la cual la actividad del canal se ha perdido completamente. Se puede comparar la sensibilidad del canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención para bloquear los NRA con el compuesto de ensayo. Este análisis in vitro para determinar la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semi-máxima de la actividad del canal se puede utilizar para formular la dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante.

Ejemplo 16

Análisis in vivo para determinar el bloqueo dependiente de la dosis del canal de $NCCa-ATP$

10 La concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semi-máxima de la actividad del canal se utiliza para formular la dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante. La dosis de compuesto de ensayo que logra un intervalo de concentración en plasma circulante calculado mediante los métodos conocidos en la técnica se administra a un animal que tiene una lesión en el cerebro o isquemia cerebral.

15 Para determinar si el compuesto de ensayo evita, inhibe o disminuye la inflamación del cerebro, se mide la presión epidural y/o la presión intracraneal del animal, por ejemplo utilizando un microglobo, para controlar cuantitativamente la inflamación del cerebro. Asimismo, la inflamación se puede controlar mediante formación de imágenes por resonancia magnética (RM). Tres estudios diferentes inician la administración ante, en el momento de, o después de la lesión en el cerebro. Un compuesto que proporciona disminuciones de la inflamación celular, en comparación con los controles, se identifica como un compuesto capaz de inhibir la inflamación de las células neuronales y la inflamación del cerebro. Se utilizan concentraciones variables del compuesto para determinar si el compuesto proporciona eficacia de una manera dependiente de la dosis. Se determinan la dosis a la cual se observa la inhibición semi-máxima y la concentración a la cual la inflamación del cerebro se alivia más rápidamente. Se producen formulaciones que comprenden la dosis eficaz óptima del compuesto de ensayo para prevenir, inhibir, o disminuir la inflamación del cerebro, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

20

25

Compendio de las características del canal de NC_{Ca-ATP}

30 Las características de las células y las composiciones que contienen el canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1

Propiedades de las células y las composiciones de membrana que contienen el canal de NC_{Ca-ATP} de la presente invención		
	Astroцитos Reactivos	Preparación de membrana derivada de astroцитos reactivos nativos recién aislados
Permeable a cationes monovalentes?	Si:	Si:
	Na ⁺	Na ⁺
	K ⁺	K ⁺
	Li ⁺	Li ⁺
	Rb ⁺	Rb ⁺
	Cs ⁺	Cs ⁺
	(Na ⁺ ≈K ⁺ ≈Li ⁺ ≈Rb ⁺)	(Na ⁺ ≈K ⁺ ≈Li ⁺ ≈Rb ⁺)
Permeable a aniones?	No	No
Permeable a cationes divalentes?	No	No
Compuestos que bloquean la actividad del canal	Antagonistas de SUR1	Antagonistas de SUR1
La apertura del canal requiere:	-Agotamiento de ATP intracel.	-Agotamiento de ATP intracel.
		- Mg ²⁺ intracel.
	- Mg ²⁺ intracel.	
Conductancia de un solo canal	~35 pS	~35 pS
Activación [Ca ²⁺]	<1,0 μM	<1,0 μM
[ATP] _i CE ₅₀ (um)	0,79 μM	0,79 μM
ADP	Sin efecto en el canal	Sin efecto en el canal
AMP		
Radio del poro (nm)	0,41	0,41

5 Los antagonistas de SUR1 identificados a través de los análisis tales como los descritos en la presente memoria pueden ser útiles, por ejemplo, en la elaboración de la función biológica del canal de NC_{Ca-ATP} y para aliviar la inflamación del cerebro.

10 Los análisis para someter a ensayo la eficacia de los antagonistas de SUR1 identificados en el barrido celular se pueden someter a ensayo en sistemas de modelos animales para la inflamación del cerebro. Tales modelos animales se pueden utilizar como sustratos de ensayo para la identificación de fármacos, productos farmacéuticos, terapias e intervenciones que pueden ser eficaces en el tratamiento de la inflamación del cerebro. Por ejemplo, los
15 modelos animales de inflamación en el cerebro, tales como la lesión del cerebro, se pueden exponer a un compuesto, que se sospecha que muestra una capacidad para inhibir la inflamación del cerebro, a una concentración suficiente y durante un tiempo suficiente para lograr semejante inhibición de la inflamación del cerebro en los animales expuestos. La respuesta de los animales a la exposición se puede controlar utilizando medios visuales (p. ej., radiológicos, CAT, MRI), medición de la presión intracraneal, y/o la reversión de los síntomas asociados con la inflamación del cerebro. Con respecto a la intervención, cualquier tratamiento que revierta cualquier aspecto de los síntomas asociados con la inflamación del cerebro se debe considerar candidato a la intervención terapéutica de la inflamación. Las dosificaciones de los agentes de ensayo se pueden determinar obteniendo las

curvas dosis-respuesta, como se comenta en la presente memoria.

Por consiguiente, la presente invención es útil en el tratamiento o el alivio de la inflamación y muerte de las células neurales y la inflamación del cerebro, especialmente aquellos insultos del cerebro relacionados con la lesión traumática del cerebro, el daño del sistema nervioso central o periférico, la isquemia cerebral, tal como el ictus, o las complicaciones que implican y/o derivan del edema, la lesión, o el trauma. Tales daños o complicaciones se pueden caracterizar por un daño o aberración evidente en el cerebro, cuyos síntomas pueden ser reducidos por los métodos de la presente invención incluyendo la administración de una cantidad eficaz de los compuestos o sustancias activas descritos en la presente memoria. De acuerdo con una realización específica de la presente invención la administración de cantidades eficaces del compuesto activo pueden bloquear el canal, que si permanece abierto conduce a inflamación de las células neurales y muerte celular. Varios antagonistas de SUR1 son adecuados para bloquear el canal. Los ejemplos de los antagonistas de SUR1 adecuados incluyen, pero no están limitados a glibenclamida, tolbutamida, repaglinida, nateglinida, meglitinida, LY397364, LY389382, gliclazida, glimepirida, y combinaciones de los mismos. En una realización preferida de la invención los antagonistas de SUR1 se seleccionan del grupo que consiste en glibenclamida y tolbutamida. Se pueden adoptar otras "estrategias" terapéuticas más para prevenir la inflamación y la muerte de las células neurales incluyendo, pero no limitadas a los métodos para mantener la célula neural en un estado polarizado y los métodos que evitan la despolarización fuerte.

Ejemplo 17

Mecanismos adicionales para mantener los NRA en un estado polarizado

Cuando los astrocitos reactivos están fuertemente despolarizados debido a la apertura del canal de NC_{Ca-ATP} , experimentan burbujeo e inflamación y eventualmente sufren muerte celular necrótica. Como se ha establecido anteriormente, cuando los astrocitos reactivos están fuertemente despolarizados debido a la apertura de un canal no selectivo que es sensible a Ca^{2+} y a ATP (canal de NC_{Ca-ATP}), experimentan burbujeo e inflamación y eventualmente sufren muerte celular necrótica. La muerte de estos astrocitos Reactivos se puede evitar si se puede evitar la fuerte despolarización, en otras palabras, si las células se pueden mantener en un estado polarizado.

Un modo potencial de mantener los NRA es un estado polarizado consiste en abrir el canal de Kir2.3. Los NRA se exponen al abridor del canal de Kir2.3, Tenidap, para mantener los canales de Kir2.3 abiertos. Los astrocitos reactivos nativos recién cosechados de cerebros de rata adulta después de la lesión se exponen a Tenidap para evaluar la capacidad del fármaco para abrir el canal de Kir2.3 en estas células. Preferiblemente, los astrocitos reactivos de tipo 1 (R1) se cosechan y se utilizan en este análisis. Uno de los subtipos de astrocitos reactivos es el astrocito de tipo R1. Los astrocitos de tipo R1 comprenden la mayor población de astrocitos recuperables en el lugar de la lesión del cerebro. Están localizados de forma característica en la región del tejido que rodea el sitio de la lesión, muchos de los cuales se encuentra que han migrado por sí mismo al sitio de la lesión. Véase, Perillan, et al., 1999.

Los astrocitos reactivos que son parte de la respuesta celular a TBI e ictus comprenden al menos dos subtipos. Uno de los subtipos de astrocitos reactivos es el astrocito de tipo R1. Los astrocitos de tipo R1 comprenden la población más grande de astrocitos recuperables en el lugar de la lesión del cerebro. Están localizados característicamente en la región de tejido que rodea el sitio de la lesión, habiéndose encontrado que muchas de estas células también han migrado al sitio de la lesión por sí mismas. Véase, Perillan, et al. 1999.

Los astrocitos de tipo R1 son el tipo predominante de astrocitos de reactivos en las preparaciones de NRA. Los astrocitos de tipo R1 expresan dos canales iónicos sumamente importantes en su membrana celular: (a) el canal de Kir2.3, que está presente en células cultivadas así como en células recién aisladas; y (b) el canal de NC_{Ca-ATP} , que está presente solamente en astrocitos reactivos recién aislados y que se pierden poco después del cultivo. El Kir2.3 es un rectificador del canal hacia el interior que es sumamente importante para mantener la célula polarizada a un potencial de reposo normal próximo del potencial de reversión de potasio (≈ -75 mV). Cuando este canal es inactivado o inhibido, la célula se despolariza a un potencial próximo al potencial de reversión del cloruro (≈ -25 mV). Los rasgos característicos del canal de NC_{Ca-ATP} son: 1) es un canal catiónico no selectivo que permite el paso de Na, K y otros cationes monovalentes bastante rápidamente; 2) es activado por un incremento en el calcio intracelular, y/o por un descenso en el ATP intracelular; y 3) está regulado por el receptor de sulfonilurea de tipo 1 (SUR1). Se ha considerado que SUR1 está asociado exclusivamente con los canales de K_{ATP} , tales como los encontrados en las células β pancreáticas.

La apertura del canal de NC_{Ca-ATP} después del agotamiento de ATP, como con la isquemia o la hipoxia, ocasiona la despolarización de la célula debido al influjo de Na. Este influjo de Na incrementa la carga osmótica dentro de la célula, y como resultado, entra H_2O en la célula para equilibrar la carga osmótica. El resultado es un exceso de Na y H_2O intracelularmente, una respuesta patológica que produce el burbujeo celular y la inflamación de la célula y que es conocida como edema citotóxico. Sin control, esta respuesta patológica conduce eventualmente a la muerte celular. Como se describe en la presente memoria, esta muerte celular es en su mayor parte muerte celular

necrótica, pero en un grado menor, también muerte celular apoptótica.

Se pueden utilizar numerosos enfoques para aliviar la inflamación del cerebro debida a edema citotóxico. Un tratamiento utilizado actualmente para tratar a los pacientes en situaciones clínicas relevantes se basa en una osmolaridad extracelular creciente para reducir la fuerza impulsora para el flujo de H_2O . Esta estrategia también reduce el burbujeo en células aisladas.

Una estrategia más específica para reducir el edema citotóxico es la inactivación o el bloqueo del canal de NC_{Ca-ATP} que es responsable principalmente del flujo de Na que introduce el H_2O en la célula y que realmente causa el edema citotóxico. Un enfoque altamente selectivo para inactivar este canal consiste en explotar la relación única entre el canal y la subunidad reguladora de control, SUR1. Se han desarrollado varios fármacos que interactúan con SUR1 en las células β pancreáticas para bloquear el canal de K_{ATP} en esas células y tratar de ese modo la diabetes. Algunos de estos fármacos pertenecen a la clase de agentes denominados sulfonilureas. Como se describe en la presente memoria, los fármacos que bloquean el canal de K_{ATP} , tales como glibenclamida y tolbutamida, son altamente eficaces al bloquear el canal de NC_{Ca-ATP} en astrocitos de tipo R1. Los fármacos capaces de bloquear el canal de NC_{Ca-ATP} en los NRA (a) evitan el burbujeo celular en respuesta al agotamiento de ATP, (b) reducen significativamente la muerte celular después del agotamiento de ATP. Asimismo, el uso de glibenclamida para tratar la inflamación del cerebro es un animal que padece un ictus o una lesión del cerebro se describe en la presente memoria.

Otra estrategia más para combatir el efecto del canal de NC_{Ca-ATP} y reducir el edema citotóxico sería contrarrestar la despolarización de la célula que acompaña a la apertura del canal de NC_{Ca-ATP} . Un modo de lograr esto consiste en intensificar la apertura de los canales de Kir2.3 que también están presentes en estas células. Un compuesto anti-inflamatorio, Tenidap, es un abridor de canales de Kir2.3. Véanse, Popp et al., 1992; Liu et al., 2002.

El Tenidap se valúa para determinar su capacidad para reducir el burbujeo celular y la inflamación y la muerte celular necrótica en respuesta al agotamiento de ATP en las células aisladas así como in situ en cerebro de rata lesionado. Para evaluar si el Tenidap abre los canales de Kir2.3 en los astrocitos de tipo R1, se utilizan métodos similares a los descritos en la presente memoria para evaluar el estatus del canal de NC_{Ca-ATP} . Los resultados de tales experimentos que demuestran que el Tenidap abre los canales de Kir2.3 en los astrocitos de tipo R1, y reducen el burbujeo celular y la muerte celular en respuesta al agotamiento de ATP indicarían la utilidad de Tenidap en el tratamiento de la inflamación del cerebro y del edema citotóxico resultante de TBI o de la isquemia cerebral. La cantidad eficaz de Tenidap es aquella cantidad capaz de reducir la inflamación del cerebro o la isquemia cerebral debido a la capacidad del fármaco para inhibir la inflamación de las células neurales y la muerte celular necrótica.

Es probable que los bloqueadores de SUR1 sean los más específicos, proporcionando de manera fiable los menores efectos secundarios no deseados. Adicionalmente, una combinación de tratamientos que incluya el uso de diuréticos osmóticos, bloqueadores del canal de $NCCa-ATP$ tales como glibenclamida y abridores del canal de Kir2. 3 tales como Tenidap, puede proporcionar mejor eficacia en el alivio del edema citotóxico y la reducción de la morbilidad y la mortalidad en la lesión del cerebro y el ictus. Cuando se utiliza para aliviar los efectos negativos de la lesión traumática del cerebro o la isquemia cerebral provenientes de la inflamación de las células neurales en un sujeto, una formulación puede proporcionar una dosis diaria de Tenidap que es de aproximadamente 10 mg/día a aproximadamente 500 mg/día, o, cuando se administra directamente en el cerebro, la dosis diaria de Tenidap es de aproximadamente 500 mg/día a 1,5 gms/día o mayor.

Formulaciones farmacéuticas y métodos de tratamiento de la inflamación de las células neurales y la inflamación del cerebro

Composiciones de la presente invención

La presente invención también contempla métodos terapéuticos que emplean composiciones que comprenden las sustancias activas descritas en la presente memoria. Preferiblemente, estas composiciones incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos o sustancias activos junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Según se utiliza en la presente memoria, el término portador "farmacéuticamente aceptable" representa una carga, diluyente, material encapsulante, formulación coadyuvante de cualquier tipo líquido, semi-sólido, sólido inerte, no tóxico, o simplemente un medio acuoso estéril, tal como solución salina. Algunos ejemplos de los materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa, almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata, celulosa y sus derivados tales como sal de sodio de carboximetilcelulosa, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta, gelatina, talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol, polioles tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres tales como

oleato de etilo y laurato de etilo, agar; agentes tamponadores tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua libre de pirógeno; solución salina isotónica, solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones de tampón fosfato, así como otras sustancias compatibles no tóxicas utilizadas en formulaciones farmacéuticas.

5 También pueden estar presentes agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes en la composición, de acuerdo con el criterio del formulador. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, agua, antioxidantes solubles tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio, y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y los agentes quelantes metálicos tales como ácido cítrico, ácido etilenediaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Determinaciones de la dosis

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" o simplemente "cantidad eficaz" de un compuesto activo, tal como glibenclamida o tolbutamida, se quiere significar una cantidad suficiente del compuesto para tratar o aliviar la inflamación del cerebro con una razón beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos activos y las composiciones de la presente invención será decidido por el médico a cargo dentro del criterio lógico del juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que se esté tratando y la gravedad de la lesión del cerebro o isquemia; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la ruta de administración, y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados de forma combinada o coincidente con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

30 La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en análisis con células o animales experimentales, p. ej., para determinar la DL50 (dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la razón DL50/DE50. Se prefieren los compuestos que muestran índices terapéuticos grandes. Si bien se pueden utilizar compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado de diseñar un sistema de liberación que dirija tales compuestos al lugar del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial para las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

40 Los datos obtenidos de los análisis de cultivos de células y de estudios en animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de análisis basados en células. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la CI50 (esto es, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semi-máxima de los síntomas) determinada en el cultivo de células. Semejante información se puede utilizar para determinar más exactamente las dosis útiles en seres humanos. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

50 La dosis diaria total de los compuestos activos de la presente invención administrados a un sujeto en una sola dosis o en dosis divididas puede estar en cantidades, por ejemplo, de 0,01 a 25 mg/kg de peso corporal o más normalmente de 0,1 a 15 mg/kg de peso corporal. Las composiciones de una sola dosis pueden contener tales cantidades o submúltiplos de las mismas hasta sumar la dosis diaria. En general, los regímenes de tratamiento de acuerdo con la presente invención comprenden la administración a un ser humano u otro mamífero que necesite semejante tratamiento de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg de las sustancias activas de esta invención por día en múltiples dosis o en una sola dosis de 1 mg, 5 mg, 10 mg, 100 mg, 500 mg o 1000 mg.

60 En ciertas situaciones, puede ser importante mantener una dosis razonablemente elevada del agente activo en la corriente sanguínea del paciente, concretamente al principio del tratamiento. Semejante dosis razonablemente elevada puede incluir una dosis que sea varias veces mayor que su uso en otras indicaciones. Por ejemplo, la dosis anti-diabética típica de la glibenclamida oral o IV es de aproximadamente 2,5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg por día; la dosis anti-diabética típica de la tolbutamida oral o IV es de aproximadamente 0,5 gm/kg a aproximadamente 2,0 gm/kg por día; la dosis anti-diabética típica para la gliclazida oral es de aproximadamente 30 mg/kg a

aproximadamente 120 mg/kg por día; sin embargo, se pueden requerir dosis mucho mayores para bloquear la inflamación de las células neurales y la inflamación del cerebro.

Por ejemplo, en un método de prevención de la inflamación de las células neurales en el cerebro de un sujeto mediante la administración al sujeto de una formulación que contiene una cantidad eficaz de un compuesto que bloquea el canal de NCCa-ATP y un portador farmacéuticamente aceptable, tales formulaciones pueden contener de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 gramos de tolbutamida o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 150 miligramos de glibenclamida. En otra realización de la presente invención dirigida a un método de alivio de los efectos negativos de la lesión traumática del cerebro o isquemia cerebral derivada de una inflamación de las células neurales en un sujeto se administra al sujeto una formulación que contiene una cantidad eficaz de un compuesto que bloquea el canal de NCCa-ATP y un portador farmacéuticamente aceptable.

En situaciones de lesión traumática del cerebro o isquemia cerebral (tal como ictus), o hipoxia cerebral, puede ser importante mantener una dosis razonablemente elevada del agente activo para garantizar la liberación en el cerebro del paciente, concretamente al principio del tratamiento. Por consiguiente, al menos inicialmente, puede ser importante mantener la dosis relativamente elevada y/o a un nivel sustancialmente constante durante un período de tiempo dado, preferiblemente, al menos aproximadamente seis o más horas, más preferiblemente, al menos aproximadamente doce o más horas, y muy preferiblemente, al menos aproximadamente veinticuatro o más horas. En situaciones de lesión traumática del cerebro o isquemia cerebral (tal como ictus), puede ser importante mantener una dosis razonablemente elevada del agente activo para garantizar la liberación en el cerebro del paciente, concretamente al principio del tratamiento. Cuando el método de la presente invención se emplea para tratar afecciones que implican hemorragia en el cerebro, tal como lesión traumática en el cerebro o isquemia cerebral (tal como ictus), la liberación a través del sistema vascular está disponible y no se requiere necesariamente que el compuesto atraviese rápidamente la barrera hemato-encefálica.

Formulaciones y administración

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar solos o combinados o en una terapia concurrente con otros agentes que afectan al sistema nervioso central o periférico, concretamente áreas seleccionadas del cerebro.

Las formas de dosificación líquida para la administración oral pueden incluir emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, tales como agua, soluciones iónicas, o solución salina. Tales composiciones pueden comprender coadyuvantes, tales como agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas inyectables estériles se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites fijados estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite fijado blando incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Además, se utilizan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables.

La formulación inyectable se puede esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizadores en forma de composiciones sólidas estériles, que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso.

Con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, a menudo es deseable ralentizar la absorción de un fármaco procedente de una inyección subcutánea o intramuscular. El modo más común de lograr esto es inyectar una suspensión de material cristalino o amorfo con una escasa solubilidad en agua. La tasa de absorción del fármaco es dependiente de la tasa de disolución del fármaco, que a su vez, depende del estado físico del fármaco, por ejemplo, el tamaño del cristal y la forma cristalina. Otro enfoque para retrasar la absorción de un fármaco consiste en administrar el fármaco en forma de una solución o suspensión en aceite. Las formas de depósito inyectable también se pueden elaborar formando matrices de microcápsulas de fármacos y polímeros biodegradables, tales como polilactida-poliglicósido. Dependiendo de la proporción de fármaco con respecto a polímero y de la composición del polímero, la tasa de liberación de fármaco puede ser controlada. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poliortoésteres y polianhídridos. Los inyectables de depósito también se pueden elaborar atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones, que son compatibles con los tejidos corporales.

Los supositorios para la administración rectal del fármaco se pueden preparar mezclando el fármaco con un

excipiente no irritante adecuado, tal como manteca de cacao y polietilenglicol que son sólidos a la temperatura normal pero líquidos a la temperatura rectal y por lo tanto, se fundirán en el recto y liberarán el fármaco.

5 Las formas de dosificación sólidas para la administración oral pueden incluir cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, cápsulas de gel y gránulos. En tales formas de dosificación el compuesto activo se puede mezclar con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosificación también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, p. ej., lubricantes para la formación de comprimidos y otras ayudas para formar comprimidos tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también
10 pueden comprender agentes tamponadores. Los comprimidos y las píldoras se pueden preparar adicionalmente con recubrimientos entéricos y otros recubrimientos de control de la liberación.

15 Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina rellenas duras y blandas utilizando excipientes tales como lactosa o galactosa así como polietilenglicoles de elevado peso molecular y similares.

20 Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con un o más excipientes como se ha observado anteriormente. Las formas de dosificación sólida de los comprimidos, cápsulas, píldoras, y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Pueden contener opcionalmente agentes para conferir opacidad y también pueden tener una composición de manera que liberen el ingrediente o los ingredientes activos solamente, o preferiblemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente de una manera retardada. Los ejemplos de las composiciones de imbibición que se pueden utilizar incluyen sustancias poliméricas y ceras.

25 Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen adicionalmente pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes o parches. Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar la liberación controlada del compuesto activo en el organismo. Tales formas de dosificación se pueden elaborar disolviendo o dispersando el compuesto en el medio apropiado. También se pueden utilizar intensificadores de la absorción para incrementar el flujo del
30 compuesto a través de la piel. La tasa se puede controlar o bien proporcionando una membrana que controle la tasa o bien dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de esta invención, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

35 El método de la presente invención emplea los compuestos identificados en la presente memoria para aplicaciones tanto in vitro como in vivo. Para las aplicaciones in vivo, los compuestos de la invención se pueden incorporar a una formulación farmacéuticamente aceptable para su administración. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los niveles de dosificación adecuados cuando se utilizan de este modo los compuestos de la invención.

40 Según se emplea en la presente memoria, la expresión "niveles de dosificación adecuados" hace referencia a niveles de compuesto suficientes para proporcionar concentraciones circulantes suficientemente elevadas para bloquear eficazmente el canal de NCCa-ATP y evitar o reducir la inflamación de las células neurales in vivo.

45 De acuerdo con una realización concreta de la presente invención, se contemplan composiciones que comprenden al menos un compuesto antagonista de SUR1 (como se ha descrito anteriormente), y un portador farmacéuticamente aceptable.

50 Los portadores farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen portadores adecuados para la administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracutánea, y similares. Se contempla la administración en forma de cremas, lociones, comprimidos polvos dispersables, gránulos, jarabes, soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles, y similares.

55 Para la preparación de líquidos orales, los portadores adecuados incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, y similares, que contienen opcionalmente aditivos tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, y similares.

60 Para la preparación de fluidos para la administración parenteral, los portadores adecuados incluyen soluciones, suspensiones, o emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de los disolventes o vehículos no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Tales formas de dosificación también pueden contener coadyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes, y dispersantes. Estos se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, incorporando agentes esterilizantes a las composiciones, irradiando las composiciones, o calentando las composiciones. También se

pueden formular en forma de agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. El compuesto activo se mezcla en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario que se pueda requerir.

5 La descripción anterior de las realizaciones preferidas de la presente invención se ha presentado con fines ilustrativos y descriptivos. No se pretende ser exhaustivo ni limitar la invención a las formas precisas descritas. Muchas variaciones y modificaciones de las realizaciones descritas en la presente memoria serán evidentes para un experto en la técnica a la luz de la descripción anterior. El alcance de la invención va a ser definido solamente por las reivindicaciones adjuntas, y por sus equivalentes.

10 Las citas completas para las referencias citadas en la presente memoria se proporcionan en la siguiente lista

- Adams DJ, Dwyer TM, Hille B (1980) The permeability of endplate channels to monovalent and divalent metal cations. *J Gen Physiol* 75:493-510.
- 15 Aguilar-Bryan L., Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, III, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonilurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268: 423-426.
- Barros LF, Stutzin A, Calixto A, Catalan M, Castro J, Hetz C, Hermosilla T (2001) Nonselective cation channels as effectors of free radical-induced rat liver cell necrosis. *Hepatology* 33: 114-122.
- 20 Bordey A, Sontheimer H (1998) Properties of human glial cells associated with epileptic seizure foci. *Epilepsy Res* 32: 286-303.
- Brismar T, Collins VP (1993) Effect of external cation concentration and metabolic inhibitors on membrane potential of human glial cells. *J Physiol (Lond)* 460: 365-383.
- Champigny G, Verrier B, Lazdunski M (1991) A voltage, calcium, and ATP sensitive non selective cation channel in human colonic tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 176: 1196-1203.
- 25 Christensen O, Hoffmann EK (1992) Cell swelling activates K⁺ and Cl⁻ channels as well as nonselective, stretch-activated cation channels in Ehrlich ascites tumor cells. *J Membr Biol* 129: 13-36.
- Chuang H, Jan YN, Jan LY (1997) Regulation of IRK3 inward rectifier K⁺ channel by m1 acetylcholine receptor and intracellular magnesium. *Cell* 89: 1121-1132.
- 30 Cook DI, Poronnik P, Young JA (1990) Characterization of a 25-pS nonselective cation channel in a cultured secretory epithelial cell line. *J Membr Biol* 114: 37-52.
- Fujita A, Kurachi Y (2000) Molecular aspects of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system and K⁺ channel openers. *Pharmacol Ther* 2000 Enero: 85 (1):39-53.
- Gray MA, Argent BE (1990) Non-selective cation channel on pancreatic duct cells. *Biochim Biophys Acta* 1029: 33-42.
- 35 Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100.
- Harvey J, Hardy SC, Ashford ML (1999) Dual actions of the metabolic inhibitor, sodium azide on K(ATP) channel currents in the rat CRI-G1 insulinoma cell line. *Br J Pharmacol* 126: 51-60.
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67-113.
- 40 Horn R, Marty A (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 92:145-159.
- Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S (1996) A family of sulfonilurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* 16:1011-1017.
- 45 Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y (1996) A novel sulfonilurea receptor forms with BIT (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *J Biol Chem* 271: 24321-24324.
- Johnson ME, Gores GJ, Uhl CB, Sill JC (1994) Cytosolic free calcium and cell death during metabolic inhibition in a neuronal cell line. *J Neurosci* 14: 4040-4049.
- 50 Jurkowitz-Alexander MS, Altschuld RA, Haun SE, Stephens RE, Horrocks LA (1993) Protection of ROC-1 hybrid glial cells by polyethylene glycol following ATP depletion. *J Neurochem* 61:1581-1584.
- Jurkowitz-Alexander MS, Altschuld RA, Hohl CM, Johnson JD, McDonald JS, Simmons TD, Horrocks LA (1992) Cell swelling, blebbing, and death are dependent on ATP depletion and independent of calcium during chemical hypoxia in a glial cell line (ROC-1). *J Neurochem* 59: 344-352.
- Juurlink BH, Chen Y, Hertz L (1992) *Can J Physiol Pharmacol* 70 Supl: S344-S349.
- 55 Kempfski O, von Rosen S, Weigt H, Staub F, Peters J, Baethmann A (1991). *Ann NY Acad Sci* 633: 306-317.
- Kim D, Fu C (1993) Activation of a nonselective cation channel by swelling in atrial cells. *J Membr Biol* 135: 27-37.
- Kimelberg HK, Rutledge E, Goderie S, Charniga C (1995) Astrocytic swelling due to hypotonic or high K⁺ medium causes inhibition of glutamate and aspartate uptake and increases their release. *J Cereb Blood Flow Metab* 15: 409-416.
- 60 Kimelberg HK, Rose JW, Barron KD, Waniewski RA, Cragoe EJ. (1989) Astrocytic swelling in traumatic-hypoxic brain injury. Beneficial effects of an inhibitor of anion exchange transport and glutamate uptake in glial cells. *Mol Chem Neuropathol* 11(1): 1-31.
- Korbmacher C, Volk T, Segal AS, Boulpaep EL, Fromter E (1995) A calcium-activated and nucleotide-sensitive nonselective cation channel in M-1 mouse cortical collecting duct cells. *J Membr Biol* 146: 29-45.

- Korn SJ, Marty A, Conner JA, Horn R (1991) Perforated patch recording. In: *Methods in Neuroscience. Electrophysiology and Microinjection.* (Conn PM, ed), págs. 364-373. San Diego: Academic Press.
- Lawson K (2000) Potassium channel openers as potential therapeutic weapons in ion channel disease. *Kidney Int* 2000 Mar; 57 (3): 838-845.
- 5 Lebovitz HE (1985) Oral hypoglycaemic agents. Amsterdam: Elsevier.
- Liu Y, Liu D, Printzenhoff D, Coghlan MJ, Harris R, Kraffe DS (2002) Tenidap, a novel anti-inflammatory agent, is an opener of the inwardly rectifying K⁺ channel hKir2.3. *Eur. J. Pharmacol.* 435: 153-160.
- Lomneth R, Gruenstein EI (1989) Energy-dependent cell volume maintenance in UC-11MG human astrocytomas. *Am J Physiol* 257: C817-C824.
- 10 Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3-15.
- Maruyama Y, Petersen OH (1984) Single calcium-dependent cation channels in mouse pancreatic acinar cells. *J Membr Biol* 81: 83-87.
- Mongin AA, Cai Z, Kimelberg HK (1999) Volume-dependent taurine release from cultured astrocytes requires permissive [Ca²⁺]_i and calmodulin. *Am J Physiol* 277: C823-C832.
- 15 Nichols CG, Shyng SL, Nestorowicz A, Glaser B, Clement JP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Permutt MA, Bryan J (1996) Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* 272: 1785-1787.
- Ono S, Mougouris T, DuBose TD, Jr., Sansom SC (1994) ATP and calcium modulation of nonselective cation channels in IMCD cells. *Am J Physiol* 267: F558-F565.
- Panten U, Burgfeld J, Goerke F, Rennie M, Schwanstecher M, Wallasch A, Zunkler BJ, Lenzen S (1989) Control of insulin secretion by sulfonilureas, meglitinide and diazoxide in relation to their binding to the sulfonilurea receptor in pancreatic islets. *Biochem Pharmacol* 38: 1217-1229.
- Perillan PR, Chen M, Potts EA, Simard JM (2002) Transforming growth factor- β 1 regulates Kir2.3 inward rectifier K⁺ channel via phospholipase C and protein kinase C- δ in reactive astrocytes from adult rat brain. *J. Biol. Chem.* 277: 1974-1980.
- 25 Perillan PR, Li X, Potts EA, Chen M, Bredt DS, Simard JM (2000) Inward rectifier K⁺ channel Kir2.3 (IRK3) in reactive astrocytes from adult rat brain. *Glia* 31: 181-192.
- Perillan PR, Li X, Simard JM (1999) K⁺ inward rectifier currents in reactive astrocytes from adult rat brain. *Glia* 27/213-225.
- Popp R, Gogelein H (1992) A calcium and ATP sensitive nonselective cation channel in the antiluminal membrane of rat cerebral capillary endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1108: 59-66.
- 30 Rae JL, Dewey J, Cooper K, Gates P (1990) A non-selective cation channel in rabbit corneal endothelium activated by internal calcium and inhibited by internal ATP. *Exp Eye Res* 50: 373-384.
- Ransom CB, Sontheimer H (1995) Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K⁺ currents in rat spinal cord astrocytes. *J Neurophysiol* 73: 333-346.
- 35 Renkin EM (1955) Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes. *J Gen Physiol* 38: 225-243.
- Robinson RA, Stokes RH (1970) *Electrolyte Solutions.* London: Butterworths.
- Rose CR, Waxman SG, Ransom BR (1998) Effects of glucose deprivation, chemical hypoxia, and simulated ischemia on Na⁺ homeostasis in rat spinal cord astrocytes. *J Neurosci* 18: 3554- 3562.
- 40 Rucker-Martin C, Henaff M, Hatem SN, Delpy E, Mercadier JJ (1999) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis of adult rat ventricular myocytes in vitro. *Basic Res Cardiol* 94: 171-179.
- Rutledge EM, Kimelberg HK (1996) Release of [3H]-D-aspartate from primary astrocyte cultures in response to raised external potassium. *J Neurosci* 16: 7803-7811.
- Schroder W, Hager G, Kouprijanova E, Weber M, Schmitt AB, Seifert G, Steinhauser C (1999) Lesion-induced changes of electrophysiological properties in astrocytes of the rat dentate gyrus. *Glia* 28: 166-174.
- 45 Shyng S, Ferrigni T, Nichols CG (1997) Control of rectification and gating of cloned KATP channels by the Kir6.2 subunit. *J Gen Physiol* 110: 141-153.
- Sigworth FJ, Sine SM (1987) Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms. *Biophys J* 52: 1047-1054.
- 50 Staub F, Peters J, Kempfski O, Schneider GH, Schurer L, Baethmann A (1993) Swelling of glial cells in lactic acidosis and by glutamate: significance of Cl⁻ transport. *Brain Res* 610: 69-74.
- Sturgess NC, Hales CN, Ashford ML (1987) Calcium and ATP regulate the activity of a non-selective cation channel in a rat insulinoma cell line. *Pflugers Arch* 409:607-615.
- Swanson RA (1992) Astrocyte glutamate uptake during chemical hypoxia in vitro. *Neurosci Lett* 147: 143-146.
- 55 Tanaka S, Uehara T, Nomura Y (2000) Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. *J Biol Chem* 275: 10388-10393.
- Ubl J, Murer H, Kolb HA (1988) Ion channels activated by osmotic and mechanical stress in membranes of opossum kidney cells. *J Membr Biol* 104: 223-232.
- Walz W, Gimpl G, Ohlemeyer C, Kettenmann H (1994) Extracellular ATP-induced currents in astrocytes: involvement of a cation channel. *J Neurosci Res* 38: 12-18.
- 60 Yu AC, Wong HK, Yung HW, Lau LT (2001) Ischemia-induced apoptosis in primary cultures of astrocytes. *Glia* 35: 121-130.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un antagonista de SUR1 que bloquea el canal de NC_{Ca-ATP} para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de la inflamación de las células neurales en el cerebro de un ser humano que da como resultante de una lesión traumática en el cerebro o de isquemia cerebral, en cuyo método el antagonista de SUR1 se administra después de la lesión traumática del cerebro o la isquemia cerebral.
- 10 **2.** Un antagonista de SUR1 que bloquea el canal de NC_{Ca-ATP} para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho antagonista de SUR1 se administra intravenosamente.
- 10 **3.** Un antagonista de SUR1 que bloquea el canal de NC_{Ca-ATP} para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho antagonista de SUR1 se administra subcutáneamente, intramuscularmente, intracutáneamente, intragástricamente, oralmente o en el cerebro.
- 15 **4.** Un antagonista de SUR1 que bloquea el canal de NC_{Ca-ATP} para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho antagonista de SUR1 es un compuesto de sulfonilurea.
- 20 **5.** Un antagonista de SUR1 que bloquea el canal de NC_{Ca-ATP} para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho antagonista de SUR1 se selecciona entre repaglinida, nateglinida, meglitinida, LY397364, LY389382, gliclazida, glimepirida, glibenclamida, tolbutamida y combinaciones de los mismos.
- 25 **6.** Un antagonista de SUR1 que bloquea el canal de NC_{Ca-ATP} para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ser humano tiene una hemorragia en el cerebro.
- 25 **7.** Un antagonista de SUR1 que bloquea el canal de NC_{Ca-ATP} para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se administra en forma de una composición farmacéutica que contiene como portador farmacéuticamente aceptable un azúcar seleccionado entre lactosa, glucosa y sacarosa.

30

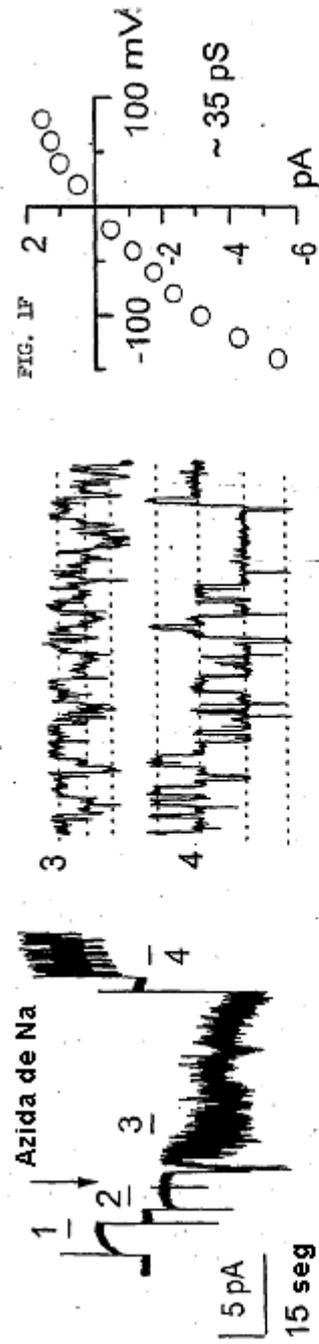
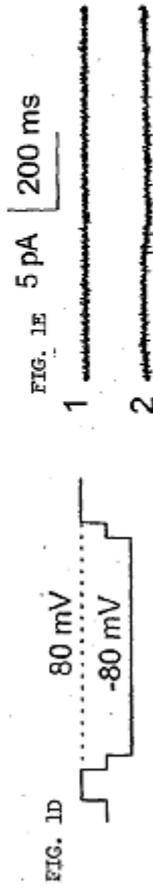
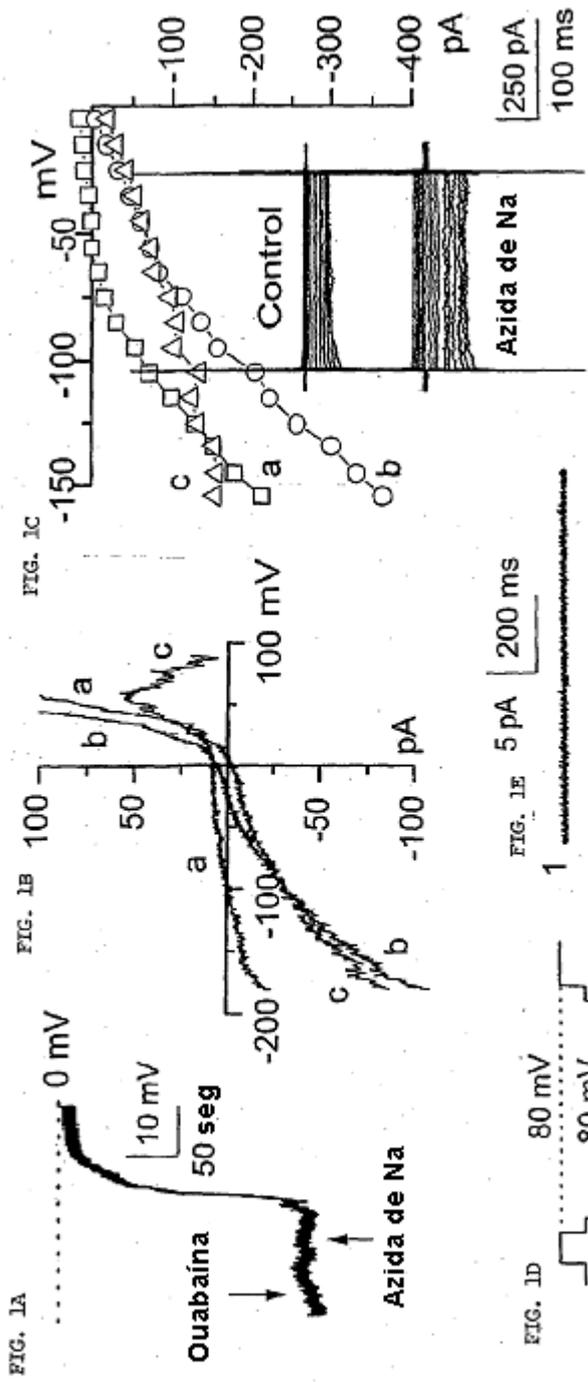


FIG. 2A

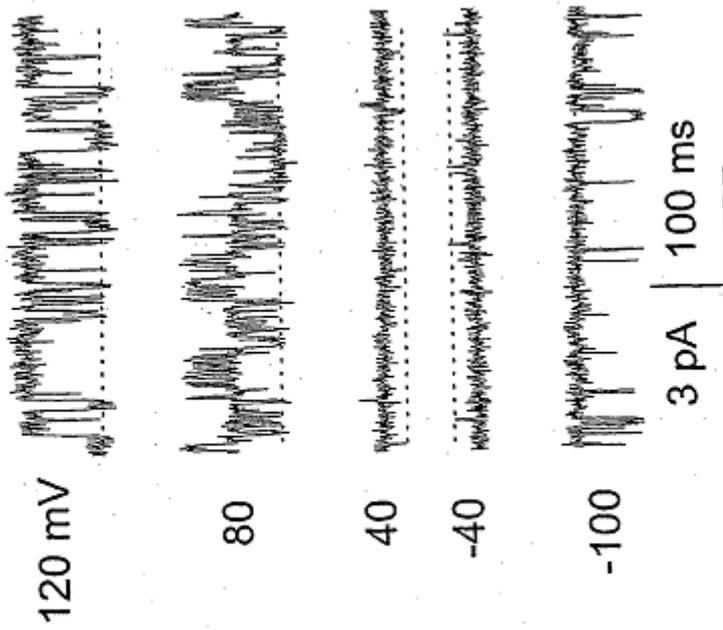


FIG. 2B

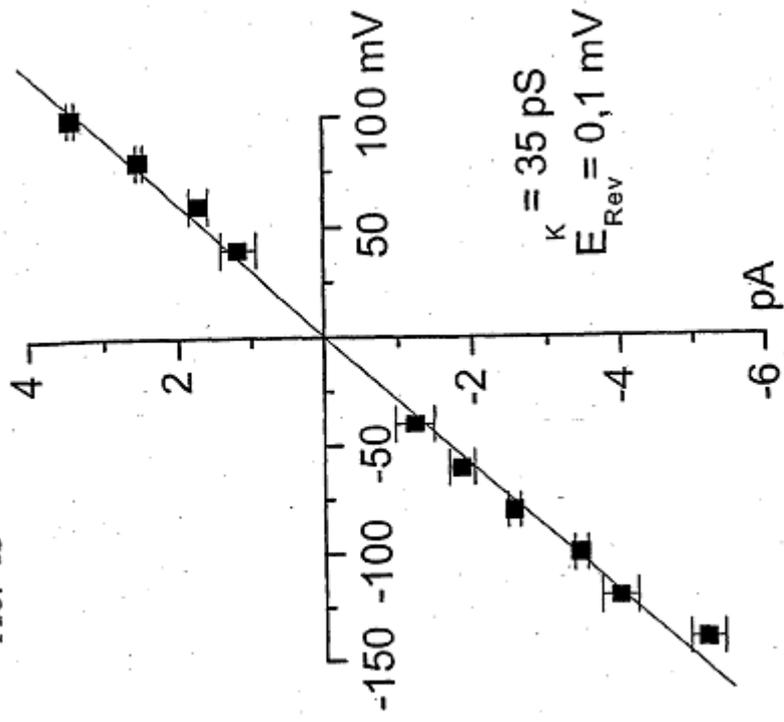


FIG. 3A

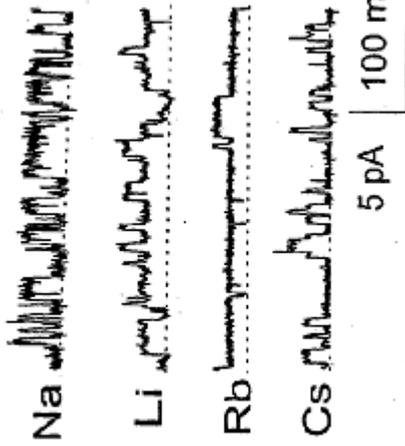


FIG. 3B

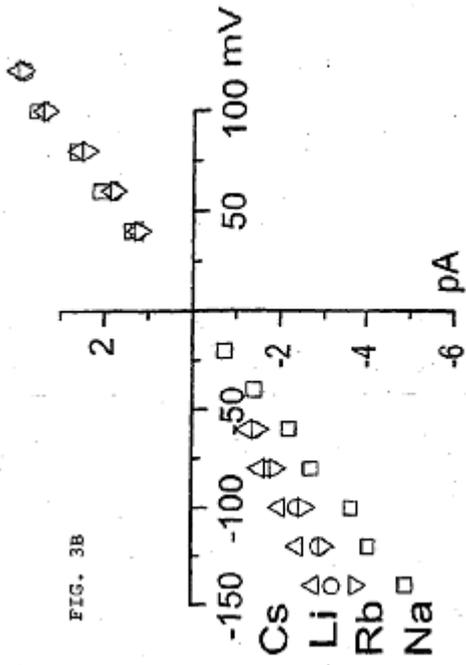


FIG. 3C

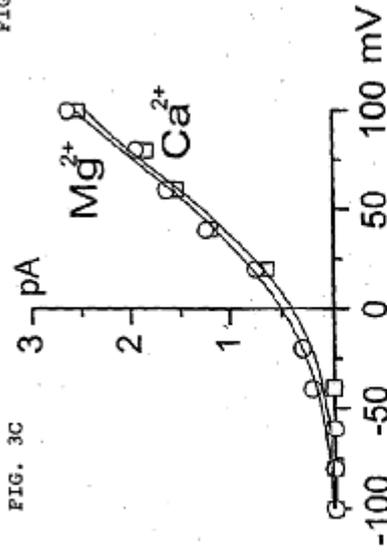


FIG. 3D

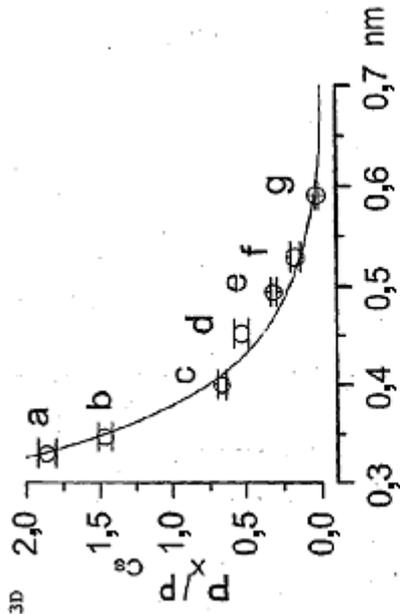


FIG. 4A

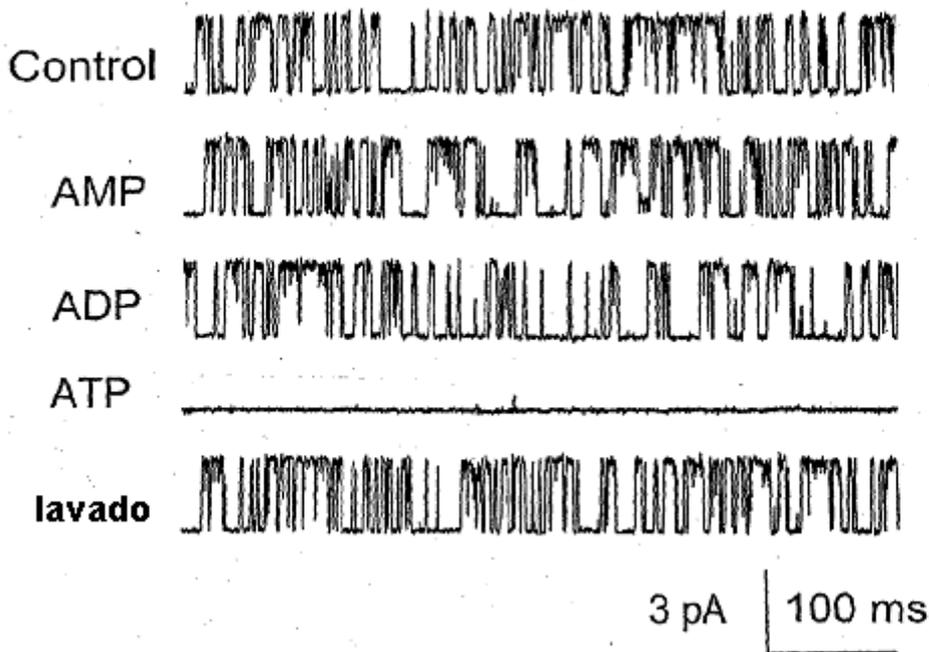
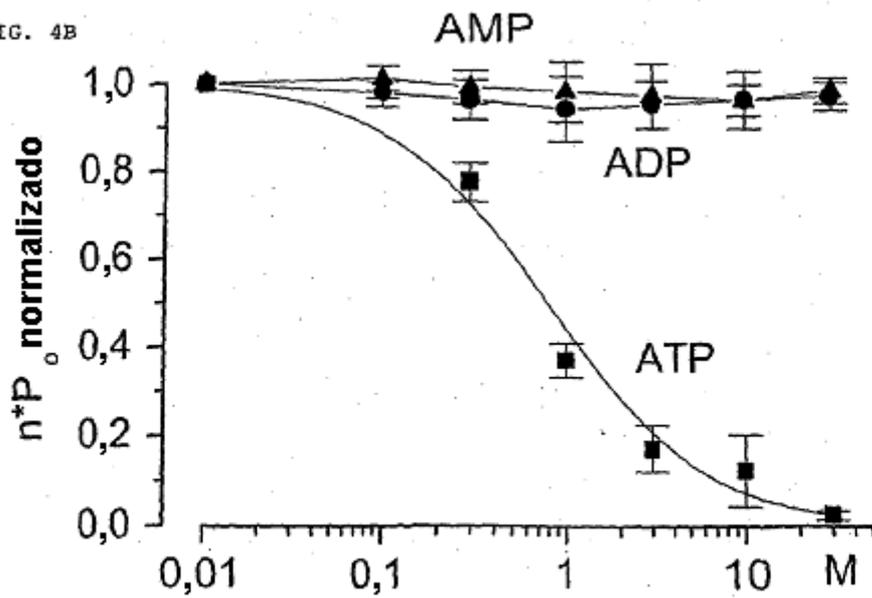


FIG. 4B



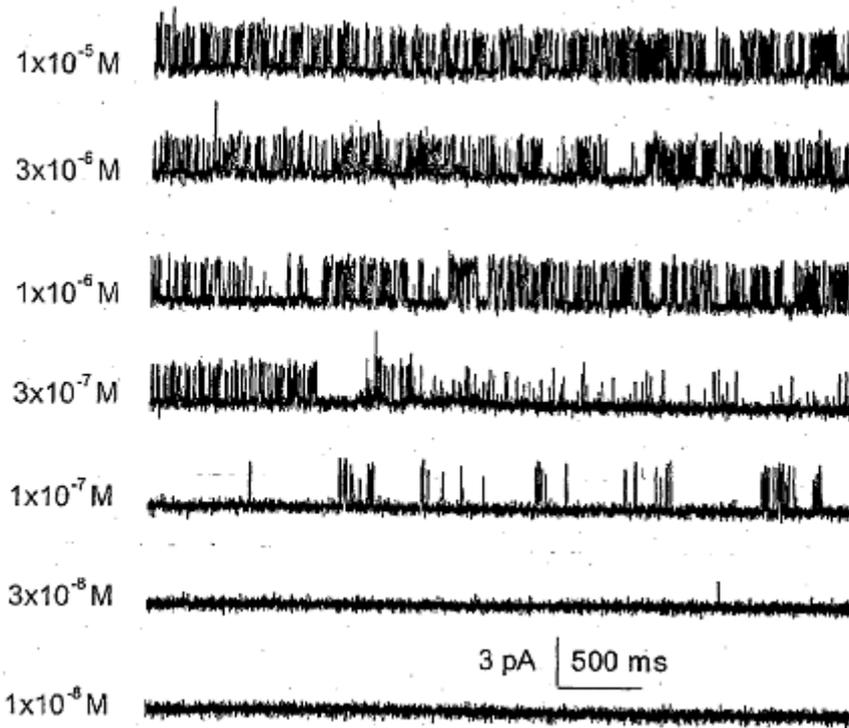
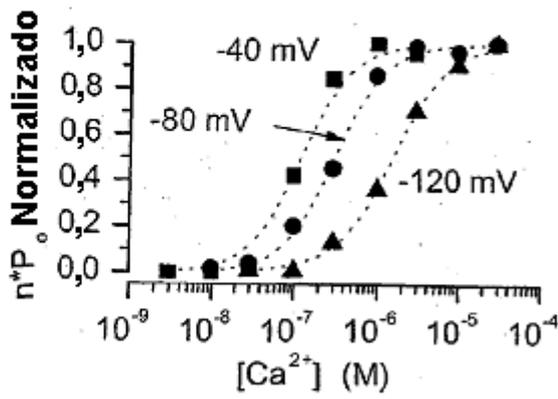


FIG. 5A

FIG. 5B



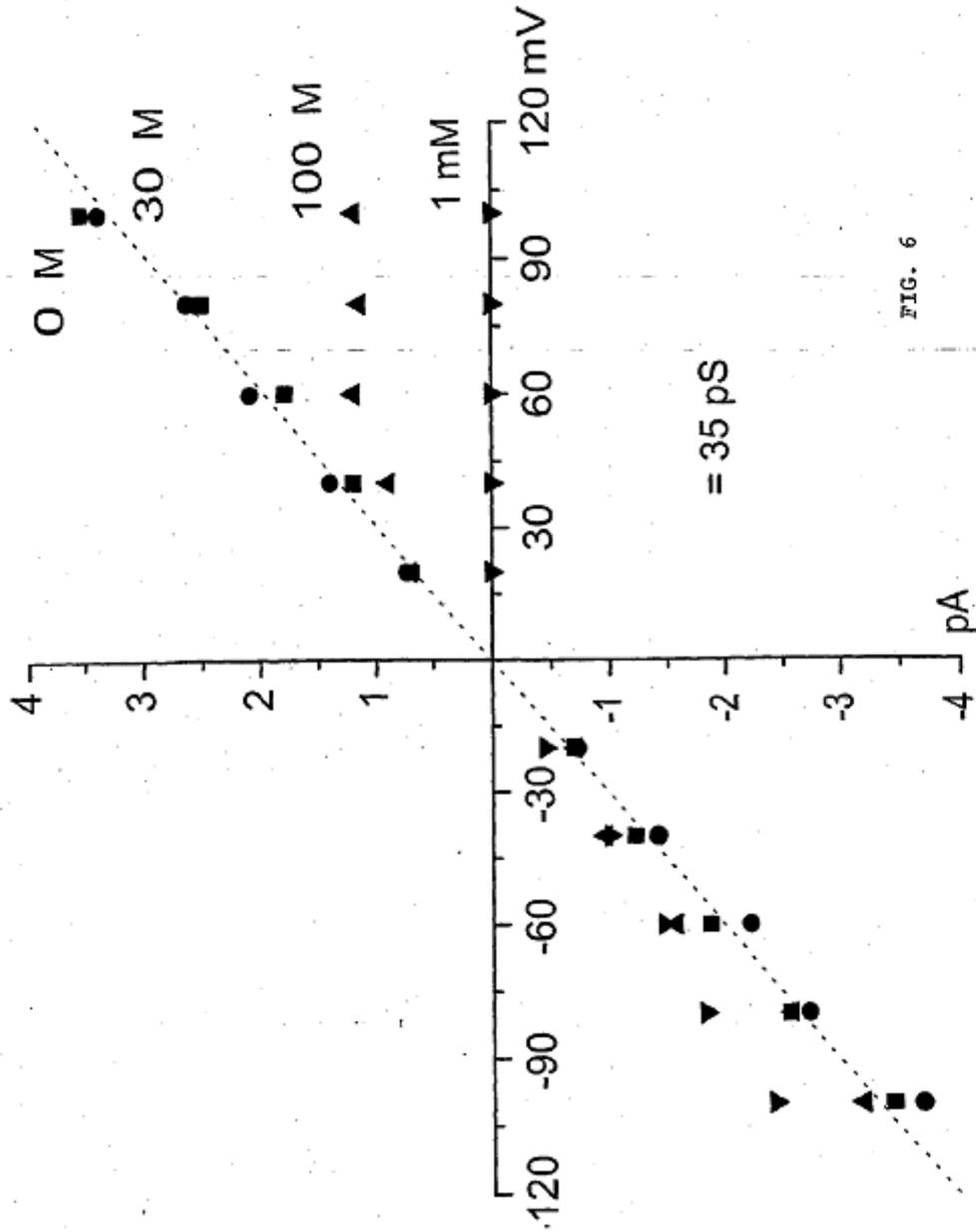


FIG. 7A



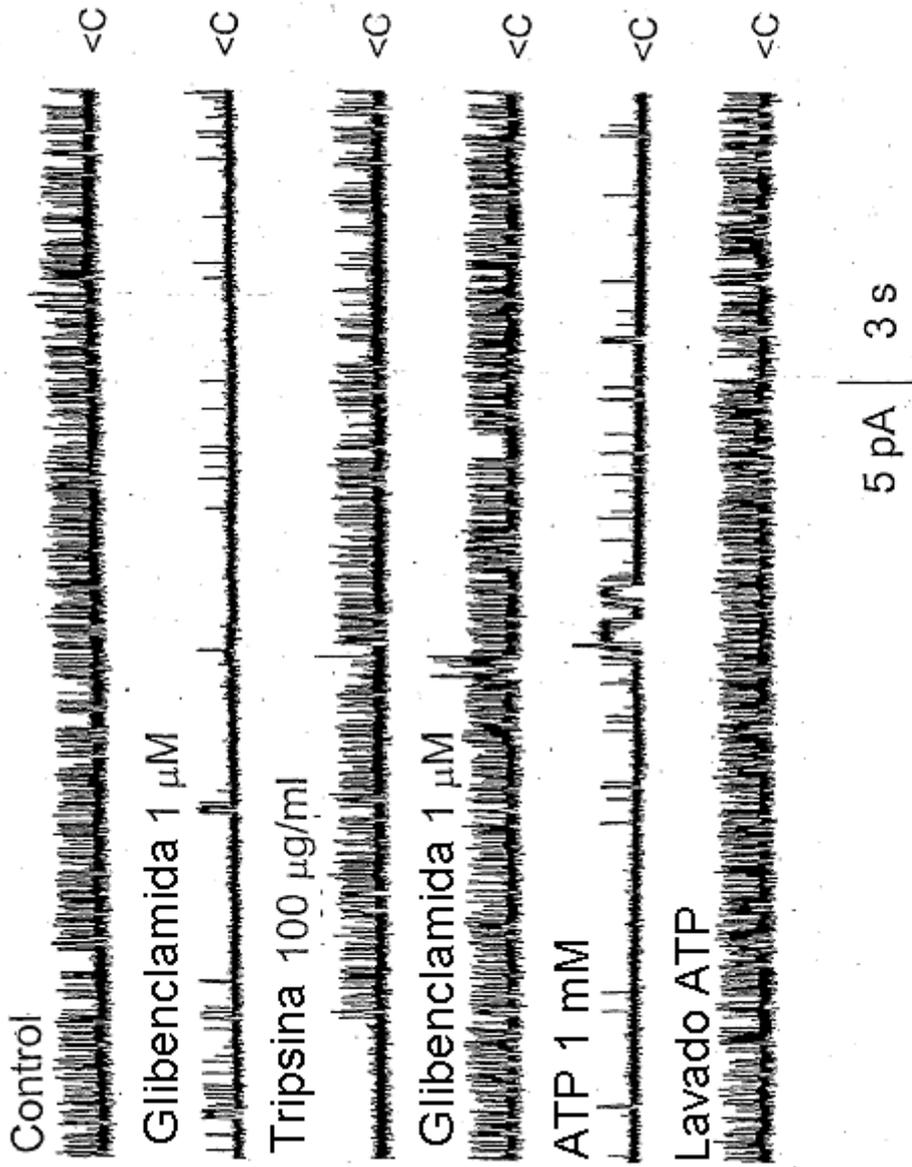
1 2 3 4 5 6

FIG. 7B



1 2 3 4 5 6

FIG. 8



Uso de compuestos de sulfonilurea como tratamiento para la inflamación del cerebro

FIG. 9A

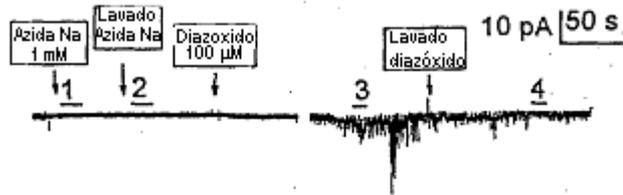
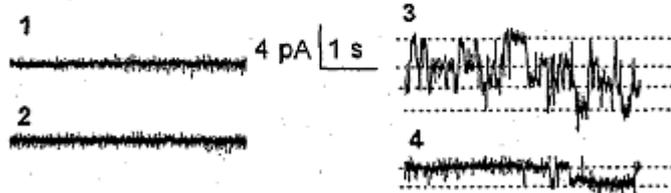


FIG. 9B



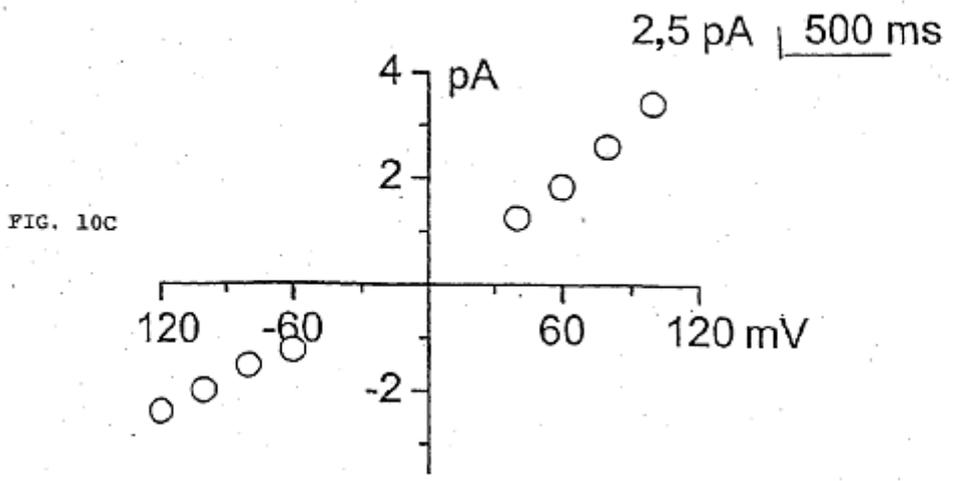
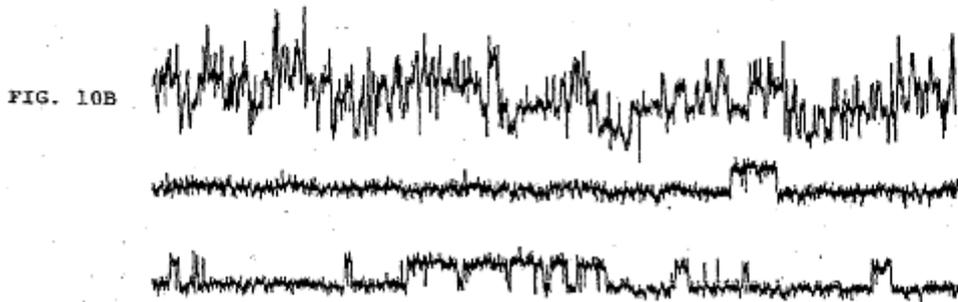
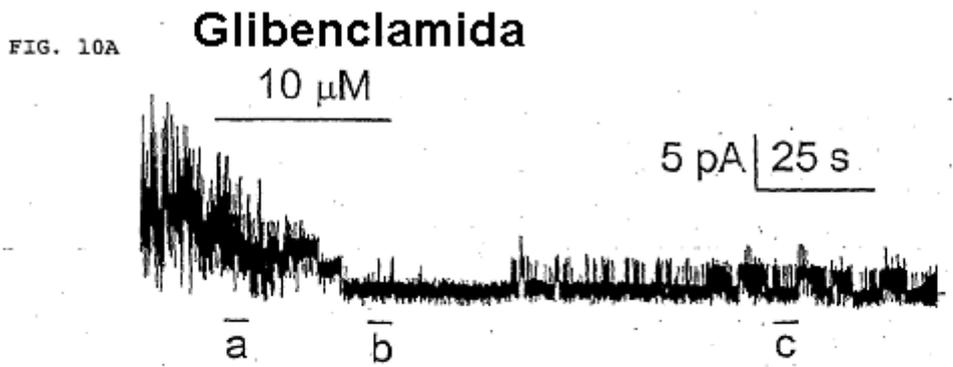


FIG. 11A

[Tolbutamida]

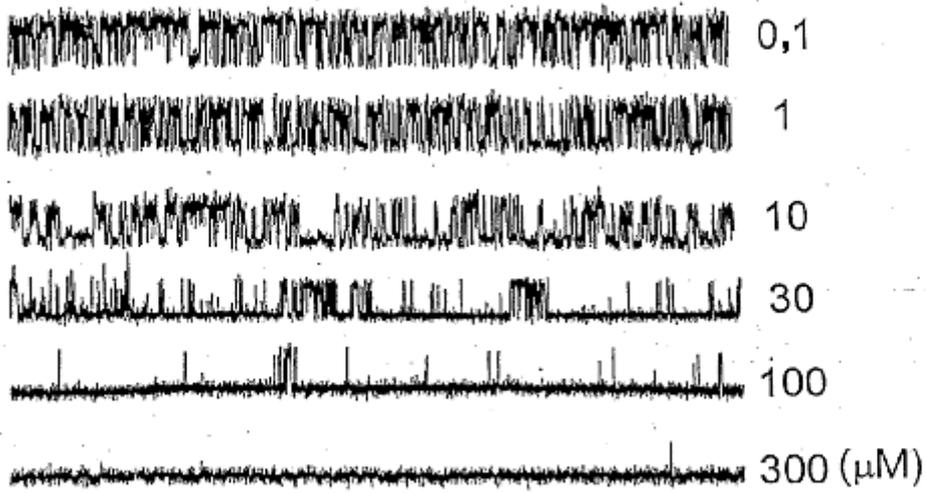
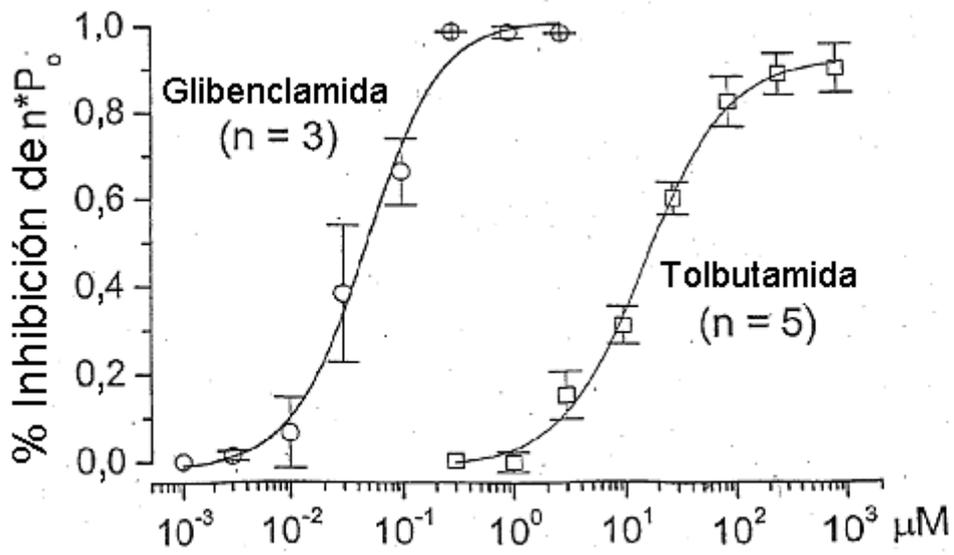


FIG. 11B

3 pA | 500 ms



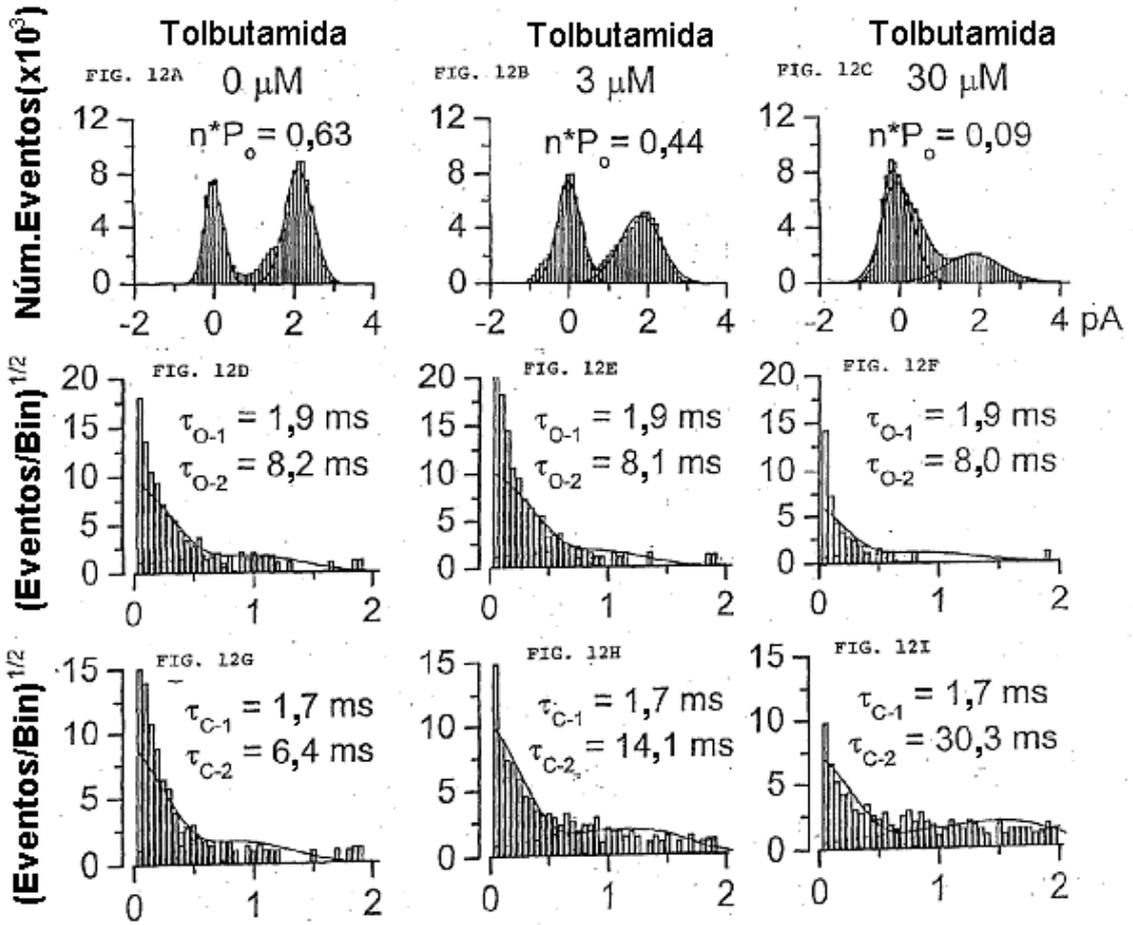


FIG. 13A



FIG. 13B

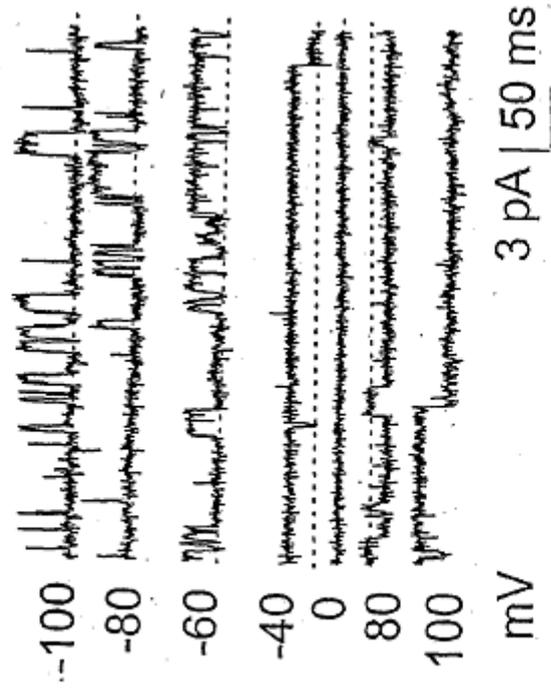
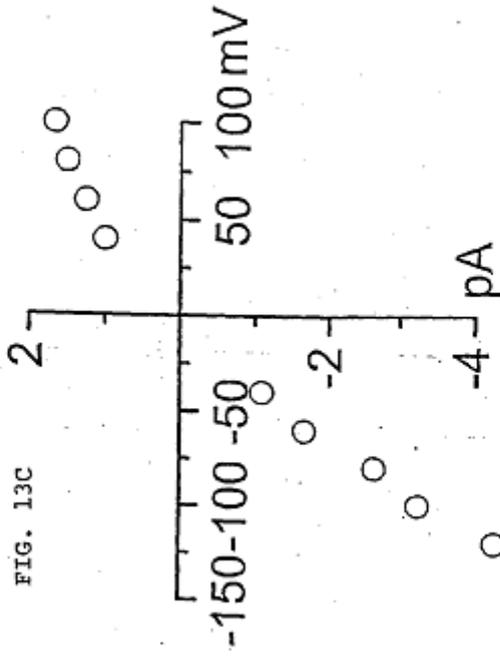


FIG. 13C



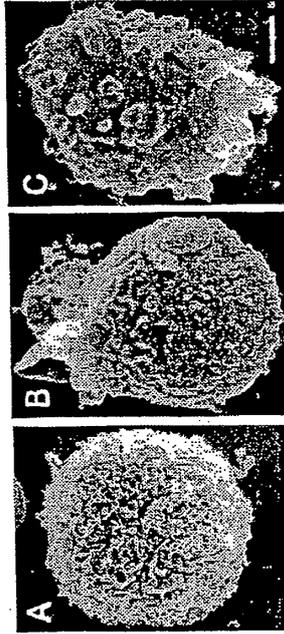


FIG. 14C

FIG. 14B

FIG. 14A

FIG. 15A

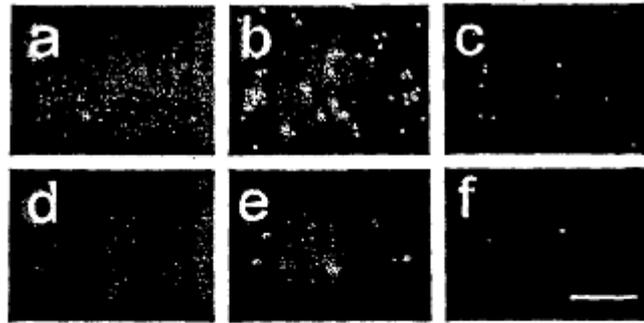


FIG. 15B

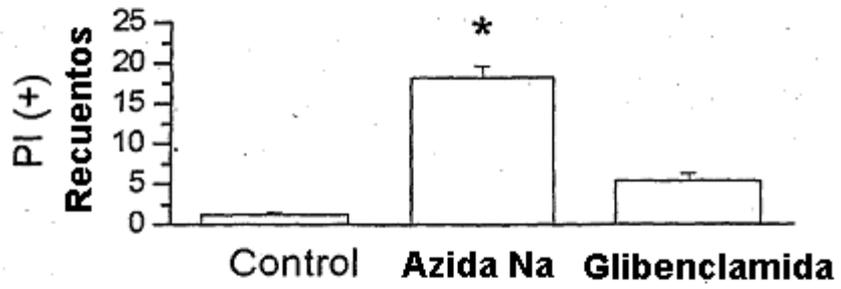


FIG. 15C

