

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 115**

51 Int. Cl.:

A61K 38/52 (2006.01)
A61K 38/51 (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2003 E 03766600 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 1524989**

54 Título: **Método y composición para proteger el tejido neuronal de lesiones inducidas por niveles de glutamato elevados**

30 Prioridad:

01.08.2002 US 399708 P
04.12.2002 US 430689 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2014

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

TEICHBERG, VIVIAN I.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 449 115 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

Método y composición para proteger el tejido neuronal de lesiones inducidas por niveles de glutamato elevados

5 La presente invención se refiere a la glutamato piruvato transaminasa (GPT) y al piruvato para su uso en el tratamiento de una dolencia médica de acuerdo con la reivindicación 1, a la glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT) para su uso en el tratamiento de una dolencia médica de acuerdo con la reivindicación 2, un artículo de fabricación de acuerdo con la reivindicación 4.

10 La presente divulgación se refiere a un método y composición para proteger el sistema nervioso central (SNC) de lesiones inducidas por niveles de glutamato anómalos, que pueden resultar de, por ejemplo, un ictus.

El sistema nervioso central se compone de miles de millones de células nerviosas (neuronas) que forman redes capaces de llevar a cabo funciones extraordinariamente complejas.

15 El aminoácido ácido L-glutámico (glutamato) media en muchas de las transacciones de excitación entre neuronas en el sistema nervioso central. En condiciones normales, la acumulación de glutamato en el espacio celular se evita mediante la operación de un mecanismo de recirculación que sirve para mantener los niveles neuronales de glutamato a pesar de la pérdida continua debida a la liberación de transmisores (Van der Berg y Garfinkel, 1971; Kennedy y col., 1974). El glutamato, liberado por las neuronas glutamatérgicas, se captura por las células gliales donde se convierte en glutamina mediante la enzima glutamino sintetasa. La glutamina vuelve a entrar en las neuronas y se hidroliza mediante la glutaminasa para formar glutamato, recuperando de esta forma el nivel de neurotransmisor.

25 Esta ruta bioquímica sirve también como mecanismo neuroprotector endógeno, que actúa al eliminar el glutamato liberado sinápticamente del espacio extracelular y convirtiéndolo en el aminoácido no tóxico glutamina antes de que aparezca toxicidad. El potencial excitotóxico del glutamato (es decir, definido como la capacidad del glutamato en exceso para sobreexcitar neuronas y ocasionar su muerte) se mantiene controlado siempre que el proceso de transporte funcione correctamente. Sin embargo, el fallo o la reducción en el proceso de transporte, como el que acontece en dolencias isquémicas, da como resultado la acumulación de glutamato en el fluido sináptico extracelular y una excesiva estimulación de los receptores de excitación, una situación que lleva a la muerte neuronal.

30 Dos factores adicionales complican y empeoran las cosas: (i) las neuronas sobreestimuladas comienzan a liberar cantidades excesivas de glutamato en las uniones sinápticas adicionales; esto hace que más neuronas queden sobreestimuladas, llevándolas a una cascada neurotóxica que va más allá de la zona inicial de isquemia; y, (ii) las neuronas sobreestimuladas comienzan a utilizar todo el suministro disponible de glucosa u oxígeno incluso más rápido de lo normal, lo que conduce a un agotamiento acelerado de estos recursos energéticos limitados y a un desequilibrio adicional del proceso de transporte de glutamato. Esta cascada biológica de inducción y progresión puede continuar durante horas o días y produce la muerte neuronal retardada.

40 Los niveles anormalmente elevados de glutamato (Glutamato) en el fluido intersticial del cerebro y en el fluido cerebroespinal son los hitos de varias dolencias neurodegenerativas. Entre estas se incluyen anoxia/isquemia cerebral aguda, es decir, ictus (Graham y col., 1993; Castillo y col., 1996), lesión cerebral perinatal (Hagberg y col., 1993; Johnston, 1997), lesión cerebral traumática (Baker y col., 1993; Zauner y col., 1996), meningitis bacteriana (Spranger y col., 1996), hemorragia subaracnoidea, cirugía a corazón abierto y de aneurisma (Persson y col., 1996; Saveland y col., 1996), choque hemorrágico (Mongan y col. 1999, 2001), epilepsia recientemente diagnosticada (Kalviainen y col., 1993), insuficiencia hepática aguda (Rose y col. 2000), migraña [Martinez F, Castillo J, Rodriguez JR, Leira R, Noya M, Cephalalgia. 1993 Abr;13(2):89-93], estrés [Abraham I, Juhasz G, Kekesi KA, Kovacs KJ, Stress. 1998 Jul;2(3):171-81 y De Cristobal J, Madrigal JL, Lizasoain I, Lorenzo P, Leza JC, Moro MA, Neuroreport. 2002 Feb 11; 13(2):217-21] y diferentes enfermedades neurodegenerativas crónicas tales como glaucoma (Dreyer y col., 1996), esclerosis lateral amiotrófica (Rothstein y col., 1990; Shaw y col., 1995), demencia producida por VIH (Ferrarese y col. 2001) y enfermedad de Alzheimer (Pomara y col., 1992). MATTHEWS CHRISTOPHER C y col notifican que la degradación enzimática protege a las neuronas de la excitotoxicidad debida al glutamato, JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 75, nº 3, septiembre de 2000, páginas 1045-1052.

55 Jiang y col, Society for Neuroscience Abstracts vol. 26, N 1-2, 2000, páginas del resumen N°136,17 divulgan que glutamato es un mediador principal en la neurotoxicidad de macrófagos humanos inmunocompetentes infectados por VIH.

60 DI Giorgio, R.M. y col, Italian journal of biochemistry, vol.34, nº 1, 1985, páginas 19-28 se refieren a los sistemas gabaérgicos en regiones cerebrales de ratas con lesión debida a glutamato.

Engelhardt, P. Avenarius H.J., Medizinische Klinik, Munich, vol.71, nº 17, 1976, páginas 699-702 se refiere al valor diagnóstico de la determinación de enzimas en el líquido cerebroespinal.

65

El documento WO 99/21565 se refiere a un suplemento nutricional para las insuficiencias metabólicas del cerebro.

De este modo, un objeto del tratamiento médico es romper o eliminar el proceso de cascada anteriormente descrito y evitar de este modo la lesión neuronal asociada al glutamato.

5 Puesto que la excitotoxicidad debida al glutamato está mediada por los receptores del glutamato, se ha desarrollado una potencial hipótesis terapéutica que aplica varios antagonistas selectivos del receptor del glutamato en modelos animales de neurodegeneración. Mediante la presentación de potentes efectos neuroprotectores en ictus y traumatismos de cabeza experimentales, los antagonistas del receptor del glutamato fracasaron en ensayos clínicos
10 principalmente debido a sus efectos adversos o incluso letales (Birmingham, 2002; Lutsep y Clark, 2001; Palmer, 2001).

15 Se han realizado intentos también de aumentar la actividad de los diferentes transportadores de glutamato, presentes en la glía y en las neuronas, que capturan el glutamato del líquido intersticial cerebral y limitan de esta forma la acción de excitación y la excitotoxicidad debidas al glutamato. Sin embargo, ninguna de las hipótesis anteriormente descritas ha tenido éxito en proporcionar una solución terapéutica viable para disminuir los niveles de glutamato.

20 A la luz de estos fracasos y la necesidad de soluciones alternativas para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos que implican excitotoxicidad debida al glutamato, el presente inventor ha teorizado que el exceso de glutamato en el líquido intersticial cerebral (LIC) y en el líquido cerebroespinal (LCS) se podría eliminar aumentando el mecanismo de salida del glutamato desde el cerebro hacia la sangre, relativamente poco estudiado. El aumento de la salida se puede conseguir disminuyendo los niveles de glutamato en sangre aumentando de esta forma el transporte del glutamato desde el LIC/LCS del cerebro hasta la sangre.

25 Al llevar a la práctica la presente invención, el presente inventor ha descubierto que activando al máximo dos enzimas, la glutamato-piruvato transaminasa (GPT) y la glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT), aumenta la degradación de glutamato en la sangre. Estas dos enzimas son dos ejemplos de un grupo más amplio de enzimas que utilizan glutamato como sustrato en la fórmula general:

30 $A + \text{GLUTAMATO} \xleftarrow{(\text{enzima})} C + D$ donde A representa el cosustrato, $\xleftarrow{(\text{enzima})}$ simboliza una enzima y C y D son metabolitos de la enzima. Los ejemplos ilustrados por la fórmula incluyen: glutamato + oxaloacetato $\xleftarrow{(\text{GOT})} 2\text{-cetoglutarato} + \text{aspartato}$, glutamato + piruvato $\xleftarrow{(\text{GPT})} 2\text{-ceto-glutarato} + \text{alanina}$ o Glutamato + 4-metil-2-oxopentanoato $\xleftarrow{(\text{transaminasa de aminoácido ramificado})} 2\text{-cetoglutarato} + \text{Valina}$.

35 Los ejemplos de los diferentes sustratos que actúan con la misma enzima incluyen:

40 Glutamato + ácido 2-oxohexanodioico $\xleftarrow{(\text{GOT})} 2\text{-cetoglutarato} + \text{ácido 2-aminohexanedioico}$. Glutamato + ácido 2-oxo-3-fenilpropiónico $\xleftarrow{(\text{GOT})} 2\text{-ceto-glutarato} + \text{fenilalanina}$. Glutamato + ácido 3-hidroxi-2-oxopropiónico $\xleftarrow{(\text{GOT})} 2\text{-ceto-glutarato} + \text{serina}$. Glutamato + 5-oxopentanoato $\xleftarrow{(\text{GPT})} 2\text{-ceto-glutarato} + 5\text{-aminopentanoato}$. Glutamato + 4-oxobutanoato $\xleftarrow{(\text{GPT})} 2\text{-ceto-glutarato} + 4\text{-aminobutanoato}$. Glutamato + glioxolato $\xleftarrow{(\text{GPT})} 2\text{-ceto-glutarato} + \text{glicina}$.

45 Otro rasgo común que comparten estas enzimas es que utilizan fosfato de piridoxal como cofactor.

50 Como se ha indicado, estas enzimas convierten de manera reversible el glutamato en 2-ceto glutarato. Esto hace que los niveles de glutamato en sangre disminuyan por debajo de los niveles de base creando de esta forma un gradiente mucho más pronunciado en los niveles de glutamato entre el LIC del cerebro y el LCS de la sangre del que existe habitualmente. Para alcanzar un nuevo equilibrio, el glutamato se transporta desde el cerebro a la sangre disminuyendo de esta forma los niveles elevados de glutamato en el cerebro. Mientras que los niveles de glutamato en la sangre sean bajos continuará esta salida desde el cerebro hasta la sangre. Para mantener GOT y GPT funcionando a sus máximos niveles para la conversión de glutamato en 2-cetoglutarato (V_{max}) sus respectivos sustratos, oxaloacetato y piruvato deben administrarse a dosis al menos dobles a sus valores km normales.

55 Como se ha indicado anteriormente, tanto la glutamato-oxaloacetato transaminasa y la glutamato-piruvato transaminasa metabolizan glutamato, utilizando oxaloacetato y piruvato como sus cosustratos respectivos. Existen, sin embargo, otras muchas transaminasas en el cuerpo que pueden metabolizar el glutamato tal como la glutamato aminoácido ramificado transaminasa, aminotransferasas GABA y muchas otras. Para cada enzima de acuerdo con su reacción, se deberá utilizar un sustrato específico tal como succinato semialdehído para 4-aminobutirato transaminasa.
60

Inversamente, aunque piruvato y oxaloacetato son posiblemente los mejores sustratos de las glutamato transaminasas, se pueden utilizar otros sustratos tales como ácido 2-oxohexanedioico, 2-oxo-3-sulfopropionato, ácido 2-oxo-3-sulfopropiónico, ácido 2-oxo-3-fenilpropiónico o ácido 3-indole-2-oxopropiónico en lugar de oxaloacetato y 5-oxopentanoato, 6-oxo-hexanoato o glioxolato en lugar de piruvato.
65

La conversión de glutamato a 2-cetoglutarato es reversible. Así, tras la transformación del glutamato mediante una reacción enzimática en 2-cetoglutarato, se produce una acumulación de 2-cetoglutarato que puede hacer que la enzima actúe en la dirección opuesta y convierta 2-cetoglutarato en glutamato. Es por tanto beneficioso descomponer adicionalmente 2-cetoglutarato y de esta forma garantizar el metabolismo continuado del glutamato.

5 Una enzima de este tipo que metaboliza 2-cetoglutarato es la 2-cetoglutarato deshidrogenasa mediante la reacción general $-2\text{-cetoglutarato} + \text{lipoamida} \leftarrow (\text{2-cetoglutarato deshidrogenasa}) \rightarrow \text{S-succinildihidrolipoamida} + \text{CO}_2$.

Así, el presente inventor proporciona una solución novedosa para proteger tejido neuronal de lesiones inducidas por niveles de glutamato elevados.

10 La glutamato piruvato transaminasa (GPT) y el piruvato para su uso en el tratamiento de una patología médica se define en la reivindicación 1 de la presente invención. La glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT) para su uso en el tratamiento de una patología médica se define en la reivindicación 2 de la presente invención, el artículo de fabricación se ha definido en la reivindicación 4 de la presente invención 4 de la presente invención.

15 De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para reducir los niveles extracelulares de glutamato en el cerebro, comprendiendo el método administrar a un sujeto necesitado del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de reducir los niveles de glutamato en sangre reduciendo de esta manera los niveles extracelulares de glutamato en el cerebro.

20 De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación se proporciona una composición farmacéutica para reducir los niveles extracelulares de glutamato en el cerebro, comprendiendo la composición farmacéutica, como principio activo, un agente capaz de reducir niveles de glutamato en sangre y un portador farmacéuticamente aceptable.

25 De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente divulgación se proporciona una composición farmacéutica para reducir los niveles extracelulares de glutamato en el cerebro, comprendiendo la composición farmacéutica, como principio activo, piruvato y oxaloacetato en una concentración adecuada para reducir los niveles de glutamato en sangre glutamato y un portador farmacéuticamente aceptable.

30 De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado y una composición farmacéutica identificada para reducir los niveles extracelulares de glutamato en el cerebro que está contenida dentro del material de envasado, incluyendo la composición farmacéutica, como principio activo, un agente capaz de reducir los niveles de glutamato en sangre y un portador farmacéuticamente aceptable.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación se proporciona un método para reducir los niveles extracelulares de glutamato en el cerebro en su sujeto necesitado del mismo, comprendiendo el método: (a) obtener una muestra de sangre; (b) poner en contacto la muestra de sangre con un agente capaz de reducir los niveles de glutamato de las células presentes en la muestra de sangre para obtener de este modo células sanguíneas con el glutamato agotado; y (c) introducir las células sanguíneas con el glutamato agotado de nuevo en el sujeto, reduciendo de esta manera los niveles extracelulares de glutamato en el cerebro del mismo.

40 De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente divulgación se proporciona una composición farmacéutica para reducir los niveles extracelulares de glutamato en el cerebro, comprendiendo la composición farmacéutica, como principio activo, dietil éster de oxaloacetato capaz de reducir los niveles de glutamato en sangre y un portador farmacéuticamente aceptable.

45 Los principios activos alternativos de la composición farmacéutica incluyen, pero sin limitación, oxaloacetato, piruvato, NAD^+ , NADP^+ , ácido 2-oxohexanodioico, 2-oxo-3-sulfopropionato, ácido 2-oxo-3-sulfino propiónico, ácido 2-oxo-3-fenilpropiónico, ácido 3-indol-2-oxopropiónico, ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-oxopropiónico, ácido 4-metilsulfonil-2-oxobutírico, ácido 3-hidroxi-2-oxopropiónico, 5-oxopentanoato, 6-oxo-hexanoato, glioxalato, 4-oxobutanoato, α -cetoisocaproato, α -cetoisovalerato, α -ceto- β -metilvalerato, semialdehído-(4-oxobutirato) succínico, fosfato de piridoxal, precursores de fosfato de piridoxal y 3-oxoisobutanoato.

55 De acuerdo con rasgos adicionales en realizaciones preferidas de la divulgación descrita a continuación, el agente es al menos una enzima modificadora de glutamato y/o una modificación del mismo (por ejemplo, un éster del mismo).

60 De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la al menos una enzima modificadora de glutamato es una transaminasa.

65 De acuerdo con otros rasgos adicionales más en las realizaciones preferidas descritas, la transaminasa se selecciona del grupo que consiste en glutamato oxaloacetato transaminasa, glutamato piruvato transaminasa, acetilornitina transaminasa, ornitina-oxo-ácido transaminasa, succinildiaminopimelato transaminasa, 4-aminobutirato transaminasa, (s)-3-amino-2-metilpropionato transaminasa, 4-hidroxiglutamato transaminasa, diiodotirosina transaminasa, hormona tiroidea transaminasa, triptófano transaminasa, diamina transaminasa, cisteína

transaminasa, L-lisina 6-transaminasa, histidina transaminasa, 2-aminoadipato transaminasa, glicina transaminasa, aminoácido ramificado transaminasa, 5-aminovalerato transaminasa, dihidroxifenilalanina transaminasa, tirosina transaminasa, fosfoserina transaminasa, taurina transaminasa, aminoácido aromático transaminasa, aminoácido aromático-glioxolato transaminasa, leucina transaminasa, 2-aminohexanoato transaminasa, ornitina(lisina) transaminasa, quinurenina-oxoglutarato transaminasa, D-4-hidroxifenilglicina transaminasa, cisteína-conjugado transaminasa, 2,5-diaminovalerato transaminasa, histidinol-fosfato transaminasa, diaminobutirato-2-oxoglutarato transaminasa, y udp-2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxiglucosa transaminasa.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente es al menos un cofactor de una enzima modificadora de glutamato.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el cofactor se selecciona del grupo constituido por oxaloacetato, piruvato, NAD⁺, NADP⁺, ácido 2-oxohexanedioico, 2-oxo-3-sulfopropionato, ácido 2-oxo-3-sulfopropiónico, ácido 2-oxo-3-fenilpropiónico, ácido 3-indol-2-oxopropiónico, ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-oxopropiónico, ácido 4-metilsulfonil-2-oxobutírico, ácido 3-hidroxi-2-oxopropiónico, 5-oxopentanoato, 6-oxo-hexanoato, glioxalato, 4-oxobutanoato, α -cetoisocaproato, α -cetoisovalerato, α -ceto- β -metilvalerato, semialdehído-(4-oxobutirato) succínico, fosfato de piridoxal, precursores de fosfato de piridoxal y 3-oxoisobutanoato.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente es una enzima convertidora de glutamato modificado que se selecciona incapaz de convertir el glutamato modificado en glutamato y/o una modificación del mismo.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas la enzima convertidora de glutamato modificado es una glutamato modificado oxaloacetato transaminasa (GOT).

Dicha enzima modificada se puede obtener mediante evolución in vitro de, por ejemplo, una secuencia de GOT humana. Por ejemplo, se puede utilizar mutagénesis química o molecular para generar secuencias de GOT mutadas que muestran actividad potenciada para transformar glutamato en α -cetoglutarato y preferiblemente con poco o nada de actividad inversa [las estrategias de evolución enzimática in vitro se han descrito en, por ejemplo, Moore y col., en J Mol Biol. 1997 Sep 26;272(3):336-47, se proporcionan referencias adicionales más adelante en el presente documento].

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente es un cofactor de una enzima convertidora de glutamato modificado que se ha seleccionado incapaz de convertir el glutamato modificado en glutamato.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente se selecciona del grupo constituido por ácido lipoico, precursor de ácido lipoico, fosfato de piridoxal, precursor de fosfato de piridoxal, pirofosfato de tiamina y precursor de pirofosfato de tiamina.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente incluye una enzima modificadora de glutamato y un cofactor de la misma.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente incluye una enzima modificadora de glutamato y una enzima convertidora de glutamato modificado que se ha seleccionado incapaz de convertir el glutamato modificado en glutamato.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente incluye un cofactor de una enzima modificadora de glutamato y una enzima convertidora de glutamato modificado que se ha seleccionado incapaz de convertir el glutamato modificado en glutamato.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente incluye un cofactor de una enzima modificadora de glutamato, una enzima convertidora de glutamato modificado que se ha seleccionado incapaz de convertir el glutamato modificado en glutamato y un cofactor de la misma.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente incluye una enzima modificadora de glutamato, un cofactor de la misma, una enzima convertidora de glutamato modificado que se ha seleccionado incapaz de convertir el glutamato modificado en glutamato y un cofactor de la misma.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente incluye una enzima modificadora de glutamato, un cofactor de la misma, y una enzima convertidora de glutamato modificado que se ha seleccionado incapaz de convertir el glutamato modificado en glutamato.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente incluye una enzima modificadora de glutamato, una enzima convertidora de glutamato modificado que se ha seleccionado incapaz de convertir el glutamato modificado en glutamato y un cofactor de la misma.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente incluye una enzima modificadora de glutamato y un cofactor de una enzima convertidora de glutamato modificado que se ha seleccionado incapaz de convertir el glutamato modificado en glutamato.

5 De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente incluye una enzima convertidora de glutamato modificado que se ha seleccionado incapaz de convertir el glutamato modificado en glutamato y un cofactor de la misma.

10 De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente incluye un cofactor de una enzima modificadora de glutamato y un cofactor de una convertidora de glutamato modificado que se ha seleccionado incapaz de convertir el glutamato modificado en glutamato.

15 De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas la administración se lleva a cabo a una concentración del agente que no supera 1 g/Kg peso corporal/hora.

De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas el agente es al menos un inhibidor de la enzima que sintetiza glutamato.

20 De acuerdo con otros rasgos adicionales en las realizaciones preferidas descritas donde el inhibidor se selecciona del grupo constituido por GABA gamma-Acetilénico, GABAculina, L-canalina, ácido 2-amino-4-(aminoxi)-n-butanoico, 3-cloro-4-aminobutanoato, 3-fenil-4-aminobutanoato, hidrazida del ácido isonicotínico; (S)-3-Amino-2-metilpropanoato, Fenilhidrazina; (4-Fluorofenil)alanina, Adipato, ácido azaleico, Caproato, 3-Metilglutarato, Dimetilglutarato, Dietilglutarato, Pimelato, 2-Oxoglutarato, clorhidrato de 3-Metil-2-benzotiazolona hidrazona, Fenilpiruvato, 4-hidroxifenilpiruvato, Prefenato e indol piruvato.

25 La presente invención resuelve con éxito los inconvenientes de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando métodos y composiciones para proteger el tejido neuronal de lesiones inducidas por niveles de glutamato elevados.

30 Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para llevar a la práctica o ensayar la presente invención, métodos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, prevalece la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Breve descripción de los dibujos

40 La invención se describe en el presente documento solamente por medio de ejemplos, con referencia a los dibujos adjuntos. Haciendo ahora Referencia específicamente a los dibujos en detalle, se indica que los rasgos concretos mostrados son a modo de ejemplo y con el fin de ilustrar la discusión de las realizaciones preferidas de la presente invención solamente, y se presentan con el objetivo de proporcionar lo que se considera la descripción más útil y fácil de comprender de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se intentan mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, la memoria descriptiva tomada junto con los dibujos evidenciarán para el experto en la materia como se pueden llevar a la práctica las diferentes formas de la invención.

En los dibujos:

50 FIG. 1A es una representación gráfica de los niveles de glutamato con el tiempo como una función de diferentes condiciones de incubación *in-vitro*. Los controles no tratados (rombos sólidos) revelan niveles de glutamato bastante constantes. La flecha negra que apunta hacia abajo indica el principio del tratamiento con 2,5 unidades/ml de GPT, dando como resultado un aumento brusco en los niveles de glutamato (círculos blancos). La adición de piruvato 1 mM (indicada por las flechas negras) da como resultado el efecto inverso, una disminución en la concentración de glutamato (cuadrados sólidos). La adición de piruvato 1 mM y 2,5 unidades/ml de GPT (círculos sólidos) en $t=0$ da como resultado una disminución mayor que cuando se administra piruvato solo. La adición de piruvato 1 mM a $t = 0$ y de 2,5 unidades/ml de GPT a $t = 0, 15$ y 30 (cuadrados blancos) da como resultado de una forma similar una disminución pronunciada en la concentración de glutamato, superando la de cualquiera de los administrados individualmente. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C y cada punto representa el promedio de al menos dos determinaciones de glutamato.

60 FIG. 1B es una representación gráfica de los niveles de glutamato en función del tiempo. La sangre se combinó con piruvato 1 mM (Pyr, cuadrados cerrados), oxaloacetato 1 mM (círculos cerrados), o una mezcla de ambos (rombos abiertos), a tiempo 0, 15 y 30 minutos lo que dio como resultado una activación más rápida del GOT presente en la sangre debido al oxaloacetato, dando como resultado una disminución mayor en los niveles de glutamato, que no es paralela a la adición de piruvato. No se apreció sinergia para este efecto.

FIG. 2A es una representación gráfica de los niveles de glutamato en células sanguíneas (símbolos cerrados) y plasma (símbolos abiertos) determinados *in vitro*. Se añadieron 1 mM de piruvato (cuadrados) o 1 mM de oxaloacetato (triángulos) o la combinación de ambos (rombos) a muestras de sangre en los momentos indicados (las flechas ascendentes indican los momentos). A continuación se realizó un seguimiento de los niveles de glutamato en los diferentes compartimentos de la sangre; símbolos cerrados: compartimento de células de la sangre; símbolos abiertos, plasma sanguíneo). Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C y cada punto representa el promedio de al menos dos determinaciones de glutamato.

FIG. 2B es una representación gráfica de la conversión del glutamato en un combinado de células de la sangre (triángulos abiertos) y en plasma (cuadrados cerrados) siguiendo las adiciones repetidas (a t=0, 15, 30, 45 min) a sangre de Piruvato y oxaloacetato (ambos a una concentración final de 1 mM). Cada punto representa el promedio de 8 experimentos \pm error estándar del promedio.

FIG. 3 es una representación gráfica de la conversión del glutamato durante 60 minutos, tras la adición de concentraciones crecientes de una mezcla equimolar de piruvato y oxaloacetato a las muestras de sangre. El análisis de la conversión del glutamato en la combinación celular (rombos sólidos) comparada con el plasma (rombos abiertos) reveló una conversión ligeramente mayor en la primera. Cada punto representa el promedio de al menos dos determinaciones de glutamato.

FIGS. 4A-B son gráficos que representan la extensión de la conversión de glutamato alcanzada después de 60 minutos tras adiciones repetidas de concentraciones crecientes de lipoamida (Figura 4A) y tiaminapirifosfato (Figura 4B) a sangre, en presencia de una mezcla de Pyr 1 mM y oxaloacetato 1 mM. La sangre se separó en fracciones celular (rombos sólidos) y plasma (rombos abiertos) que se analizaron por separado. Cada punto representa el promedio de al menos dos determinaciones de glutamato.

FIGS. 5A-B son gráficos que representan los efectos de tiaminapirifosfato 10 μ M (Figura 5A) y lipoamida 0,5 mM (Figura 5B) sobre los niveles de conversión del glutamato producido por una mezcla de piruvato 1 mM y oxaloacetato 1 mM. La fracción celular se trató de la siguiente forma, los rombos sólidos representan las células tratadas con oxaloacetato y piruvato. Los círculos rellenos representan células que fueron tratadas con oxaloacetato y piruvato con una adición de tiaminapirifosfato 10 μ M (Figura 5A) o lipoamida 0,5 mM (Figura 5B). El plasma tratado con oxaloacetato y piruvato se representa mediante rombos abiertos. Los círculos abiertos representan la adición de tiaminapirifosfato 10 μ M (Figura 5A) o lipoamida 0,5 mM (Figura 5B). Cada punto representa el promedio de al menos dos determinaciones de glutamato.

FIG. 6 es un gráfico que representa los efectos inversos de la adición repetida de NAD a la sangre en el compartimento de células sanguíneas (cuadrados rellenos) (disminución) y plasma (cuadrados abiertos) (crecientes) de los niveles de glutamato. Cada punto representa el promedio de al menos dos determinaciones de glutamato.

FIG. 7 representa gráficamente los niveles de glutamato en sangre *in vivo* (símbolos llenos) e *in vitro* (símbolos abiertos) tras administraciones repetidas (cada 15 minutos desde t=0 a t=45 min; flechas abiertas) de 200 μ l de PBS que contiene piruvato-oxaloacetato (30 μ moles cada) en presencia (círculos) o ausencia de NAD y ADP (rombos negros y cuadrados abiertos, respectivamente, 3 μ moles cada). Se representan promedios de dos mediciones del nivel de glutamato. Se muestra un experimento representativo de cada 4 realizados.

FIG. 8 representa gráficamente los niveles de glutamato en sangre disminuidos (rombos azules) *in vivo* en respuesta a la administración intravenosa de piruvato (círculos) y de oxaloacetato (triángulos) (50 μ moles cada / min) en un plazo de 30 minutos (barra negra). Los niveles de piruvato en sangre (cuadrados) y de oxaloacetato (triángulos) se controlaron en paralelo. Los resultados son el promedio de dos determinaciones.

FIG. 9 representa gráficamente el cambio de los niveles de glutamato *in vivo* tras la administración intravenosa de piruvato y oxaloacetato (50 μ moles cada / minuto) en un plazo de 30 minutos (barra negra). La gráfica representa un promedio de dos determinaciones de glutamato de 7 experimentos.

FIG. 10 representa gráficamente el cambio *in vivo* de los niveles de glutamato en sangre tras la administración intravenosa de una disolución de PBS que contiene piruvato 150 mM, oxaloacetato 150 mM y lipoamida 1,5 mM administrada a una velocidad de 50 μ l/min, en un plazo de 30 minutos (barra negra). Los niveles de glutamato en sangre (círculos), compartimento de células sanguíneas (rombos negros) y plasma (cuadrados grises) se presentan como promedios de dos determinaciones de glutamato. Se muestra un experimento representativo de cada 2 realizados.

FIG. 11 ilustra la captación de glutamato/adhesión a células sanguíneas de rata con el glutamato agotado. Se representan gráficamente los niveles de glutamato en el compartimento celular de sangre de rata, *in-vitro*, tras adiciones de piruvato y oxaloacetato hasta una concentración final de 1 mM repetidas cada quince minutos durante un plazo total de 90 minutos (círculos negros). A continuación, las células se lavaron y se suspendieron en tampón de Ringer Hepes que contenía glutamato en diferentes concentraciones. La incorporación de glutamato al compartimento celular de la sangre se controló cada quince minutos durante un plazo total de 60 minutos (de 90-150 minutos). Los símbolos son: rombos sólidos de color azul: tampón Ringer Hepes; cuadrados de color rosa: glutamato 0,1 mM; cruces de color negro: glutamato 0,2 mM; círculos de color rojo: glutamato 0,4 mM; triángulos azules: glutamato 0,6 mM; rombos de color marrón: glutamato 0,8 mM; rombos de color lavanda: glutamato 1 mM. Cada punto representa el promedio de al menos dos determinaciones de glutamato. Se pueden observar dos fases de captación de glutamato/adhesión a células sanguíneas de rata: una fase instantánea y una fase de desarrollo lento.

FIG. 12 ilustra la dependencia de la concentración de la captación "instantánea" de glutamato/adhesión a células sanguíneas de rata con el glutamato agotado. Los datos se derivaron de la Figura 11. El proceso presenta un

comportamiento de Michaelis con una $K_m = 488 \pm 172 \mu\text{M}$ y una $B_{\text{max}} = 70 \pm 11 \text{ nmol glutamato/ml}$ de suspensión celular.

FIG. 13 muestra la dependencia de la concentración de la captación "lenta" de glutamato/adhesión a células sanguíneas de rata. Los datos se derivaron de la Figura 11. El proceso es lineal y muestra un coeficiente de correlación $R^2 = 0,97$.

FIG. 14 muestra la cinética de liberación de glutamato desde células sanguíneas de rata con el glutamato agotado cargadas con glutamato 1 mM y colocadas en disolución de Ringer Hepes desprovista de glutamato: Círculos rellenos: progresión de los niveles de glutamato en la fracción de células sanguíneas. Cuadrados rellenos: progresión de los niveles de glutamato en la disolución extracelular. Las flechas indican la extensión de la liberación de glutamato "instantánea" (flechas descendentes) desde las células y la aparición de glutamato "instantánea" (flechas ascendentes). Cada punto representa el promedio de al menos dos determinaciones de glutamato.

FIG. 15 ilustra la captación de glutamato/adhesión a células sanguíneas de rata con el glutamato agotado. Progresión de los niveles de glutamato en el compartimento de células sanguíneas de rata *in-vitro* tras adiciones de piruvato y oxaloacetato hasta una concentración final de 1 mM repetidas cada quince minutos durante un plazo total de 90 minutos (cuadrados rellenos). A continuación, las células se lavaron y se resuspendieron en plasma. Los niveles de glutamato en la fracción de células sanguíneas (cuadrados negros) y en plasma (círculos negros) se controlaron cada quince minutos durante un plazo total de 60 minutos adicionales. Cada punto representa el promedio de al menos dos determinaciones de glutamato.

FIG. 16 ilustra la progresión de los niveles de glutamato en sangre, *in-vivo*, después del intercambio de sangre. Se extrajo sangre (8,5 ml) de una rata receptora y se intercambió durante 13 minutos (barra negra) con 8,5 ml de células con el glutamato agotado suspendidas en Hetastarch al 6 %. El agotamiento de glutamato en la sangre de la rata donante se consiguió mediante su incubación *in vitro* con piruvato y oxaloacetato a una concentración final de 1 mM añadida cada quince minutos durante un plazo total de 60 minutos. La cantidad de sangre intercambiada corresponde a un 40 % del volumen sanguíneo total del hospedador. Se presentan los niveles de glutamato en la fracción de células sanguíneas (rombos) y en plasma (cuadrado). Los símbolos muestran los promedios de dos determinaciones de glutamato. Se muestra un experimento representativo de cada 3 realizados.

FIG. 17 representa gráficamente la progresión de los niveles de glutamato en sangre, *in-vivo*, después de una dilución isovolémica con Hetastarch al 6 %. Se extrajeron alícuotas de sangre de 1 ml cada 3 minutos desde una rata receptora y se intercambiaron con una disolución de Hetastarch al 6 % en PBS. El agotamiento del glutamato en sangre (rombos) y del hematocrito (triángulos) se controlaron en cada alícuota. Se muestra un experimento representativo de cada 3 realizados.

FIG. 18 ilustra los cambios en los niveles de glutamato radiomarcado en sangre tras la infusión intracerebroventricular de 11 μCi en 11 μl de [^3H]glutamato ([^3H]Glu). Se muestra un experimento representativo de cada 8 realizados.

FIG. 19 muestra los cambios en los niveles de glutamato radiomarcado en sangre tras la inyección de bolo intravenoso de 1 μCi de [^{14}C] glutamato en ausencia (círculos azules) o presencia (triángulos rojos) de glutamato no marcado 3,4 mM. Se muestra un experimento representativo de cada 3 realizados.

FIG. 20 ilustra el impacto del secuestro de glutamato en sangre en la salida de [^3H]Glu desde el cerebro hacia la sangre realizando un seguimiento en la evolución de la radioactividad en sangre (rombos) y de los niveles de Glu en sangre (cuadrados) tras la infusión intracerebroventricular de [^3H]Glu 11 μCi y su modulación mediante la administración intravenosa de piruvato y oxaloacetato. La inyección de oxaloacetato comenzó a los 55 minutos de la inyección del piruvato; ambos compuestos se proporcionan a una velocidad de 50 $\mu\text{moles/min}$ cada uno durante un plazo de 30 min (barra negra). Esta pauta ocasiona la acumulación de una concentración sanguínea de 0,45 mM tanto de piruvato como oxaloacetato (véase la Figura 8). Cada punto representa el promedio de tres experimentos \pm desviación estándar (SD). Una prueba de la t de Student bilateral realizada para los niveles estacionarios de [^3H]Glu alcanzados antes y durante la infusión de piruvato y oxaloacetato muestra un valor de p de 0,002. Las líneas discontinuas muestran los niveles de estado estacionario alcanzados antes de la administración intravenosa de piruvato y oxaloacetato.

FIG. 21 ilustra la evolución con el tiempo de los niveles de [^3H]glutamato en el cerebro tras la infusión intracerebroventricular. El parámetro de la ordenada representa C_t , es decir, la cantidad de [^3H]glutamato que permanece en el cerebro a tiempo t calculada de acuerdo con la relación I sobre la base de los datos presentados en la Figura 19. Verde, $C_i=153$; Azul, $C_i=201$; Rojo, $C_i=199$.

FIG. 22 es un histograma que ilustra el porcentaje de glutamato liberado desde el cerebro hasta la sangre por minuto antes de (columna izquierda), junto con (columna central) y después de (columna derecha) la administración intravenosa de piruvato y oxaloacetato. Este análisis resume los resultados proporcionados en las Figuras 20-21.

FIG. 23 representa gráficamente la perfusión ventrículo-cisternal de [^3H]glutamato y el porcentaje de [^3H]glutamato absorbido. Este último se calculó como $(1-R) \times 100$ donde R es el cociente entre la radioactividad introducida por unidad de volumen y la de salida recogida en la cisterna magna. La perfusión se inició con una disolución de [^3H]glutamato 0,2 μM en un LCS artificial y se cambió 8 minutos después a una que contenía [^3H]glutamato 0,2 μM junto con glutamato sin marcar 250 μM . El caudal fue de 26 $\mu\text{l/min}$. Se muestra un experimento representativo de cada 3 realizados.

FIG. 24 ilustra el impacto del secuestro del glutamato en sangre sobre la absorción de [³H]Glu por el cerebro mediante la perfusión ventriculocisternal de [³H]Glu y el seguimiento de la evolución del porcentaje de [³H]Glu absorbido. El porcentaje se calculó como $(1-R) \times 100$ donde R es el cociente entre la radioactividad introducida por unidad de volumen y la de salida recogida en la cisterna magna. Gráfico A –Perfusión de una disolución de [³H]Glu 30 μ M en un LCS artificial que contenía [³H]Glu/ml 0,2 μ Ci (cuadrados). Después de 60 minutos, se inició una infusión intravenosa de piruvato y oxaloacetato a una velocidad de 50 moles/min durante un plazo de 50 min. Un análisis de la t de Student A para los valores estacionarios alcanzados antes y durante la infusión de piruvato y oxaloacetato muestra un valor p de 0,008. Gráfico B - Perfusión de una disolución de [³H] Glu 250 μ M en un LCS artificial que contenía [³H]Glu/ml 0,2 μ Ci (triángulos). La perfusión se llevó a cabo a un caudal de 26 μ l/min. Después de 55 min, se inició una infusión intravenosa de piruvato y oxaloacetato a una velocidad de 50 μ Moles /min durante un plazo de 50 min. En estas condiciones, se consiguió una reducción promedio de 50 ± 10 % del Glu en sangre (Figura 9). Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar (SD). Un análisis de la t de Student A para los valores estacionarios alcanzados antes y durante la infusión de piruvato y oxaloacetato muestra un valor p de 0,58. Las líneas discontinuas muestran el estado estacionario alcanzado antes de la administración intravenosa de piruvato y oxaloacetato.

FIG. 25 muestra los cambios en los niveles de glutamato del LCS tras la reducción en los niveles de glutamato en sangre. Esto último se consiguió mediante una infusión intravenosa de piruvato y oxaloacetato a una velocidad de 50 μ moles/min durante un plazo de 30 min (barra). En estas condiciones se alcanzó un promedio del 50 ± 10 % del glutamato en sangre (véase la Figura 9). Se muestra un experimento representativo de cada 5 realizados.

FIG. 26 es un mecanismo propuesto de la salida acelerada de glutamato desde el cerebro hacia la sangre que resulta de una disminución de los niveles de glutamato en sangre. Piruvato y oxaloacetato administrados simultáneamente activan las enzimas sanguíneas GPT y GOT respectivamente para disminuir el glutamato y producir α -cetoglutarato (α -KG), alanina y aspartato. Como resultado, el gradiente químico del glutamato entre las células endoteliales y el plasma aumenta y el glutamato de las células endoteliales aumenta como resultado de la captación del transportador del glutamato en la membrana antiluminal y mediante la acción de la glutaminasa, viaja hasta el plasma mediante difusión facilitada. La disminución en la concentración de glutamato intraendotelial evita que los transportadores de glutamato de "bombeo inverso" dependientes del ion Na⁺ (círculos negros) (que transportan habitualmente algo de glutamato al cerebro) aumentando de esta forma la salida neta de glutamato desde el cerebro a la sangre.

FIGS. 27A-B son ilustraciones esquemáticas de la estructura química del oxaloacetato (Figura 27A) y del dietiloxaloacetato (Figura 27B).

FIG. 28 muestra la evolución de la concentración de glutamato en sangre tras incubación in vitro durante 24 horas a 37°C en presencia de dietiloxaloacetato 10 mM.

FIG. 29A representa gráficamente el aumento en la concentración de oxaloacetato tras la incubación in vitro de dietiloxaloacetato 10 mM durante una hora a 37°C en diferentes homogenados de tejido de rata. Círculo - duodeno; Cuadrados-yeyuno; Triángulos -ileon; Rombos -colon; rayas -hígado.

FIG. 29B representa gráficamente el aumento en la concentración de oxaloacetato tras la incubación 10 mM durante 24 horas a 37°C en sangre de rata (Cuadrados). Las muestras de control en ausencia de dietiloxaloacetato se han indicado por rombos.

FIG. 30 representa gráficamente el aumento en la concentración de glutamato tras la incubación in vitro de plasma de sangre de rata durante 24 horas en ausencia (rombos) o presencia (cuadrados) de dietiloxaloacetato 10 mM.

FIG. 31 representa gráficamente los niveles de glutamato convertidos en 2-cetoglutarato tras la incubación in vitro de plasma de sangre de rata en presencia de dietiloxaloacetato 10 mM para los intervalos de tiempo indicados.

FIG. 32 muestra la estructura química de una dietiloxaloacetato modificado que no forma una sal con iones sodio.

FIG. 33 es un gráfico que representa los niveles de glutamato en sangre in vitro tras las administraciones repetidas (cada 15 minutos de t=0 hasta t=45 min) de α -cetobutirato (cuadrados cerrados) u oxaloacetato (rombos cerrados) cada una a 1 mM.

FIG. 34 es un gráfico que representa los niveles de glutamato en sangre in vitro en presencia de oxaloacetato 0,25 mM de α -cetobutirato. Téngase en cuenta que el efecto del α -cetobutirato se normalizó al nivel de glutamato en sangre alcanzado en presencia de oxaloacetato 0,25 mM.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente divulgación se refiere a composiciones y métodos de usar las mismas para reducir los niveles de glutamato extracelular en el cerebro de un sujeto. Específicamente, la presente invención se puede utilizar para tratar lesiones cerebrales agudas y crónicas donde los niveles de glutamato elevado son perjudiciales para el sujeto, tal como en dolencias isquémicas.

Los principios y funcionamiento de la presente invención se pueden entender mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntos.

Antes de explicar al menos una realización de la invención detalladamente, se debe entender que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes definidos en la siguiente descripción o ilustrada en los dibujos. La invención admite otras realizaciones o realizarse o llevarse a la práctica de diferentes formas. También, debe entenderse que la redacción y terminología empleadas en el presente documento tienen fin descriptivo y no deberán considerarse como limitantes.

Los niveles de glutamato elevados de forma anómala en el intersticio cerebral y los fluidos cerebrospinales son el hito de varias enfermedades neurodegenerativas graves. Entre las numerosas soluciones para reducir la excitotoxicidad del glutamato se incluye el desarrollo de antagonistas del receptor del glutamato y la sobrerregulación de los transportadores de glutamato. Aunque el primero está limitado por efectos adversos e incluso letales probablemente debidos a una mala selectividad, ninguno de los últimos ha tenido éxito en proporcionar una solución terapéutica viable para disminuir los niveles de glutamato..

Mientras intentaba llevar a la práctica la presente invención e investigaba una novedosa modalidad terapéutica para las dolencias clínicas asociadas con niveles de glutamato extracelulares elevados en el cerebro, el presente inventor ha descubierto que un exceso de glutamato extracelular en el cerebro se puede eliminar aumentando la salida de glutamato desde el cerebro hacia la sangre.

Estos hallazgos permiten generar composiciones terapéuticas muy eficaces que se pueden utilizar para tratar dolencias clínicas caracterizadas por niveles de glutamato extracelulares elevados en el cerebro.

De este modo, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para reducir niveles de glutamato extracelulares en el cerebro.

El método se lleva a cabo administrando a un sujeto necesitado del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente capaz de reducir los niveles de glutamato en sangre, aumentando de esta forma la salida de glutamato desde el cerebro a la sangre y, en consecuencia, reducir los niveles de glutamato extracelulares en el cerebro glutamato.

Los sujetos individuales preferidos de acuerdo con la presente invención son mamíferos tales como caninos, felinos, ovinos, porcinos, equinos, bovinos, seres humanos y similares.

Un agente, que es capaz de reducir el glutamato en sangre de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluye cualquier enzima modificadora de glutamato y/o un cofactor de la misma o cualquier derivado artificialmente modificado (por ejemplo, ésteres).

Tal como se usa en el presente documento "una enzima modificadora de glutamato" es una enzima que utiliza glutamato como sustrato y produce un producto de reacción de glutamato. Una enzima modificadora de glutamato puede ser una enzima natural o una enzima que se ha modificado para obtener rasgos modificados tal como una mayor afinidad para el glutamato que un glutamato modificado, estabilidad en condiciones fisiológicas, solubilidad, enantioselectividad potenciada, termoestabilidad aumentada y similares como se describe adicionalmente más adelante en el presente documento.

Se conocen en la técnica numerosas enzimas modificadoras de glutamato. Por ejemplo, las transaminasas, que juegan un papel central en el metabolismo de los aminoácidos y generalmente canalizan los grupos α -amino de diversos aminoácidos mediante la conversión acoplada de glutamato en α -cetoglutarato o de α -cetoglutarato en glutamato.

Los ejemplos de transaminasas incluyen pero no se limitan a glutamato oxaloacetato transaminasas, glutamato piruvato transaminasas, acetilornitina transaminasas, ornitina-oxo-ácido transaminasas, succinildiaminopimelato transaminasas, 4-aminobutirato transaminasas, alanina transaminasas (nota: análogas a las glutamato piruvato transaminasas), (s)-3-amino-2-metilpropionato transaminasas, 4-hidroxi-glutamato transaminasas, diiodotirosina transaminasas, hormona tiroidea transaminasas, triptófano transaminasas, diamina transaminasas, cisteína transaminasas, L-Lisina 6-transaminasas, histidina transaminasas, 2-aminoadipato transaminasas, glicina transaminasas, aminoácido ramificado transaminasas, 5-aminovalerato transaminasas, dihidroxifenilalanina transaminasas, tirosina transaminasas, fosfoserina transaminasas, taurina transaminasas, aminoácido aromático transaminasas, aminoácido aromático glioxolato transaminasas, leucina transaminasas, 2-aminohexanoato transaminasas, ornitina (lisina) transaminasas, kinurenina-oxoglutarato transaminasas, D-4-hidroxifenilglicina transaminasas, cisteína-conjugado transaminasas, 2,5-diaminovalerato transaminasas, histidinol-fosfato transaminasas, diaminobutirato-2-oxoglutarato transaminasas, UDP-2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxiglucosa transaminasas y aspartato transaminasas (a resaltar: análogas a las glutamato oxaloacetato transaminasas).

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, el agente de acuerdo con la presente invención puede incluir uno o más cofactores de las enzimas modificadoras de glutamatos, concretamente oxaloacetato, piruvato.

Como se ilustra adicionalmente en la sección de Ejemplos siguientes, para una salida óptima de glutamato del cerebro a la sangre el agente se selecciona preferiblemente capaz de reducir los niveles de glutamato en plasma en lugar de niveles de glutamato en células sanguíneas.

- 5 De este modo, de acuerdo con la presente invención el agente incluye oxaloacetato y piruvato. Preferentemente, el agente se administra a una dosis que no supera 1 g/kg x hora.

10 En algunos casos, el agente administrado se modifica para aumentar el efecto terapéutico o reducir los efectos secundarios indeseados. Por ejemplo, la administración de oxaloacetato dietil éster es favorable comparado con la administración de oxaloacetato solo ya que el oxaloacetato ejerce su potencial terapéutico a concentraciones relativamente elevadas (véase el ejemplo 21, Figuras 27A-B y Figura 32) y requiere una titulación completa de sus restos carboxilo con hidróxido de sodio en una relación estequiométrica 3:1 que presenta una carga de electrolito inaceptable por encima de los niveles seguros.

15 El agente utilizado en el método de la presente divulgación se puede administrar a un sujeto individual *per se*, o como parte de una composición farmacéutica donde se mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable (véase el Ejemplo 21 de la sección de Ejemplos).

20 Tal como se usa en el presente documento una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos anteriormente en el presente documento junto con otros componentes tales como portadores fisiológicamente adecuados y excipientes, penetrantes etc. El objetivo de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

25 En el presente documento el término "principio activo" se refiere a la parte de la preparación responsable del efecto biológico (por ejemplo, la enzima modificadora de glutamato, y/o cofactores de la misma).

30 A partir de ahora en el presente documento, las frases "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" se utilizan de forma indistinta para referirse a un portador o diluyente que no produce una irritación significativa a un organismo ni impide la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado. Se incluye un adyuvante en estas frases. Uno de los ingredientes incluidos en el portador farmacéuticamente aceptable puede ser por ejemplo polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio intervalo de solubilidad en medios tanto orgánicos como acuosos (Mutter y col. (1979).

35 En el presente documento el término "excipiente se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Los ejemplos de excipientes, sin limitación, incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diferentes azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

40 Las técnicas para formular y administrar fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA.

45 Las vías de administración adecuadas para la composición farmacéutica de la presente invención son la administración parenteral incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales e intraoculares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden fabricar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grajeas, molienda en húmedo, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

50 Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente divulgación se pueden formular de manera convencional utilizando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y sustancias auxiliares que facilitan el procesamiento de los principios activos para conformar preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. La formulación correcta depende de la vía de administración elegida.

55 Para inyección, los principios activos de la divulgación se pueden formular en disoluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la disolución de Hank, la disolución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosal, se utilizan penetrantes adecuados a la barrera que se desea permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

60 Para administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando los principios activos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos portadores permiten a los compuestos de la divulgación formularse como comprimidos, píldoras, grajeas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y similares, para su ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden fabricar utilizando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grajeas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o

65

sorbitol; preparaciones de celulosa tales como por ejemplo almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico, o una sal de los mismos tal como alginato de sodio.

Los núcleos de grajea van provistos de revestimientos adecuados. Con este fin se pueden utilizar disoluciones concentradas de azúcares que opcionalmente contienen goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, carbopol gel, polietilenglicol, dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos alimentarios a los comprimidos o revestimientos para grajea adecuados para identificar o caracterizar diferentes combinaciones de dosis de principio activo.

Las composiciones farmacéuticas, que se pueden utilizar oralmente, incluyen cápsulas duras hechas de gelatina así como cápsulas blandas precintadas hechas de gelatina y un plastificante tales como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos en premezcla con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los principios activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deberán estar en las dosis adecuadas para la vía de administración seleccionada.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o cápsulas gruesas de la manera convencional.

Para administración mediante inhalación nasal, los principios activos para su uso de acuerdo con la presente divulgación se suministran cómodamente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la dosis unitaria se puede proporcionar mediante una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo gelatina para usar en un dispensador se pueden formular conteniendo una mezcla de polvo del compuesto y una base pulverulenta adecuada tal como lactosa o almidón.

Las preparaciones descritas en el presente documento se pueden formular para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o recipientes multidosis con, opcionalmente, adición de un conservante. Las composiciones pueden ser suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los principios activos según sea apropiado en suspensiones para inyección de base oleosa o acuosa. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácido graso sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. De manera opcional, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de disoluciones muy concentradas.

Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo una disolución acuosa estéril exenta de pirógenos, antes del uso.

La composición farmacéutica de la presente divulgación puede también estar formulada en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención utilizando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente divulgación incluyen composiciones donde los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin deseado. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de principios activos que sea eficaz para evitar, aliviar o mejorar síntomas de enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto en tratamiento.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien comprendida entre la capacidad del experto en la técnica.

Para cualquier composición farmacéutica utilizada en el método de tratamiento de la divulgación, la cantidad terapéuticamente eficaz o dosis se puede estimar inicialmente a partir de ensayos in vitro. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales y dicha información se puede utilizar para determinar con más precisión las dosis más precisas en seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y en cultivos celulares y estudios en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosis para uso en seres humanos. La dosis puede variar dependiendo de la forma farmacéutica utilizada y la vía de administración usada. La formulación, vía de administración y dosis exactas se pueden elegir por cada médico en función del estado del paciente. (Véase por ejemplo, Fingl, y col., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 p,1).

En la siguiente sección de ejemplos se proporcionan guías adicionales sobre dosis adecuadas.

Dependiendo de la gravedad y la respuesta de la dolencia a tratar, la dosis puede ser una sola administración o una pluralidad de administraciones, durando el tratamiento desde varios días a varias semanas o hasta conseguir la cura o la disminución de la patología o de los síntomas.

La cantidad de composición farmacéutica a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto a tratar, la gravedad de la afección, la forma de administración, el criterio del médico prescriptor, etc.

Las composiciones que incluyen la preparación de la presente divulgación formulada en un portador farmacéuticamente compatible también se puede preparar, colocar en un recipiente adecuado y etiquetar para tratamiento de la dolencia indicada.

Las composiciones de la presente divulgación pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo de dispensación, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen el principio activo. El paquete puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo de dispensación puede ir acompañado de instrucciones de administración. El envase o dispensador puede también incluir una nota asociada al recipiente en una forma prescrita por el organismo gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de compuestos farmacéuticos, dicha nota refleja la aprobación por el organismo de la forma de las composiciones para administración para uso humano o veterinario. Dicha noticia, por ejemplo puede ser por ejemplo un etiquetado aprobado por el organismo estadounidense responsable de fármacos o alimentos para los fármacos expedidos con receta o un prospecto de producto aprobado.

Los agentes de la presente divulgación se pueden utilizar en el tratamiento (es decir, reducir o prevenir o disminuir sustancialmente concentraciones elevadas de glutamato extracelular del cerebro de diversas dolencias clínicas asociadas con niveles elevados de glutamato extracelular del cerebro tales como anoxia cerebral, isquemia cerebral, ictus, lesión cerebral perinatal, lesión cerebral traumática, meningitis bacteriana, hemorragia subaracnoidea, migraña, estrés, choque hemorrágico, epilepsia, insuficiencia hepática aguda, glaucoma, esclerosis lateral amiotrófica, demencia asociada a VIH, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), dolencias espásticas, cirugía a corazón abierto, cirugía de aneurismas, derivación con injerto de la arteria coronaria y enfermedad de Alzheimer.

Se apreciará que las composiciones farmacéuticas de acción rápida y las rutas de administración descritas anteriormente aquí se utilizan preferentemente para tratar anoxia cerebral, isquemia cerebral, ictus, lesión cerebral perinatal, lesión cerebral traumática, meningitis bacteriana, hemorragia subaracnoidea, migraña, estrés, choque hemorrágico, epilepsia, insuficiencia hepática aguda, cirugía a corazón abierto, cirugía de aneurismas, derivación con injerto de la arteria coronaria. Cuando se necesita la administración continua se prefiere un fármaco de liberación continuada siempre que no tenga lugar la producción endógena en el órgano agotado.

Al llevar a la práctica la presente invención, el presente inventor ha descubierto también que las células de la sangre que se han aislado del cuerpo, se han vaciado de glutamato y se han devuelto al cuerpo son capaces de inducir una disminución en los niveles de glutamato en sangre y de esta forma disminuir los niveles de glutamato en el cerebro.

De este modo de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un método adicional para reducir los niveles de glutamato extracelular del cerebro.

El método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación se basa en el fundamento de que las células vaciadas de glutamato, tras su transfusión al sujeto hospedador, son capaces de bombear rápidamente el glutamato plasmático a su cociente original entre las concentraciones de glutamato en la célula y el plasma (es decir, sustancialmente 4:1), estimulando de este modo la salida de glutamato desde el cerebro a la sangre (es decir, cerebro a plasma) y de reducir la concentración de glutamato extracelular del cerebro (véase el Ejemplo 15).

El método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación se lleva a cabo tratando muestras de sangre derivadas de un sujeto con agentes reductores de glutamato como los descritos anteriormente en el presente documento, aislar células de la muestra de sangre y devolver las células al sujeto.

Preferentemente, la muestra de sangre de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación se obtiene del sujeto mediante transfusión autóloga adicional. Esto reduce el riesgo de enfermedades infecciosas como la hepatitis, que

se pueden transmitir mediante transfusiones de sangre.

5 Se apreciará que se pueden utilizar muestras con el mismo tipo de sangre (es decir, mismo grupo sanguíneo) procedentes de donantes singénicos para una transfusión homóloga, aunque también se pueden utilizar muestras de tipos de sangre diferentes procedentes de donantes alogénicos junto con un procedimiento de desantigenación. Se conocen en la técnica numerosos métodos de desantigenación de los epítomos de grupo sanguíneo en los eritrocitos (es decir, seroconversión) tal como se describen en las patentes de los Estados Unidos con números 5.731.426 y 5.633.130.

10 Las muestras de sangre se ponen en contacto con el agente de la presente invención en condiciones adecuadas para reducir los niveles de glutamato en sangre para obtener de este modo células sanguíneas con glutamato agotado (tal como se ha descrito en el presente documento anteriormente y adicionalmente en los Ejemplos 14-15 de la sección de Ejemplos siguiente).

15 Las células sanguíneas con glutamato agotado se separan a continuación del plasma mediante métodos de separación bien conocidos en la técnica, tales como mediante centrifugación (véase el Ejemplo 14 de la sección de Ejemplos).

20 Una vez que se han obtenido las células sanguíneas con glutamato agotado, se suspenden para conseguir preferentemente el volumen de sangre original (es decir, la concentración).

25 La suspensión de las células sanguíneas con glutamato agotado se lleva a cabo usando un hemosustituto. Un "hemosustituto" se refiere a un expansor del volumen sanguíneo, que incluye una disolución acuosa de electrolitos a concentración fisiológica, un agente oncótico macromolecular, un tampón biológico que tiene una capacidad de tamponado en el intervalo del pH fisiológico, nutrientes simples como azúcar o azúcares, ion magnesio en una concentración suficiente para sustituir el flujo de calcio a través de las membranas celulares. Un hemosustituto incluye también un agente de cardioplegia tal como ion potasio a concentración suficiente para prevenir o detener la fibrilación cardíaca. Se conocen en la técnica numerosos hemosustitutos. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a Hespan® (hetastarch al 6 %, cloruro de sodio al 0,9 % para inyección [Dupont Pharmaceuticals, Wilmington Del.]), Pentaspan (pentastarch al 10 % en cloruro de sodio al 0,9 % para inyección [Dupont Pharmaceuticals, Wilmington Del.] y Macrodex (Dextrano 70 al 6 % en dextrosa al 5 % para inyección o Dextrano 70 al 6 % en cloruro de sodio al 0,9 % para inyección [Pharmacia, Inc. Piscataway, N.J.] y Rheomacrodex (Dextrano 40 al 10 % en dextrosa al 5 % para inyección o Dextrano 40 al 10 % en cloruro de sodio al 0,9 % para inyección [Pharmacia, Inc. Piscataway, N.J.]). Estos productos son conocidos de la comunidad médica para indicaciones concretas aprobadas por la FDA y se describen ampliamente en el volumen titulado Physicians' Desk Referencia, publicado anualmente por Medical Economics Company Inc.

40 Se apreciará que las muestras de sangre tratadas se pueden almacenar para uso futuro. En este caso, sin embargo, se añade preferentemente a la disolución de hemosustitución un anticoagulante conservante estéril tal como anticoagulante citrato-fosfato-dextrosa-adenina (CPDA). También se añade un antibiótico gram negativo y un antibiótico gram positivo. A continuación, la sangre se almacena en recipientes estériles tales como recipientes exentos de pirógenos a 4°C.

45 Finalmente, la disolución de células sanguíneas con glutamato agotado se trasfunde por vía intravenosa o intravascular como disolución acuosa estéril al sujeto hospedador para reducir de esta forma los niveles de glutamato extracelular del cerebro.

50 Se apreciará que los estudios anteriores han resaltado la relativa impermeabilidad de los eritrocitos al glutamato extracelular [Young (1980) Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 209:355-75; Pico (1992) Int. J. Biochem. Cell Biol. 27(8):761-5 y Culliford (1995) J. Physiol. 489(Pt3):755-65]. Sin embargo, esto se realiza en presencia de una gradiente de concentraciones desfavorable para el glutamato.

55 De este modo, no solamente los eritrocitos de la presente invención muestran permeabilidad al glutamato, explicando de esta forma la aún poco explicada mezcla intracelular del glutamato en sangre, sino que proporciona también una estrategia de intercambio sanguíneo que se puede utilizar en condiciones de emergencia, tales como un ictus y traumatismo de cabeza, donde se desea una reducción rápida del glutamato LCS/LIC.

60 La metodología anteriormente descrita se puede llevar a cabo usando dispositivos actualmente disponibles tales como incubadoras y centrifugas (véase la sección de Ejemplos para más detalles) o un dispositivo específico que está diseñado y configurado para obtener una muestra de sangre del sujeto, procesarla como se ha descrito anteriormente y devolver las células sanguíneas con glutamato agotado al sujeto o a diferentes individuos que necesiten tratamiento.

65 Dicho dispositivo incluye preferentemente una entrada de sangre, una salida de sangre y una cámara para procesar la sangre y recuperar las células sanguíneas procesadas. Al menos una de la entrada y la salida de sangre está conectada a conducciones de flujo sanguíneo que contiene un conector separado del dispositivo para acceder al

sistema vascular del sujeto.

Los dispositivos para tratar sangre que proporcionan un circuito de sangre extracorpóreo para dirigir la sangre a un dispositivo de tratamiento desde un sujeto individual, y después devolver la sangre al sujeto individual son bien conocidos en la técnica. Dichos dispositivos de tratamiento incluyen, pero sin limitación, unidades de hemodiálisis, unidades de plasmaféresis y unidades de hemofiltración, que permiten al flujo sanguíneo fluir a través de una unidad que contiene un lecho fijo de enzima y otro agente bioactivo.

Ejemplos

Se hace ahora Referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las anteriores descripciones ilustran la invención en una forma no limitante.

En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican ampliamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las definidas en las patentes de los Estados Unidos con números 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles están extensamente descritos en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos con números 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization -A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). En dicho documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos del presente documento son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente el experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para llevar a la práctica o realizar ensayos de la presente invención, los materiales y métodos adecuados se describen a continuación.

EJEMPLO 1 (referencia)

Secuestro *in vitro* de glutamato sanguíneo por activación de enzimas residentes

Algunas patologías cerebrales graves no tratables se caracterizan por la presencia de un exceso de glutamato en el líquido intersticial cerebral. Para aumentar la fuerza impulsora y conseguir una salida mejorada de los niveles de glutamato desde el cerebro hacia la sangre, se determinaron *in vitro* las condiciones que permitían una disminución de los niveles de glutamato.

Puesto que tanto la glutamato piruvato transaminasa (GPT) y la glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT) catalizan la degradación de glutamato (a 2-cetoglutarato –reacción directa) y su síntesis (desde 2-cetoglutarato -reacción inversa) con eficacia equivalente, se ensayó si la administración de piruvato y oxaloacetato a la sangre da como resultado un desplazamiento del equilibrio hacia la degradación de glutamato, es decir, la reacción directa.

Materiales y procedimientos experimentales

Procedimientos experimentales

Materiales – la glutamato dehidrogenasa se compró a Roche (Roche diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania). Salvo que se indique otra cosa, todos los reactivos y productos químicos se compraron a Sigma, Rehovot, Israel.

Animales – Ratas adultas Sprague Dawley (SPD) (200-250 g de peso corporal) se anestesiaron intraperitonealmente con 40 mg de ketamina y 5 mg de xilacina / Kg de peso corporal.

Inducción del metabolismo del glutamato en sangre de rata y determinación de la concentración de glutamato – Muestras recientes de sangre de rata incubadas a 37°C se suplementaron cada 15 minutos como se indica con oxaloacetato y/o piruvato (concentración final de 1 mM a pH 7,4).

5 A los intervalos de tiempo indicados, alícuotas de 150 µl se extrajeron y se centrifugaron a 1.300 x g durante 7 minutos. Se midió el volumen de plasma (es decir, el sobrenadante) y se combinó con un volumen idéntico de ácido perclórico (PCA) para precipitar el contenido en proteínas. Se dejó continuar la precipitación durante 10 minutos sobre hielo y a continuación las muestras se centrifugaron. El aglomerado celular (es decir, eritrocitos, linfocitos y plaquetas) se lisó por choque osmótico tras resuspensión en agua doblemente destilada hasta un volumen final de
10 150 µl. A continuación se llevó a cabo una segunda etapa de precipitación de proteínas añadiendo 150 µl de PCA [1 mM]. Las fracciones de plasma y células precipitadas mediante PCA se centrifugaron a 16.000 x g durante 10 minutos y los aglomerados se descartaron.

Se determinó la concentración de glutamato en el sobrenadante de acuerdo con el procedimiento fluorométrico de
15 Graham y Aprison [(1996) Anal. Biochem. 15(3):487-97]. En resumen: una alícuota de 20 µl de la fracción precipitada mediante PCA se añadió a 480 µl de tampón HG que contenía 15 u de glutamato dehidrogenasa en NAD 0,2 mM, glicina 0,3 M, hidrato de hidrazina al 2,4 % ajustado a pH 6,8 con H₂SO₄ [1 N] y se incubó a temperatura ambiente durante 30-45 minutos. Se midió la fluorescencia a 460 nm tras excitación a 350 nm. Todas las mediciones se realizaron junto a una curva patrón de glutamato en un intervalo de concentraciones de glutamato de 0-6 µM.
20 Todas las mediciones de glutamato se realizaron por duplicado.

Resultados – Se determinaron in vitro los niveles de glutamato en muestras de sangre completa de rata, en varias condiciones de incubación a 37°C. Como se evidencia en la Figura 1A, los niveles de glutamato en sangre aumentaron a un ritmo constante tras incubación de la sangre de rata a 37°C (rombos sólidos). Se mostró un
25 aumento significativo del glutamato en sangre tras incubación de la sangre con 2,5 u/ml de GPT a tiempo cero (círculos vacíos) indicando la presencia de combinaciones endógenas significativas de 2-cetoglutarato y alanina, que ocasiona la síntesis de glutamato (es decir, la reacción inversa). Sin embargo, se detectó inversión completa tras adición de piruvato a una concentración final de 1 mM, a t cero en ausencia (cuadrados cerrados y flecha negra en t=0) o presencia de GPT 2,5 u/ml (círculos cerrados) o cuando se añadió piruvato a t = 0, 15, 30 minutos (cuadrados vacíos y flechas negras). Estos resultados muestran que la activación de GPT mediante piruvato causó una
30 disminución en los niveles de glutamato. De manera interesante, en estas condiciones, la reducción del glutamato fue transitoria ya que, poco después del consumo del piruvato (aproximadamente 15-20 minutos tras su última adición a la sangre) y la producción paralela de alanina y 2-cetoglutarato, este último aparentemente se volvía a convertir en glutamato.

35 El suplemento de la sangre con Pyr 1 mM (cuadrados sólidos), oxaloacetato 1 mM (triángulos cerrados) o una mezcla de ambos (rombos cerrados) a tiempo 0, 15 y 30 minutos dio como resultado una activación más rápida de GOT por el oxaloacetato, dando como resultado mayor declive en los niveles de glutamato, que no es paralela a la adición de piruvato. No se apreció sinergia para este efecto. Estos resultados sugieren que la conversión de glutamato mediada por GOT/GPT alcanzó una máxima extensión limitada por la acumulación paralela de
40 concentración de 2-cetoglutarato, que impulsa las reacciones inversas de GPT y GOT.

En su conjunto, estos resultados mostraron que los niveles de glutamato en sangre completa se pueden manipular in vitro mediante la adición de los cosustratos del glutamato de las GOT y/o GPT.
45

EJEMPLO 2

Efectos de piruvato y oxaloacetato sobre los niveles de glutamato en diferentes componentes de la sangre

50 La sangre completa se puede dividir en dos fracciones principales, plasma y células sanguíneas (es decir eritrocitos, leucocitos y plaquetas). Puesto que se propone en el presente documento que los potenciales efectos terapéuticos estén mediante por la disminución de la concentración de glutamato en plasma dando como resultado liberación compensatoria desde las reservas de glutamato en el cerebro, es esencial determinar los niveles de glutamato en plasma y el combinado celular tras la activación de GPT y GOT endógenas.
55

Resultados – Por tanto, los niveles de glutamato se determinaron individualmente en fracciones celulares de la sangre (símbolos cerrados) y en el plasma (símbolos abiertos) tras adiciones repetidas (flechas) de piruvato 1 mM (cuadrados), oxaloacetato 1 mM (triángulos) o de una mezcla de piruvato 1 mM y oxaloacetato 1 mM (rombos) (Figura 2A). La determinación del glutamato se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 1. La adición de
60 piruvato u oxaloacetato causó una reducción comparable en la concentración de glutamato intracelular, sin embargo, mientras el piruvato aumentó significativamente la concentración de glutamato en plasma, oxaloacetato causó una reducción significativa de la concentración de glutamato en plasma.

Al combinarse, piruvato y oxaloacetato tuvieron un efecto sinérgico, disminuyendo ambas concentraciones de
65 glutamato. Los resultados obtenidos sugieren que, una vez capturados intracelularmente, posiblemente mediante

transportadores de monocarboxilato, piruvato y oxaloacetato son capaces de activar GPT y GOT intracelular. Puesto que la concentración de glutamato intracelular de (120 +/- 4,9 μ M) es aproximadamente 3 veces superior a la plasmática (40,8 +/- 5,8 μ M), los datos respaldan la interpretación de que se espera que la disminución en las concentraciones intracelulares de glutamato se deba principalmente a la disminución del glutamato en sangre observada en la Figura 1. El análisis de las velocidades iniciales de conversión del glutamato mostró que las velocidades de conversión en el combinado celular (3,3 por ciento/minuto) eran aproximadamente 2,5 veces superiores a las plasmáticas (1,3 por ciento/minuto). Estas velocidades eran compatibles con las concentraciones de glutamato observadas en las combinaciones respectivas y en línea con los valores de Km del glutamato en GOT/GPT en el intervalo mM siempre que los niveles enzimáticos fueran similares en ambas combinaciones.

EJEMPLO 3

Niveles in vitro eficaces de piruvato y oxaloacetato

Puesto que los ejemplos anteriores habían indicado que la administración combinada de piruvato y oxaloacetato es eficaz para disminuir las concentraciones de glutamato tanto plasmática como la intracelular en las células de la sangre, era esencial determinar las concentraciones óptimas de piruvato y oxaloacetato para su potencial aplicación terapéutica.

Resultados – Se determinó la extensión que alcanzaba la degradación del glutamato en los 60 minutos posteriores a la adición de concentraciones crecientes de piruvato y oxaloacetato a las fracciones plasmática y de células de la sangre. Como se muestra en la Figura 3, la mitad del efecto máximo se observó a una concentración sub mM de acuerdo con los valores de km de la técnica anterior para piruvato y oxaloacetato. Se observó saturación a una concentración de aproximadamente 5 mM

Puesto que tanto GPT como GOT utilizan fosfato de piridoxal como cofactor, se evaluó la adición de 15 μ M de fosfato de piridoxal para establecer su capacidad para potenciar la disminución de la concentración de glutamato celular o plasmática mediada por piruvato y oxaloacetato. No se observaron efectos significativos del fosfato de piridoxal (no se muestran los datos).

De este modo, se determinaron las concentraciones óptimas de piruvato y oxaloacetato para mediar los efectos de reducción de glutamato en sangre, a una concentración con posibilidad de proporcionar valor terapéutico y aplicación.

EJEMPLO 4 (referencia)

Agotamiento de 2-cetoglutarato como medio de potenciar la degradación de glutamato in vitro

Glutamato se convierte mediante las enzimas GOT y GPT en 2-cetoglutarato. La acumulación de 2-cetoglutarato, sin embargo, puede impulsar las reacciones inversas de GOT y GPT, dando como resultado la producción de glutamato. Es posible que el producto 2-cetoglutarato sirva como sustrato de la enzima 2-cetoglutarato dehidrogenasa, dando como resultado la conversión del 2-cetoglutarato recientemente acumulado en succinil CoA. La conversión requiere la presencia de los cofactores CoA y NAD. Puesto que el pirofosfato de tiamina y el ácido lipoico son cofactores de la enzima 2-cetoglutarato dehidrogenasa, se teorizó que su adición a muestras de sangre en presencia de piruvato y oxaloacetato resulte en la estimulación de la degradación de glutamato, favoreciendo la reacción directa.

Resultados – Para ensayar la hipótesis anterior, piruvato 1 mM y oxaloacetato 1 mM se añadieron a muestras de sangre junto con adiciones repetidas de concentraciones crecientes de lipoamida (Figura 4A) y pirofosfato de tiamina (Figura 4B) y se determinó la concentración de glutamato durante 60 minutos. La adición de los cofactores de la 2-cetoglutarato dehidrogenasa aumentó de forma demostrable la conversión del glutamato en aproximadamente 15-50 %.

La conversión del glutamato era función de la concentración del cofactor de la 2-cetoglutarato dehidrogenasa, pero estos efectos también se pudieron evaluar en función del tiempo (Figuras 5A-B). Tanto el pirofosfato de tiamina (Figura 5A) como la lipoamida (Figura 5B) aumentaron drásticamente la velocidad de conversión del glutamato (en un intervalo del 20-50 %) además de la extensión de la conversión demostrada anteriormente. Estos datos se pueden interpretar como ilustrativos de que la activación de la 2-cetoglutarato facilita el secuestro de glutamato mediado por GOT/GPT.

De acuerdo con el concepto subyacente de que la activación de la 2-cetoglutarato facilita la degradación de glutamato mediada por GOT/GPT, estos resultados sugieren que la adición a la sangre de concentraciones sub mM de piruvato y oxaloacetato (Ejemplo 3) junto con uno cualquiera de lipoamida o pirofosfato de tiamina es un medio adicional o alternativo de disminuir los niveles de glutamato en plasma, para conseguir un efecto terapéutico.

EJEMPLO 5 (referencia)**El efecto de los cofactores de la glutamato dehidrogenasa sobre la conversión del glutamato**

5 La conversión del glutamato está mediada por un procedimiento de desaminación oxidativa. Esta reacción está catalizada por la enzima glutamato dehidrogenasa (GDH), que tiene una capacidad no habitual de utilizar cualquiera de los cofactores NAD⁺ o NADP⁺. La proteína multimérica, GDH, también se active alostéricamente mediante ADP y leucina. Era por tanto esencial determinar si, y en qué medida, estos cofactores mediaban la degradación del glutamato mediada por GDH en cuestión.

10 **Resultados** – La incubación de sangre con NAD, Leu o ADP tanto por separado como en combinación, dio como resultado efectos diferenciales sobre las concentraciones de glutamato en los dos compartimentos de la sangre, *in vitro* (Figura 6). Aunque que se observa una disminución de los niveles de glutamato en las células de la sangre tras la adición de NAD, fue evidente un aumento en los niveles de glutamato en plasma. Aunque la incubación con NAD, leucina (Leu) o ADP tanto por separado como en combinación aumentaron los niveles de glutamato en plasma, la adición de NAD solo o junto con Leu y ADP dio como resultado una disminución en el glutamato celular. La adición de cualquiera de Leu o ADP individualmente, sin embargo, no alteró significativamente los niveles de glutamato.

20 Aunque estos resultados sugieren un papel de NAD como posible activador de GDH *in-vitro* en el compartimento celular, el producto 2-cetoglutarato se volvió a convertir en glutamato, probablemente mediante la acción de GOT y/o GPT plasmáticas. Por tanto, la activación de la GDH no es un medio preferido para disminuir el glutamato plasmático.

EJEMPLO 6 (referencia)

25

Secuestro en vivo de glutamato en sangre mediante la activación de enzimas endógenas**Materiales y métodos experimentales**

30 **Materiales** - Glutamato, piruvato de sodio, oxaloacetato de sodio, NADH, lactato dehidrogenasa y malato dehidrogenasa se compraron a Sigma. La glutamato dehidrogenasa se compró a Boeringer.

35 **Animales** – La anestesia de las ratas adultas Sprague Dawley (peso 200-250 gramos) se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

40 La cateterización de la vena de la cola (para inyectar fármaco) y de la vena femoral (para extracción de alícuotas de sangre) se realizó mediante el uso de conducciones de polietileno PE10 unidas a conducciones de polietileno PE50. Todos los catéteres se sujetaron con sutura 5-0 de seda y se lavaron con heparina (3-5 µl de 182 U/ml). La temperatura corporal se mantuvo con una lámpara y se controló la temperatura rectal. El pulso de la rata se controló mediante un sistema Periflux 500 una sonda láser Doppler colocada en el cráneo.

45 Las inyecciones intravenosas de los diferentes compuestos diluidos en suero salino tamponado con fosfato (PBS) se llevaron a cabo a una velocidad de 0,05 ml/minute durante 30 min con una bomba Pharmacia P-1. Durante las inyecciones y en varios puntos temporales después de las inyecciones (en general, cada 15 min),

Determinación de la concentración de glutamato – Se extrajeron alícuotas de sangre de 150 µl de la vena femoral de la rata. La determinación de la concentración de glutamato se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 1.

50 El análisis de glutamato de las muestras de sangre tratadas *in vivo* se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento fluorométrico de Graham y Aprison [(1996) Anal. Biochem. 15(3):487-97].

55 **Determinación de la concentración de piruvato** - La concentración de piruvato en sangre se midió mediante el uso de los reactivos de Sigma Diagnostics para piruvato de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen: el procedimiento utiliza lactato dehidrogenasa que, en presencia de un exceso de NADH, cataliza la conversión casi completa de piruvato en lactato con la producción paralela de NAD. La reducción de la absorbancia a 340 nm debida a la oxidación de NADH a NAD es la medida de la cantidad de piruvato inicialmente presente.

60 **Determinación de la concentración de oxaloacetato** - La concentración oxaloacetato en sangre se midió mediante el mismo procedimiento que para el piruvato, pero utilizando malato dehidrogenasa que cataliza la conversión del oxaloacetato en malato junto con la oxidación de NADH a NAD.

EJEMPLO 7

65

Condiciones *in vivo* para maximizar la eficacia de la degradación del glutamato mediante GOT y GPT

Los ejemplos 2-5 establecen las condiciones *in vitro* con las cuales la activación de las enzimas presentes en la sangre, es decir, glutamato piruvato transaminasa (GPT) y glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT) con sus respectivos cosustratos piruvato y oxaloacetato, producen una disminución de la concentración de glutamato en sangre. Los siguientes experimentos revelan las condiciones óptimas que facilitan la reducción de los niveles de glutamato en sangre *in vivo*.

Puesto que se descubrió con una concentración de piruvato y/o oxaloacetato 1 mM era eficaz para reducir el glutamato en sangre *in vitro* (véase el Ejemplo 2) se realizó un intento de alcanzar concentraciones similares *in vivo* para cada uno de los cofactores.

Teniendo en cuenta que el volumen de sangre de rata es de aproximadamente 5,5 a 7 ml por 100 g de peso corporal (Van Dongen y col. 1990; Waynforth y Flecknell, 1992), se ensayaron los efectos de una única inyección intravenosa de una disolución mezclada en PBS de piruvato y oxaloacetato, cada uno a una dosis de 30 μ Moles (2 ml de una disolución 15 mM) sobre los niveles de glutamato en rata. Sin embargo, no se observaron efectos significativos sobre el glutamato en sangre ni siquiera cuando las dosis inyectadas por vía intravenosa se incrementaron hasta 200 μ Moles (no se muestran los datos) o cuando se administró hasta 4 mmol por vía tanto subcutánea o intraperitoneal.

Como se muestra en la Figura 7 (Referencia), cuando se realizaron cuatro inyecciones intravenosas sucesivas de piruvato y oxaloacetato, cada uno a una dosis de 30 μ moles (en intervalos de 15 minutos), en ausencia o presencia de los activadores de la glutamato dehidrogenasa (GDH) (3 μ moles cada) incluyendo leucina, NAD y ADP, se observó una disminución del 10-20 % en los niveles de glutamato en sangre. En condiciones paralelas *in vitro* tuvo lugar una disminución del 40-60 % en los niveles de glutamato en sangre. En ambos casos, la disminución fue transitoria y tuvo lugar un aumento en los niveles de glutamato en sangre poco después de la tercera o cuarta inyección.

EJEMPLO 8

Farmacocinética de oxaloacetato y piruvato in vivo

Puesto que el ejemplo anterior demostró que se necesitaban inyecciones repetidas para conseguir efectos óptimos mediados por la administración de oxaloacetato y piruvato, era interesante determinar si un suministro continuo mediante un catéter intravenoso produciría resultados alternativos o potenciados-

Resultados – Se determinó el efecto sobre los niveles de glutamato mediante la administración de oxaloacetato y piruvato a través de un catéter intravenoso a una velocidad de 50 μ moles/ minuto durante un plazo de 30 minutos. Las concentraciones de glutamato, piruvato y oxaloacetato se controlaron en paralelo. Como se muestra en la Figura 8, tuvo lugar una acumulación significativa de piruvato y oxaloacetato a los 15 minutos del tratamiento, que vino acompañado por un marcado descenso en el glutamato en sangre. Sin embargo, en cuanto se detuvo la administración de oxaloacetato y piruvato, su concentración en sangre disminuyó y aumentó en paralelo el nivel de glutamato.

EJEMPLO 9

Aumento de los niveles de glutamato en sangre tras una exposición prolongada a oxaloacetato y piruvato

Los ejemplos anteriores indicaron que la exposición a corto plazo a piruvato/oxaloacetato dio como resultado una disminución reversible en los niveles de glutamato en sangre. Era por tanto de interés determinar si una exposición a largo plazo ocasionaba un resultado similar. El seguimiento continuado de los niveles de glutamato, como anteriormente, durante un plazo de aproximadamente 200 minutos tras la finalización de la infusión de piruvato y oxaloacetato dio como resultado un aumento claro en los niveles de glutamato por encima de los niveles sanguíneos iniciales (Figura 9). Los niveles de glutamato drásticamente aumentados sugerían que el aumento no era función solamente de la reacción inversa de GOT/GPT (como resultado de la acumulación de los productos enzimáticos, 2-cetoglutarato, alanina y aspartato) sino en su lugar ponía de manifiesto la existencia de mecanismos fisiológicos de compensación adicionales. La administración de piruvato y oxaloacetato en estas circunstancias no dio como resultado ningún cambio en el pulso ni la temperatura rectal de la rata, pero resultó en un efecto diurético, más probablemente un resultado del aumento en la concentración de ion Na^+ ya que el piruvato y el oxaloacetato se inyectaron como sales sódicas.

EJEMPLO 10

Eliminación de 2-cetoglutarato como medio de potenciar la degradación de glutamo in vivo

Como se ha descrito en el Ejemplo 4 (Referencia) anteriormente en el presente documento, la adición *in vitro* de lipoamida o pirofosfato de tiamina (dos cofactores de la enzima 2-cetoglutarato dehidrogenasa) a la sangre limita las

reacciones inversas de GOT y GPT. Estas reacciones inversas están impedidas por una disponibilidad reducida del 2-cetoglutarato debido a su conversión a succinil CoA. Para una aplicación terapéutica eficaz, era necesario evaluar este fenómeno *in vivo*.

5 **Resultados** - Para determinar si este resultado era consistente *in vivo*, se administró a las ratas durante 30 minutos piruvato y oxaloacetato (7,5 μ moles/ minuto) junto con lipoamida (75 nmoles/minuto) o pirofosfato de tiamina (5 nmoles/minuto). En estos experimentos, los niveles de glutamato se controlaron tanto en la sangre completa como en las fracciones de plasma y de células (Figura 10). El análisis de los niveles de glutamato en plasma y en la combinación de células sanguíneas reveló que la velocidad inicial de conversión del glutamato (definida como el % de conversión del glutamato en los primeros 15 minutos) en la combinación celular (3,3 %/minuto) difería significativamente de la plasmática (0,6 %/minuto). Además, a medida que la extensión (60 %) y velocidad de la conversión del glutamato en la combinación celular medida *in vivo* era similar a los niveles *in vitro*, la extensión de la conversión del glutamato medida para el plasma *in vivo* es aproximadamente la mitad de la medida *in vitro*. La disminución en los niveles de glutamato plasmático debida a la activación de GOT/GPT estimuló aparentemente mecanismos compensatorios en los órganos periféricos para liberar glutamato, en un intento de normalizar las concentraciones de glutamato en circulación.

EJEMPLO 11

20 **Velocidad de captación del glutamato en células con glutamato agotado**

Los ejemplos anteriores demostraron niveles de glutamato disminuidos *in vitro* e *in vivo*, tras la activación de las enzimas residentes en la sangre glutamato-piruvato transaminasa (GPT) y glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT) mediante la adición de los cosustratos del glutamato piruvato y oxaloacetato. La exposición repetida en circulación a piruvato y oxaloacetato da como resultado una disminución en los niveles de glutamato en el plasma, así como en el compartimento de células de la sangre, que contiene hasta el 80 % de los niveles de glutamato en sangre.

Debido a estos hallazgos, se razonó que una estrategia de cambio de sangre que diera como resultado niveles de glutamato en circulación reducidos se puede llevar a cabo mediante el agotamiento de glutamato en el compartimento de células de la sangre. Como resultado, se produciría una entrada activa de glutamato en el plasma, para normalizar la relación de concentraciones de glutamato entre las células y el plasma, que es ~ 4 .

35 **Resultados** – Para verificar esta hipótesis, se añadieron piruvato/oxaloacetato *in vitro*, cada quince minutos durante un plazo de 90 minutos, y se determinaron los niveles de glutamato en el compartimento de células de la sangre según la metodología descrita en el Ejemplo 1. El agotamiento en el compartimento de células de la sangre es evidente durante la totalidad del período de 90 minutos (Figura 11). La posterior adición de concentraciones de glutamato comprendidas de 0,1 a 1 mM (controladas cada quince minutos) durante un plazo de 60 minutos dio como resultado un aumento específico del nivel de glutamato en el compartimento de células de la sangre. Este aumento en el glutamato se produce en dos fases, una de las cuales es esencialmente instantánea, y la otra que finalmente se satura con el tiempo.

Los eritrocitos parecen ser el constituyente celular esencial de los efectos mediados por el glutamato, ya que los neutrófilos, linfocitos o plaquetas purificados no parecen revelar signos de captación del glutamato (no se muestran los datos)

La representación gráfica del incremento "instantáneo" en el glutamato compartimento celular total en función de la concentración de glutamato (Figura 12) indica que este proceso tiene un comportamiento de tipo Michaelis, de aquí los resultados de saturación. El análisis de la curva proporciona una K_m aparente de $488 \pm 172 \mu\text{M}$ y una B_{max} de $70 \pm 11 \text{ nmol glutamato/ml}$ de suspensión celular.

La representación gráfica del incremento en el glutamato compartimento celular total para el plazo de 60 minutos en función de la concentración de glutamato indica una relación lineal entre las concentraciones de glutamato crecientes con el tiempo, reflejo de la existencia de un proceso de captación "lento" (Figura 13). La falta de un punto de saturación cuando los datos se obtienen de este modo puede reflejar la presencia de un proceso difusivo.

Según las curvas representadas en las Figuras 12 y 13, para concentraciones de glutamato inferiores a $600 \mu\text{M}$, la capacidad del proceso "instantáneo" es aproximadamente 2,4 veces mayor que el proceso de captación lento. De este modo, el proceso de captación "instantáneo" con saturación y el proceso de captación lineal "lento" difieren en los términos de sus capacidades de captación de glutamato, sugiriendo la existencia de compartimentos diferenciados para dichos procesos.

EJEMPLO 12

65 **Aumentos "instantáneo" y "lento" en la concentración de glutamato en las células de la sangre**

Para examinar adicionalmente la naturaleza de los incrementos "instantáneo" y "lento" en la concentración de glutamato en las células de la sangre (descritos en el Ejemplo 10), los niveles de glutamato en el compartimento de células de la sangre se evaluaron tras un suministro inicial de glutamato *in vitro*, seguido por exposición a medio exento de glutamato.

5 **Resultados** – Las células de la sangre se incubaron durante 60 minutos en glutamato 1 mM (tal como se ha descrito en el Ejemplo 10, anteriormente en el presente documento) y a continuación se expusieron posteriormente a disolución exenta de glutamato, de la que se ensayaron alícuotas de células y líquido sobrenadante para determinar la concentración de glutamato en función del tiempo. Como puede verse en la Figura 14, las dos poblaciones están
10 inversamente relacionadas con la exposición a las condiciones sin glutamato. Los niveles de glutamato en el compartimento de células de la sangre disminuyen con el tiempo, mientras que se produce el aumento paralelo en los sobrenadantes, aunque la disminución en el glutamato procedente de las células es más abrupto que su aumento en los sobrenadantes, y por tanto esto no representa un simple efecto de difusión sino, de hecho, es más probablemente un reflejo de la utilización intracelular del glutamato.

15 En respaldo de esta interpretación, los resultados de los experimentos realizados a más de 37 °C y a 20 °C revelaron que la disminución en el glutamato asociado a células era tres veces mayor a 37 °C. La temperatura más elevada facilita el funcionamiento correcto de las rutas celulares, y esto es por tanto consistente con la utilización metabólica del glutamato intracelular (no se muestran los datos).

20 **EJEMPLO 13**

Captación celular del glutamato desde plasma *in vitro*

25 Los niveles de glutamato determinados como anteriormente tras el agotamiento, en un entorno exento de glutamato, midieron la capacidad de "rebote", la capacidad de ajustar los niveles de glutamato en el compartimento de la sangre. Era por tanto de interés determinar la dinámica de las concentraciones de glutamato de diferentes compartimientos de la sangre como resultado de la posterior exposición a niveles de glutamato en el plasma.

30 **Resultados** – Estos experimentos que determinan la dinámica de las concentraciones de glutamato en diferentes compartimientos de la sangre se llevaron a cabo *in vitro*, y los resultados se presentan en la Figura 15. Las células de la sangre con el glutamato agotado responden con una disminución instantánea de aproximadamente el 30 % en los niveles de glutamato en plasma, y un aumento paralelo de los niveles de glutamato en las células sanguíneas, que se mantiene durante 60 minutos. La respuesta de captación de glutamato de "desarrollo lento" en células
35 tratadas de forma similar se reduce cuando las células están expuestas al plasma, que es consistente con el valor de Km estimado en la Figura 12. De este modo, los niveles de glutamato en las células sanguíneas se restauran en parte por su exposición al plasma, a diferencia de un entorno exento de glutamato, donde los niveles de glutamato disminuyen.

40 **EJEMPLO 14**

Captación celular del glutamato desde plasma *in vivo*

Materiales y métodos experimentales

45 **Animales** - Se utilizaron ratas SPD que pesaban 250- 300 gramos.

Procesamiento de la sangre del donante – Las ratas donantes se anestesiaron con 60 mg/kg de Pentobarbital, y se extrajo sangre mediante exposición quirúrgica de la cavidad torácica, seguido por recogida intracardiaca en tubos heparinizados (0,8 mg/ml). La sangre recogida se incubó a continuación a 37 °C con adición de piruvato y oxaloacetato cada 10 minutos hasta una concentración final de 1 mM, durante un plazo de 40 minutos. A continuación, la sangre se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y se retiró el plasma. El residuo se volvió a l

55 **Intercambio de la sangre** - Las ratas receptoras se anestesiaron como anteriormente y se realizaron transfusiones colocando una cánula de polietileno (PE 10) en la vena femoral para infusión de la sangre, y una cánula de polietileno (PE 10) en la en la arteria femoral para extracción de la sangre: la sangre se transfundió a una velocidad de 0,75 ml/min usando una bomba peristáltica, mientras que la sangre arterial se retiró a la misma velocidad de 0,75 ml/min con la ayuda de una bomba peristáltica adicional.

60 **Seguimiento de los niveles de glutamato** – Los niveles de glutamato del donante se controlaron posteriormente a la extracción de sangre durante la incubación *in vitro* con piruvato y oxaloacetato. Los niveles de glutamato en el receptor se controlaron extrayendo alícuotas de 200 µl de la vena femoral o la arteria femoral. Se extrajeron alícuotas dos veces antes del intercambio de sangre, inmediatamente después del intercambio, y 15, 30, 60 y 90 minutos después del intercambio. El tiempo total de intercambio de sangre varió entre 12-17 minutos.

65

Hemodilución isovolémica – Durante el plazo de 25 minutos, cada ml de sangre extraída se sustituyó por un volumen equivalente de Hetastarch al 6 %. Los niveles de glutamato en las ratas receptoras se controlaron en alícuotas de 100 µl procedentes de cada ml de sangre extraída. Los restantes 900 µl se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos y se midieron los volúmenes respectivos de aglomerado y sobrenadante, y su cociente se definió como el hematocrito.

Resultados experimentales – Puesto que se había descubierto *in vitro* que el glutamato se capturaba desde el plasma específicamente por células con el glutamato agotado, y por tanto esto presentaba una estrategia factible para reducir los niveles de glutamato en plasma, era importante evaluar este caso *in vivo*. De este modo, se llevaron a cabo experimentos de intercambio de sangre, en los que se extraía sangre de una rata receptora y se administraba un volumen igual de células sanguíneas de donante con el glutamato agotado suspendidas en Hetastarch al 6 % (Figura 16). Las suspensiones de células de la sangre del donante que contenían un 30 % de los niveles de glutamato iniciales y el correspondiente 40 % del volumen total del hospedador se intercambiaron (por un volumen sanguíneo equivalente) por sangre del receptor, y donde se controlaron los niveles de glutamato en los compartimentos tanto del plasma como de las células de la sangre del receptor. Poco después de finalizar el intercambio, la concentración de glutamato en el plasma disminuyó. La disminución en la concentración de glutamato en el plasma se puede atribuir a la unión "instantánea" del glutamato a los glóbulos rojos, y a la dilución del propio plasma, como consecuencia del intercambio con la disolución de Hetastarch.

De este modo, los niveles de glutamato en plasma disminuidos se recuperaron con una cinética lenta análoga a la observada tras administración intravenosa de piruvato y oxaloacetato. La recuperación lenta es muy probablemente una función del aumento en la salida de glutamato desde los órganos periféricos hacia la sangre, en respuesta a la concentración disminuida de glutamato en plasma como resultado del intercambio de sangre o la hemodilución.

EJEMPLO 15

Efectos de la hemodilución sobre los niveles de glutamato

El ejemplo anterior reveló un cambio en las concentraciones de glutamato en los compartimentos de células hospedadoras de hasta un 20 %, en oposición a un cambio del 35 % en los niveles en el plasma. Se teorizó que la reducción en la concentración de glutamato era resultado de la unión rápida del glutamato plasmático a las células de la sangre del donante, así como a la dilución del glutamato en el plasma con el vehículo de Hetastarch.

Resultados – Para confirmar esta hipótesis, se evaluaron los niveles de hematocrito en el receptor, que representa el cociente entre el volumen celular y el volumen de plasma, por tanto, se evaluó la función de la dilución del plasma (Figura 17). También se llevó a cabo la determinación de la concentración de glutamato en sangre en ratas sometidas a hemodilución isovolémica, donde cada unidad de sangre extraída está sustituida por un volumen equivalente de Hetastarch al 6 %, (Figura 17). De manera interesante, el cambio en los niveles de hematocrito es mucho más pronunciado que los cambios en la concentración absoluta de glutamato en la sangre, lo que sugiere mejores mecanismos compensatorios para aumentar la salida de glutamato hacia la sangre desde varios órganos, compensando la dilución del glutamato en sangre.

EJEMPLO 16 (referencia)

Salida de glutamato desde el LIC del cerebro/LCS hacia la sangre

Materiales y métodos experimentales

Materiales - Glutamato, piruvato de sodio, oxaloacetato de sodio, NADH, lactato dehidrogenasa y malato dehidrogenasa se compraron a Sigma (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA). La glutamato dehidrogenasa se compró a Boehringer Mannheim (Roche diagnostics GmbH Mannheim, Alemania). [³H]Glu (42 Ci/mmol) se compró a Amersham (Amersham Biosciences Inc, Piscataway, NJ, USA).

Inyecciones intracerebroventriculares – Ratas Sprague-Dawley (250-300 g) se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de uretano (0,125 gramos/0,2 ml por 100 gramos de peso corporal). La cateterización de la vena de la cola (para inyectar fármaco) y de la vena femoral (para extracción de alícuotas de sangre) se realizó mediante el uso de conducciones de polietileno PE10 unidas a conducciones de polietileno PE50. Todos los catéteres se sujetaron con sutura 5-0 de seda y se lavaron con heparina (3-5 µl de 182 U/ml). Una cánula de acero A27G se implantó en el ventrículo lateral derecho usando las siguientes coordenadas estereotácticas: 0,8 mm posterior al bregma; lateral 1.4 mm; profundidad: 4 mm desde el cráneo o 3,5 mm desde la dura. Se inyectó disolución de [³H] glutamato en suero salino tamponado con fosfato (PBS) en el ventrículo lateral a través de la cánula implantada usando una jeringa Hamilton (25 µl) conectada al tubo de PE20 relleno con la disolución. Se inyectó un volumen total de 11 µl durante aproximadamente 2 minutos.

Para determinación de la radioactividad, muestras de sangre de 50 μ l se diluyeron en 500 μ l de H₂O y se añadieron a 16 ml de fluido de gammagrafía. Los cpms medidos se corrigieron para la inactivación rápida determinada comparando los cpms medidos en un volumen determinado de ³H] glutamato añadido a agua o a sangre diluida. La temperatura corporal se mantuvo con una lámpara y se controló la temperatura rectal. El pulso de la rata se controló mediante un sistema Periflux 500 una sonda láser Doppler colocada en el cráneo.

Las inyecciones intravenosas de piruvato y oxaloacetato diluidos en suero salino tamponado con fosfato (PBS) se llevaron a cabo a una velocidad de 0,05 ml/minute durante 30 min con una bomba Pharmacia P-1. Durante las inyecciones y en varios puntos temporales después de las inyecciones (en general, cada 15 min), se extrajeron alícuotas de 150 μ l de sangre de la vena femoral.

Medida de la concentración de glutamato – Se extrajeron alícuotas de 1 μ l en cada punto temporal y se centrifugaron a 1.300 x g durante 7 minutos. Se midió el volumen de sobrenadante (plasma) y se combinó con un volumen idéntico de ácido perclórico (PCA) 1M para precipitar las proteínas. La mezcla se dejó reposar 10 minutos sobre hielo y se centrifugó. El aglomerado celular (eritrocitos, linfocitos y plaquetas) se lisó por choque osmótico tras resuspensión en agua doblemente destilada hasta un volumen final de 150 μ l y se añadió un volumen idéntico de PCA 1 M. Las fracciones de plasma y células precipitadas mediante PCA se centrifugaron a 16.000 x g durante 10 minutos y los aglomerados se descartaron.

Se midió la concentración de glutamato en el sobrenadante de acuerdo con el procedimiento fluorométrico de Graham y Aprison (1996). Una alícuota de 20 μ l del sobrenadante de PCA se añadió a 480 μ l de tampón HG que contenía 15 u de glutamato dehidrogenasa en NAD 0,2 mM, glicina 0,3 M, hidrato de hidrazina al 2,4 % ajustado a pH 6,8 con H₂SO₄ 1 N. Tras incubación a temperatura ambiente durante 30-45 minutos, se midió la fluorescencia a 460 nm tras excitación a 350 nm. Se estableció una curva patrón de glutamato en un intervalo de concentraciones de glutamato de 0-6 μ M. Todas las mediciones de glutamato se realizaron por duplicado.

Resultados – En los ejemplos anteriores, la administración intravenosa de piruvato y oxaloacetato redujo los niveles de glutamato en la sangre del receptor, pero finalmente estos niveles aumentaron. Como resultado, se teorizó que los órganos periféricos proporcionaban una fuente de salida de glutamato, permitiendo la normalización de las concentraciones de glutamato en circulación. Para ensayar esta hipótesis, se investigó la salida de glutamato desde el líquido intersticial cerebral (LIC) o del líquido cerebroespinal (LCS) hacia la sangre, tras la administración intravenosa de piruvato y oxaloacetato.

Para realizar un seguimiento de los efectos de la reducción del glutamato plasmático sobre los niveles de glutamato en el cerebro, se utilizó un sistema experimental que empleaba glutamato radiomarcado inyectado en un ventrículo lateral, y la aparición de radioactividad en la sangre se controló en función del tiempo, en animales sometidos a agotamiento de los niveles de glutamato en circulación mediante la administración de oxaloacetato/piruvato. La aparición posterior de radioactividad asociada a la sangre es por tanto una función de la salida de glutamato del cerebro.

La cantidad de glutamato radiomarcado en la sangre tras la inyección intracerebroventricular se representa gráficamente en la Figura 18. La salida de glutamato radiomarcado hacia la circulación periférica es una función del tiempo, y se produce principalmente en dos fases. En la primera fase, la fase de distribución, la radioactividad aparece en la sangre en cuanto el [³H] glutamato se inyecta en el ventrículo lateral y aumenta linealmente durante 10 minutos, a una velocidad del 0,8 % \pm 0,1 (n=8) de la cantidad de radioactividad introducida en el cerebro por minuto. Esto corresponde a una semivida de eliminación de la radioactividad desde el cerebro de 62,5 \pm 7 min. En la segunda fase, la radioactividad de la sangre permanece constante durante al menos 40 minutos, análogamente en función de un estado estacionario alcanzado entre la velocidad de salida de [³H] glutamato desde el cerebro hacia la sangre y la velocidad de desaparición del [³H] glutamato desde la sangre.

De este modo, tras el agotamiento periférico del glutamato por la administración de oxaloacetato/piruvato, la normalización del nivel periférico del glutamato se produce mediante la salida del glutamato desde otros órganos, incluyendo el cerebro, como se pone de manifiesto en este ejemplo por la presencia de glutamato radiomarcado en circulación, anteriormente restringido al cerebro.

EJEMPLO 17

Medida el tiempo de vida del glutamato en sangre

La evaluación de la normalización del glutamato periférico después de la administración de oxaloacetato/piruvato es otro medio para determinar los factores implicados en la salida de glutamato desde los órganos periféricos como medio para normalizar la concentración de glutamato en circulación. Los métodos para establecer la velocidad de normalización pueden proporcionar, por tanto, una aplicación clínica cuando se tiene en cuenta un ciclo de tratamiento utilizando el protocolo sugerido en el presente documento.

Resultados – La normalización del glutamato se puede llevar a cabo estimando la velocidad de desaparición del $[^{14}\text{C}]$ glutamato de la sangre mediante la metodología detallada en el ejemplo anterior. Se llevó a cabo la administración de inyecciones intravenosas en bolo de glutamato radiomarcado $11 \mu\text{Ci}$ en ausencia o presencia de glutamato no radioactivo y se realizó un seguimiento con el tiempo de la presencia de radioactividad en la sangre (Figura 19).

La cinética obtenida para la aparición de niveles de radioactividad de $[^3\text{H}]$ glutamato en sangre tiene lugar en dos fases, una fase rápida que finaliza en menos de 60 segundos y que corresponde muy probablemente a la fase de distribución y una lenta que corresponde a la fase de eliminación. De acuerdo con ello, se puede calcular la semivida de eliminación del $[^3\text{H}]$ glutamato en sangre en 19,3 minutos (y una constante de velocidad de eliminación igual al $\ln 2 / 19,3 = 0,035 \text{ min}^{-1}$) para una concentración de glutamato en sangre normal de $209 \mu\text{M}$ $30 \text{ (SD; } n=34)$, y de este modo que $5,4 \text{ nmoles de glutamato/ml sangre se eliminan por minuto}$. La semivida de eliminación aumentó hasta $24,6 \text{ minutos}$ cuando el glutamato en sangre alcanzó una concentración de $3,4 \text{ mM}$ mediante administración intraperitoneal de $2 \text{ mmoles de glutamato}$. En estas condiciones, $69 \text{ nmoles glutamato/ml de sangre se eliminaron por minuto}$.

De este modo, la velocidad de eliminación del glutamato de la sangre aumenta aproximadamente en 13 veces por un aumento en 16 veces de la concentración de glutamato en sangre, lo que sugiere que las enzimas y transportadores implicados en la eliminación del glutamato no están saturados aún a $3,4 \text{ mM}$. El hecho de que el glutamato no radiactivo ralentiza la semivida de eliminación del $[^3\text{H}]$ glutamato sugiere que la radioactividad en sangre corresponde principalmente al $[^3\text{H}]$ glutamato no degradado y que el glutamato y el $[^3\text{H}]$ glutamato compiten por los mismos sitios de transporte en órganos que muestran una avidez por la captación de glutamato de la sangre tales como el músculo, riñón, intestino y pulmón (Hediger y Welbourn, 1999). De acuerdo con lo anterior, Hoyosa y col (1999) observaron indudablemente que el L-glutamato en el líquido intersticial del cerebro se transporta a través de la barrera hematoencefálica de forma intacta.

EJEMPLO 18

Salida de glutamato desde el cerebro hacia la sangre tras el tratamiento con oxaloacetato y piruvato

Otro medio de verificar las hipótesis anteriores, que los órganos periféricos proporcionan una fuente de salida de glutamato, permitiendo la normalización de las concentraciones de glutamato en circulación, se puede llevar a cabo mediante la medida directa del potencial de un órgano para movilizar el glutamato.

Resultados – Para corroborar adicionalmente las hipótesis propuestas, se llevó a cabo un seguimiento de la inyección intracerebroventricular de glutamato radiomarcado ($11 \mu\text{Ci}$ de $[^3\text{H}]\text{Glu}$) y se midió el porcentaje de absorción del glutamato antes y después de la administración intravenosa de piruvato y oxaloacetato.

Como se muestra en la Figura 20, los cambios en la radioactividad de la sangre que se originan desde el cerebro presentan una imagen casi especular del Glu en sangre. Mientras el último disminuye en aproximadamente un 50 % durante la administración de piruvato y oxaloacetato y después aumenta, la radioactividad en sangre aumenta en aproximadamente un 40 % y después disminuye.

Por tanto, es evidente que los niveles de glutamato disminuidos en la sangre ocasiona una salida del $[^3\text{H}]$ glutamato desde el cerebro hacia la sangre como medio de conseguir la normalización de los niveles de glutamato en sangre.

Como resultado de estos estudios, los niveles de glutamato en sangre (un reflejo de la concentración de $[^3\text{H}]$ glutamato, determinada a partir de la Figura 19) se pueden representar gráficamente en función del tiempo (Figura 21), y se puede calcular la salida de glutamato específica del cerebro, de acuerdo con la ecuación I:

$$C_t = C_0 - (R_t - R_{(t-Dt)})e^{-K(t-Dt)} \quad (I)$$

donde C_t = cantidad de $[^3\text{H}]$ glutamato que queda en el cerebro a tiempo t ; C_0 = cantidad de $[^3\text{H}]$ glutamato en el cerebro a tiempo $t = 0$; R_t = cantidad de $[^3\text{H}]$ glutamato en sangre a tiempo t ; $R_{(t-Dt)}$ = cantidad de $[^3\text{H}]$ glutamato que queda en sangre a tiempo $t-Dt$; K = constante de velocidad de eliminación de $[^3\text{H}]$ glutamato en sangre ($=\ln 2 / \text{semivida de eliminación de } [^3\text{H}] \text{ glutamato en sangre}$); de este modo, $(R_t - R_{(t-Dt)})e^{-K(t-Dt)}$ = liberación neta de $[^3\text{H}]$ glutamato desde el cerebro durante el intervalo de tiempo Dt .

Es evidente de la Figura 21 que a después de los primeros 10 minutos, el nivel de $[^3\text{H}]$ glutamato en el cerebro disminuye en tres fases. Inmediatamente antes y después de la administración de piruvato y oxaloacetato, las semividas de residencia de $[^3\text{H}]$ glutamato en el cerebro corresponde a 201 minutos y 199 minutos, respectivamente. Durante la administración de los sustratos de GPT/GOT la semivida de residencia de $[^3\text{H}]$ glutamato en el cerebro corresponde a 153 minutos. De este modo, la administración de los sustratos de GPT/GOT, que causa una

disminución en los niveles de glutamato en circulación, da como resultado una disminución en el tiempo de residencia del [³H] glutamato en el cerebro, de este modo respalda una salida acelerada de glutamato desde el cerebro hacia la sangre.

- 5 Un medio alternativo de evaluar la salida de glutamato desde el cerebro hacia la sangre es calcular una velocidad fraccional de la liberación de [³H] glutamato (F) de acuerdo con la ecuación II:

$$F = (R_t - R_{(t-Dt)})e^{-K(t-Dt)} / C_{(t-Dt)} \quad (II)$$

- 10 donde $C_{(t-Dt)}$ = cantidad de [³H] glutamato remanente en el cerebro a tiempo t-Dt

Esta velocidad fraccional se puede obtener antes de, durante y después de la administración de piruvato y oxaloacetato (Figura 22). Consistente con los datos obtenidos del cálculo de la salida, los valores F obtenidos indicaron una velocidad de liberación de glutamato marcadamente aumentada (50 %) por la administración intravenosa de piruvato y oxaloacetato que, tras su eliminación, indica una velocidad que vuelve a la velocidad anterior a la administración de sustrato. El aumento de la velocidad desaparece cuando se inyecta [³H] glutamato en una disolución que contiene glutamato no radioactivo (5 mM), lo que indica que la salida de glutamato desde el cerebro hacia la sangre es saturable (no se muestran los datos).

20 De este modo, además de verificar la salida de glutamato desde el cerebro hacia la circulación periférica, en respuesta a una disminución en los niveles de glutamato en el plasma, se puede determinar una velocidad de salida, para una evaluación precisa de la salida de glutamato.

EJEMPLO 19

25

Medida de la salida de glutamato desde el cerebro hacia la sangre con un modelo de perfusión

Materiales y métodos experimentales

30 **Perfusión Ventriculo-cisternal** – La perfusión se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Davson y col (1982) J. Neurobiol. 13:293-318. En resumen, se colocaron cánulas (27G) en los dos ventrículos laterales. Las cánulas implantadas en los ventrículos laterales se conectaron a una conducción de polietileno PE10 conectada a jeringas de 5 ml impulsadas por un equipo de bomba de infusión Harvard. La bomba se configuró para liberar 26 μl/minuto de [³H] glutamato en un líquido cerebroespinal (LCS) artificial (NaCl 122 mM, NaHCO₃ 25 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,4 mM; MgCl₂ 1,2 mM, K₂HPO₄ 0,4 mM; HEPES 10 mM, glucosa 10 mM, pH 7,42). Cada jeringa contenía 4 ml de LCS artificial, [³H] glutamato 0,2 μM y, cuando fue necesario, varias cantidades de glutamato no radioactivo.

35 **Resultados** – Otro medio de verificar si la reducción en los niveles de glutamato ocasiona cambios en las concentraciones de glutamato en el cerebro es mediante experimentos que utilizan la perfusión ventriculo-cisternal de [³H] para medir la eliminación de glutamato radiomarcado del fluido perfundido. En este paradigma, una disolución conteniendo [³H]Glu se perfunde de manera continua a través de cápsulas implantadas en los vehículos laterales y se recoge a medida que sale de una cánula implantada en la cisterna magna. El cociente [R] entre la radiactividad de entrada por unidad de volumen y la de salida proporciona un índice del porcentaje de [³H]Glu absorbido del líquido perfundido. La absorción se debe a la difusión de [³H]Glu a los líquidos cerebroespinal e intersticial del cerebro y a su captación en los compartimentos celulares mediante los transportadores de Glu presentes en las células epiteliales del plexo coroideo y los asociados con las membranas antiluminales de las células endoteliales de los capilares cerebrales.

40 La Figura 24 ilustra que la perfusión ventriculo-cisternal de una disolución de Glu 30 μM que contiene 0,2 μCi [³H]Glu/ml conduce a una absorción estacionaria de aproximadamente 36±5 % que aumenta hasta un 43,7±3 % (p=0,035) tras la administración intravenosa de piruvato y oxaloacetato y vuelve a disminuir al nivel de absorción inicial tras finalizar la infusión de piruvato y oxaloacetato. De este modo, la absorción de Glu radioactivo desde el fluido de perfusión aumenta a la vez que disminuyen los niveles de Glu en sangre. Cuando la perfusión se lleva a cabo con una disolución que contiene Glu 250 μM y 0,2 μCi [³H]Glu /ml, la absorción de [³H]Glu disminuye hasta un estado estacionario de 30,8±0,5 % debido a la competición por los sitios de absorción en el cerebro con el Glu no marcado. Ras la inyección intravenosa de piruvato y oxaloacetato, la absorción de Glu radioactivo desde el líquido de perfusión aumenta ligeramente hasta un estado estacionario aparente de 33,8±0,9 % ya que parte del Glu no marcado en competencia se bombea hacia la sangre disminuyendo de esta forma la competición con [³H]Glu por la captación de los diferentes transportadores de Glu.

50 En la medida que la absorción de glutamato desde el fluido de perfusión por los transportadores individuales es desconocida, se anticipa que la absorción del transportador aumentaría si la salida desde el cerebro hacia la sangre se acelerara.

De este modo, existe un medio adicional para evaluar las respuestas de normalización a niveles de glutamato en circulación reducidos, el de medir la absorción de glutamato radiomarcado a partir de ventrículos cerebrales perfundidos. Un mecanismo propuesto mediante el cual se puede llevar a cabo la salida desde el cerebro hacia la sangre mediante la captación directa del transportador cerebral queda respaldado por el presente hallazgo que, en el cerebro perfundido, la adición de oxaloacetato/piruvato estimula un aumento de la absorción de producto radiomarcado desde el fluido de perfusión, como medio de movilizar el glutamato desde el cerebro, finalmente hasta la circulación periférica.

EJEMPLO 20

Salida de glutamato del cerebro desde LIC/LCS hacia la sangre y mecanismo de acción potencial

Materiales y métodos experimentales

Recogida de LCS – Las cánulas (27G) se colocaron en la cisterna magna conectadas a conducciones PE10 manteniendo su salida 17,5 cm por debajo de la línea auricular. Tras la infusión en el ventrículo lateral, el fluido que sale de la cisterna se recogió en función del tiempo. Las restantes metodologías son como se han descrito en el Ejemplo 19, y en los Ejemplos anteriores.

Resultados – Así, otro medio para verificar si la reducción en los niveles de glutamato en sangre realiza cambios en la concentración de glutamato del cerebro es mediante experimentos que controlen el nivel de los niveles de glutamato radiomarcado en el líquido cerebroespinal (LCS) tras la administración de piruvato/oxaloacetato, reducción del glutamato plasmático (Figura 25). La administración intravenosa de los cosustratos de GOT/GPT redujo drásticamente el glutamato en LIC/LCS, tal como se determina analizando alícuotas de LCS recogidas de cánulas implantadas en la cisterna magna, antes, durante y después de la administración intravenosa de piruvato y oxaloacetato. Los niveles de glutamato en el LCS se determinaron según los métodos descritos en Kato y col. (1973) Anal. Biochem. 53:86-97. En condiciones experimentales que causaron una disminución del 50 % en los niveles de glutamato en sangre (Figura 24), se observe una disminución paralela en los niveles de glutamato en el LCS.

De este modo se proporciona evidencia adicional que atestigua una salida del glutamato contenido en el LCS hacia la sangre, en respuesta a los niveles de glutamato reducidos en circulación, como resultado de la administración de los cosustratos de GOT/GPT.

Puesto que el mecanismo exacto mediante el cual piruvato y oxaloacetato producen una salida desde el cerebro hacia la sangre potenciada de Glu, se puede proponer fácilmente una, de acuerdo con la siguiente evidencia experimental (Figura 26). En acuerdo parcial con los modelos propuestos por Lee y col. (2001) J. Neurosci. 21:RC171 y O'Kane y col. (1999) J. Biol. Chem. 274:31891-5, los transportadores de glutamato y glutamina dependientes del Na^+ están presentes en la membrana antiluminal (cara orientada hacia el cerebro) de las células endoteliales de los capilares cerebrales, mientras que sistemas facilitadores de estos aminoácidos está ubicados en la membrana luminal (cara orientada hacia la sangre). Impulsados por un fuerte gradiente de Na^+ , los transportadores capturan y concentran el glutamato y la glutamina procedente del LIC cerebral hacia el interior de las células endoteliales. Una glutaminasa dependiente de fosfato presente en el interior de las células endoteliales hidroliza la glutamina a glutamato y amoníaco, creando de esta manera una concentración intracelular de glutamato mayor a la existente en el plasma. Los portadores facilitadores del glutamato en la membrana luminal facilitan a continuación el tránsito del glutamato desde las células endoteliales al plasma, a favor de un gradiente electroquímico.

Existe, sin embargo, un proceso adicional mediante el cual los transportadores de glutamato saturados de glutamato intracelular se activan mediante los iones Na^+ intracelulares y permiten la movilización inversa del glutamato y los iones Na^+ hacia el LIC. Este proceso de "bombeo inverso" funciona de manera concertada con la acción de las Na^+/K^+ ATPasa para prevenir la acumulación de los iones Na^+ intracelulares. La reducción en los niveles de glutamato en sangre aumenta el gradiente de glutamato, acelerando la salida del glutamato desde las células endoteliales hacia el plasma. Cuando los transportadores del glutamato dejan de estar saturados con el glutamato de las células intraendoteliales, el proceso de "bombeo inverso" disminuye en gran medida, y aumenta la entrada neta de glutamato desde el LIC a las células endoteliales.

EJEMPLO 21

Conversión de dietiloxaloacetato en oxaloacetato y sus efectos sobre los niveles de glutamato

Los ejemplos anteriores han ilustrado la factibilidad de utilizar la administración de oxaloacetato/piruvato en un escenario clínico como medio de disminuir la concentración de glutamato *in vivo* en el órgano, en virtud de la salida de glutamato desde los órganos deseados hacia la circulación periférica, como consecuencia de la reducción del glutamato en circulación mediada por oxaloacetato/piruvato.

El ácido oxaloacético es un cetoácido carboxílico fácilmente soluble en agua. La acidez del ácido oxaloacético necesita, sin embargo, una valoración completa de sus restos carboxilo con hidróxido de sodio para obtener soluciones a pH neutro. De este modo, se necesitan al menos dos iones sodios por molécula de ácido oxaloacético. Puesto que el ácido oxaloacético posiblemente ejerce su efecto terapéutico a concentraciones relativamente elevadas, el ion sodio acompañante representa una carga de electrolito posiblemente inaceptable para una aplicación clínica segura.

El uso de un profármaco de oxaloacetato, que tras su administración *in vivo* se convierte a oxaloacetato, puede resolver este problema. De este modo, el dietil éster de oxaloacetato comercial (Figura 27B) se consideró en este contexto. Se investigó la conversión del dietil éster de oxaloacetato en oxaloacetato tras incubación con homogenatos de tejido derivados de hígado, colon, íleon, yeyuno y duodeno de rata. La conversión del dietil éster de oxaloacetato en oxaloacetato se realiza presuntamente mediante la acción de esterasas específicas presentes en diferentes homogenatos de tejido, y por tanto refleja el destino *in vivo* del dietil éster de oxaloacetato tras su inyección.

Resultados - La conversión del dietil éster de oxaloacetato en oxaloacetato se determinó en muestras de sangre de rata. La Figura 29B muestra que, aunque los niveles iniciales de oxaloacetato en sangre disminuyeron en un 40 % durante un plazo de 24 horas, un aumento significativo del 240 % fue evidente tras incubación en presencia de dietiloxaloacetato 10 mM .

Posteriormente se evaluó el efecto del dietil éster de oxaloacetato sobre los niveles de glutamato. Los niveles de glutamato se determinaron en muestras de sangre de rata tras incubación en ausencia o presencia de niveles de glutamato 10 mM. Como se muestra en la Figura 28, aunque los niveles de glutamato en sangre aumentaron de manera constante, la adición de dietil éster de oxaloacetato no afectó los niveles de glutamato en sangre. De manera interesante, los niveles de glutamato en plasma de sangre de rata se vieron significativamente afectados por la presencia de dietil éster de oxaloacetato. La Figura 30 muestra un aumento significativo del glutamato plasmático a las 9 horas de incubación con dietil éster de oxaloacetato. La Figura 31 representa la cantidad de glutamato plasmático convertido probablemente en α -cetoglutaratato tras la activación de GOT en función del tiempo por la presencia de dietil éster de oxaloacetato 10 mM.

La incubación del hígado y secciones de mucosa de intestino de rata con dietil éster de oxaloacetato 10 mM reveló un aumento de 400 % en los niveles iniciales de oxaloacetato a los 15 minutos, indicando que el dietil éster de oxaloacetato es un sustrato para las esterasas del hígado y del intestino y que se convierte *in vivo* en oxaloacetato (Figura 29A).

De este modo, el dietil éster de oxaloacetato sometido a las esterasas plasmáticas se convierte en oxaloacetato que actúa a continuación como cosustrato de la glutamato-oxaloacetato transaminasa plasmática, disminuyendo los niveles de glutamato en plasma que es un indicador adicional de que el dietil éster de oxaloacetato (u otro derivado de oxaloacetato modificado de manera artificial que se puede convertir *in vivo* en oxaloacetato) es un profármaco de oxaloacetato viable y terapéutico con una enorme aplicación clínica.

EJEMPLO 22

Entrada de análogos de piruvato y oxaloacetato en la conversión a glutamato en plasma de sangre de rata

Numerosos cofactores están disponibles para la reacción de transaminación mediada por las enzimas modificadoras de glutamato (por ejemplo, GOT, GPT).

Numerosas enzimas modificadoras de glutamato se analizaron para determinar su capacidad para potenciar la conversión del glutamato en plasma de sangre de rata. La Tabla 1 siguiente resume los resultados obtenidos con 1 mM de cada cosustrato.

Tabla 1

Compuesto	% de glutamato remanente
α -Cetobutirato	97
Semialdehido succínico	78
Glioxolato	74
α -Isocaproato	83
β -Hidroxipiruvato	74
β -Fenilpiruvato	76
Piruvato	59
Oxaloacetato	34
Piruvato + Oxaloacetato	24
Piruvato + α -Cetobutirato	52
Oxaloacetato + α -Cetobutirato	20

Como es evidente de la Tabla 1, ninguno de los cofactores ensayados medió una degradación del glutamato mayor a la generada por piruvato u oxaloacetato a la misma concentración de 1 mM. Estos resultados fueron respaldados adicionalmente por un experimento de respuesta a la dosis. La Figura 33 muestra que aunque oxaloacetato 0,5 mM medió una disminución significativa en los niveles de glutamato en plasma (es decir, 40 %), una concentración equivalente de α -cetobutirato no tuvo efecto sobre el glutamato en plasma de rata. Sin embargo, una concentración mayor (es decir, 2 mM) de α -cetobutirato podría respaldar la degradación de glutamato del 40 % comparado con los niveles de glutamato iniciales en plasma de rata.

5

10 Un experimento adicional de respuesta a la dosis se llevó a cabo para determinar una contribución aditiva α -cetobutirato en la conversión de glutamato mediada por oxaloacetato. Como se muestra en la Figura 34, α -cetobutirato medió una conversión potenciada de glutamato en presencia de oxaloacetato 0,25 mM.

Estos resultados sugieren que una concentración menor de oxaloacetato se puede usar junto con un máximo de α -cetobutirato 0,5 mM para reducir los niveles de glutamato evitando los efectos tóxicos del primero.

15

REIVINDICACIONES

1. Glutamato piruvato transaminasa (GPT) y piruvato para su uso en el tratamiento de una dolencia médica asociada con niveles de glutamato extracelular elevados en el cerebro seleccionada del grupo constituido por anoxia cerebral, isquemia cerebral, ictus, lesión cerebral perinatal, lesión cerebral traumática, meningitis bacteriana, hemorragia subaracnoidea, migraña, estrés, choque hemorrágico, epilepsia, insuficiencia hepática aguda, glaucoma, VIH, demencia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), dolencias espásticas, cirugía a corazón abierto, cirugía de aneurisma, injerto con derivación en la arteria coronaria y enfermedad de Alzheimer y donde dicha GPT se formula para su administración parenteral.
2. Glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT) para su uso en el tratamiento de una dolencia médica asociada con niveles de glutamato extracelular elevados en el cerebro seleccionada del grupo constituido por anoxia cerebral, isquemia cerebral, ictus, lesión cerebral perinatal, lesión cerebral traumática, meningitis bacteriana, hemorragia subaracnoidea, migraña, estrés, choque hemorrágico, epilepsia, insuficiencia hepática aguda, glaucoma, VIH, demencia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), dolencias espásticas, cirugía a corazón abierto, cirugía de aneurisma, injerto con derivación en la arteria coronaria y enfermedad de Alzheimer y donde dicha GOT se formula para su administración parenteral.
3. El uso de la reivindicación 2, que comprende además oxaloacetato.
4. Un artículo de fabricación que comprende material de envasado que envasa una transaminasa modificadora de glutamato seleccionada del grupo constituido por glutamato piruvato transaminasa (GPT) y glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT) y un cofactor de dicha transaminasa para su uso en el tratamiento de una dolencia médica asociada con niveles de glutamato extracelular elevados en el cerebro, estando dicha dolencia médica seleccionada del grupo constituido por anoxia cerebral, isquemia cerebral, ictus, lesión cerebral perinatal, lesión cerebral traumática, meningitis bacteriana, hemorragia subaracnoidea, migraña, estrés, choque hemorrágico, epilepsia, insuficiencia hepática aguda, glaucoma, VIH, demencia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), dolencias espásticas, cirugía a corazón abierto, cirugía de aneurisma, injerto con derivación en la arteria coronaria y enfermedad de Alzheimer, donde dicha transaminasa comprende glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT), dicho cofactor comprende oxaloacetato, y cuando dicha transaminasa comprende glutamato piruvato transaminasa (GPT), dicho cofactor comprende piruvato y además donde dicha transaminasa modificadora de glutamato se formula para su administración parenteral.
5. El uso de la reivindicación 1 o 2 o artículo de fabricación de la reivindicación 4, donde dicha administración parenteral comprende la administración intravenosa o subcutánea

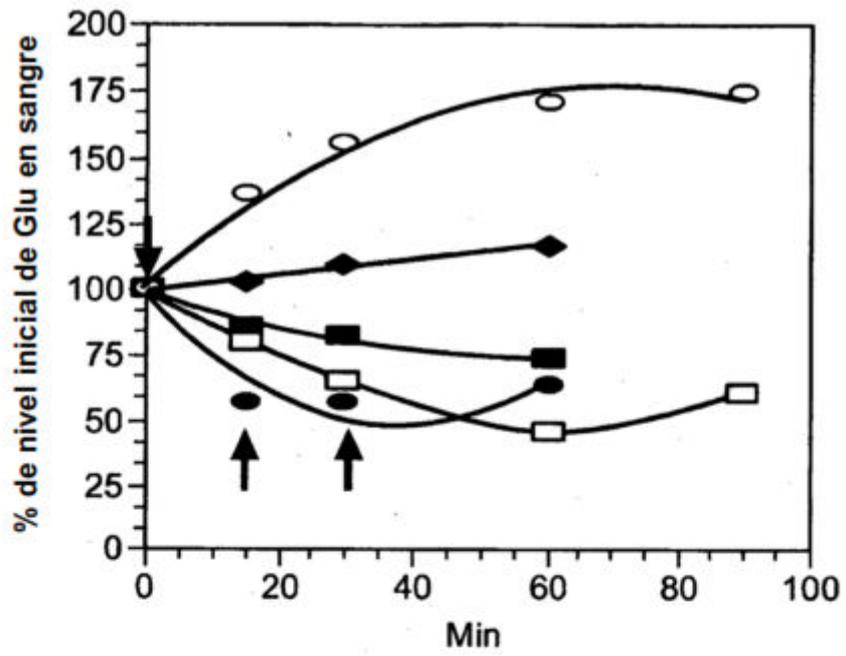


Fig. 1a

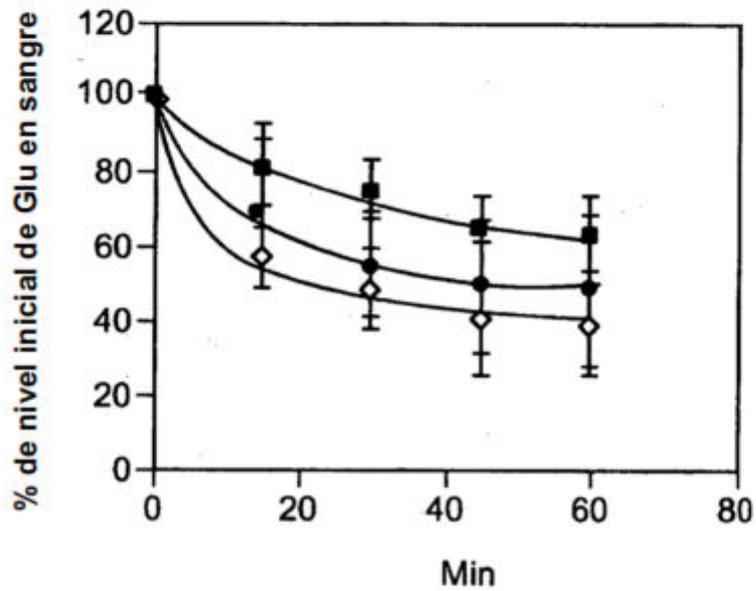


Fig. 1b

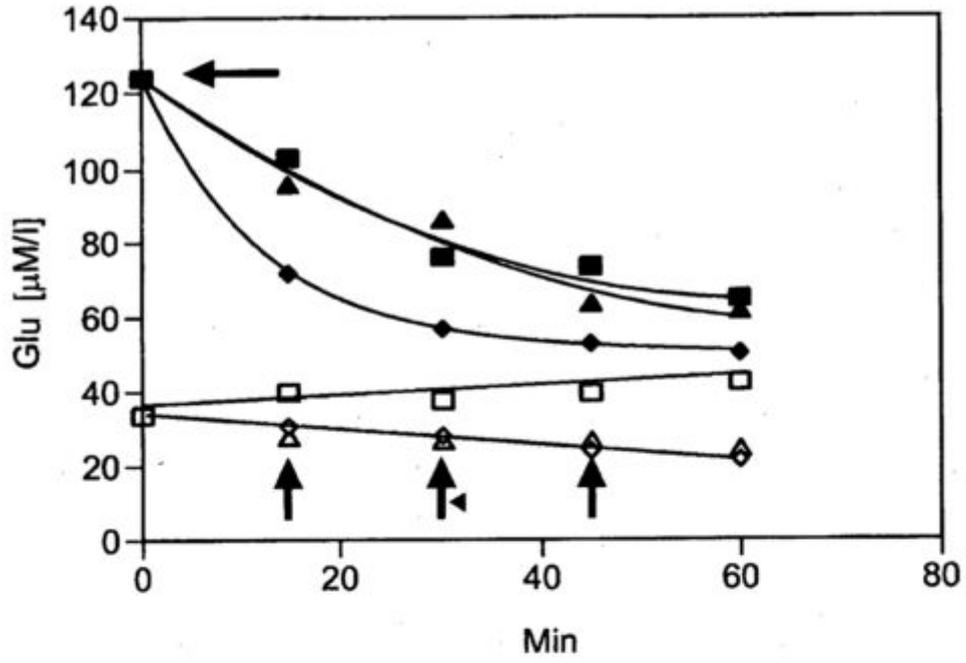


Fig. 2a

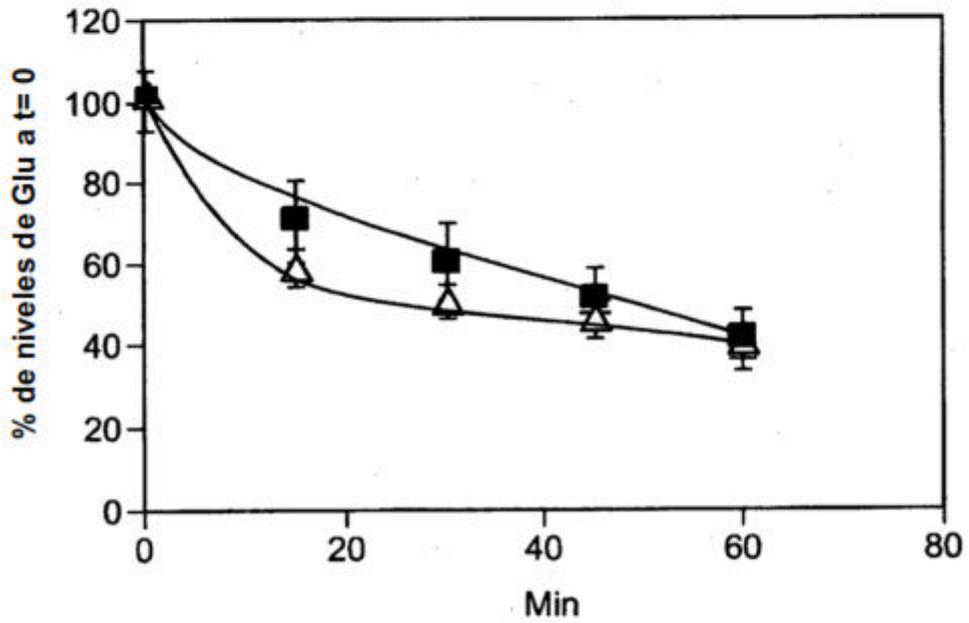


Fig. 2b

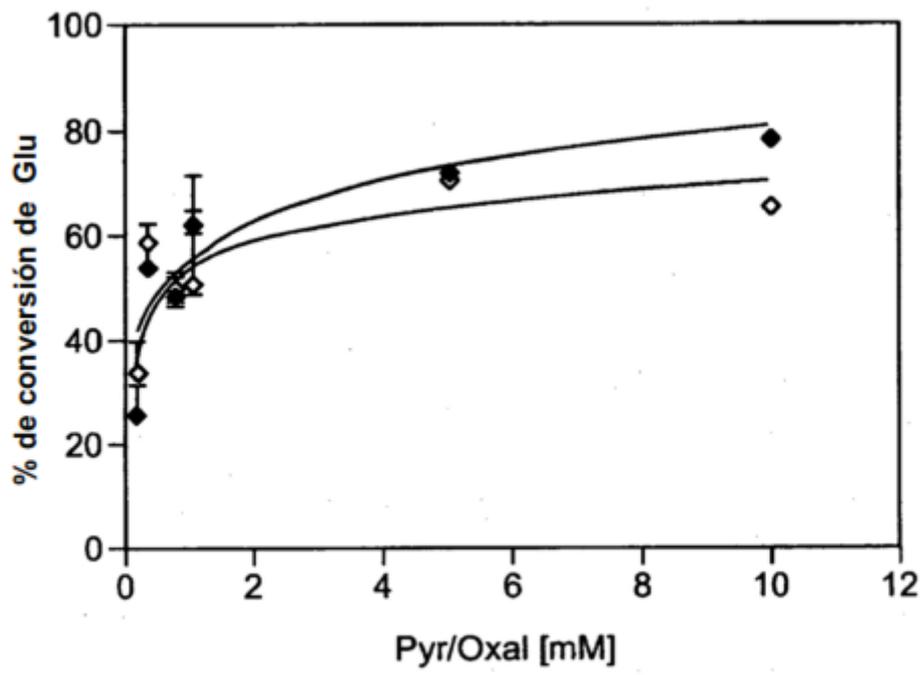


Fig. 3

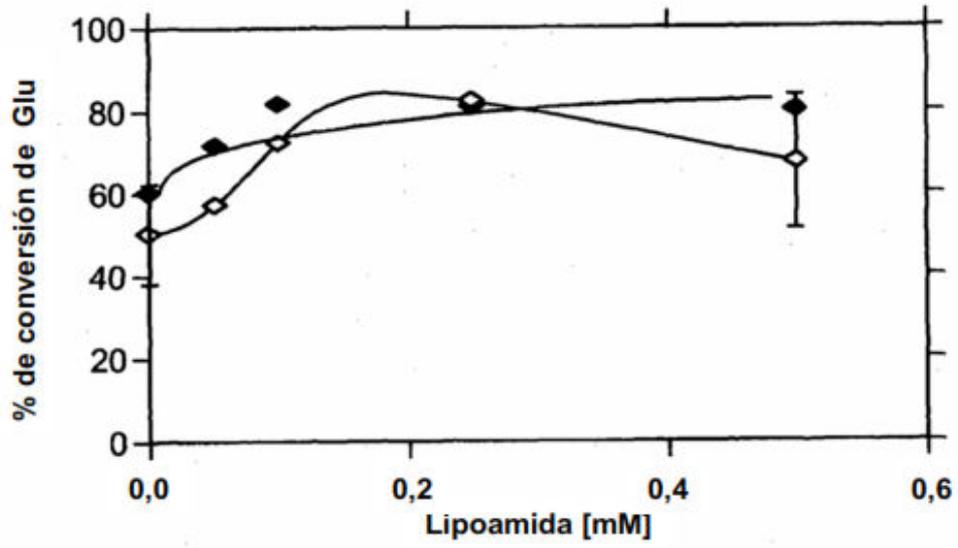


Fig. 4a

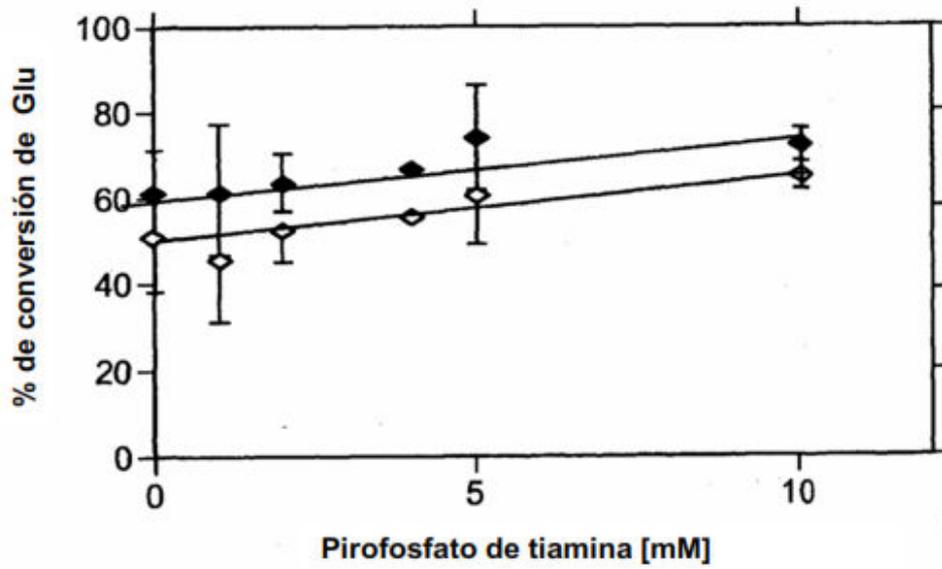


Fig. 4b

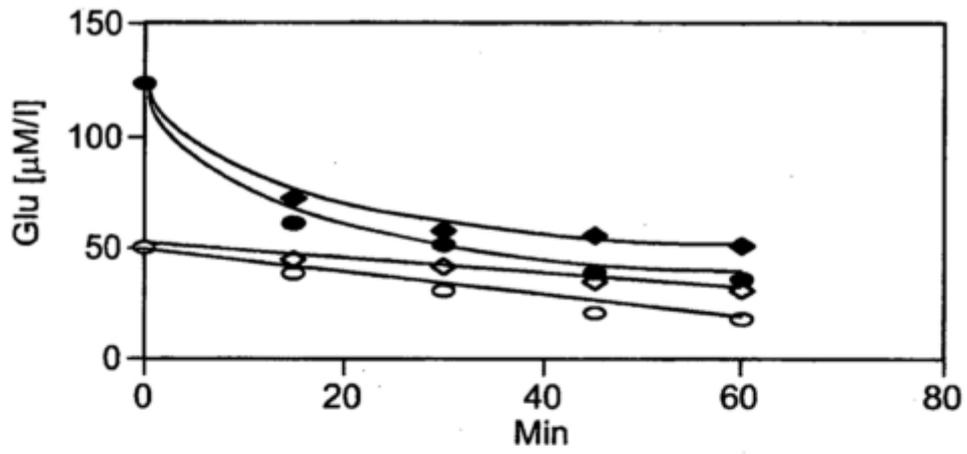


Fig. 5a

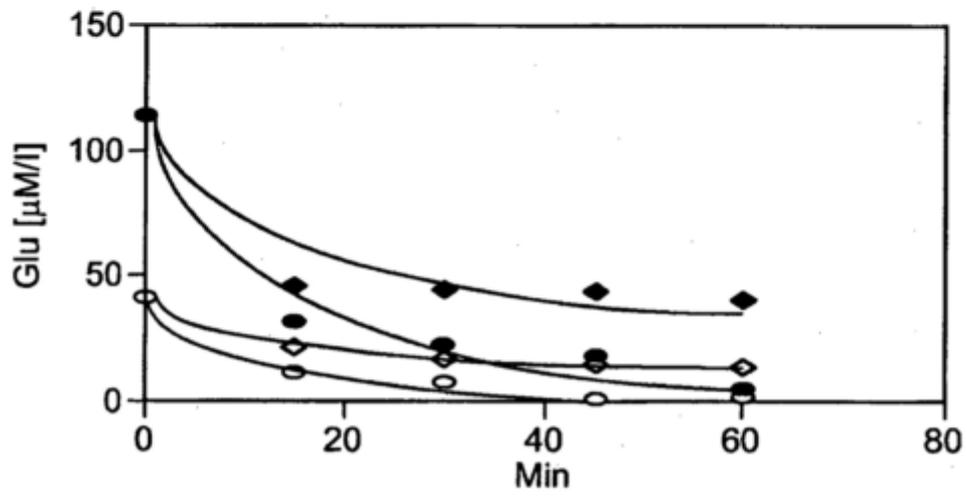


Fig. 5b

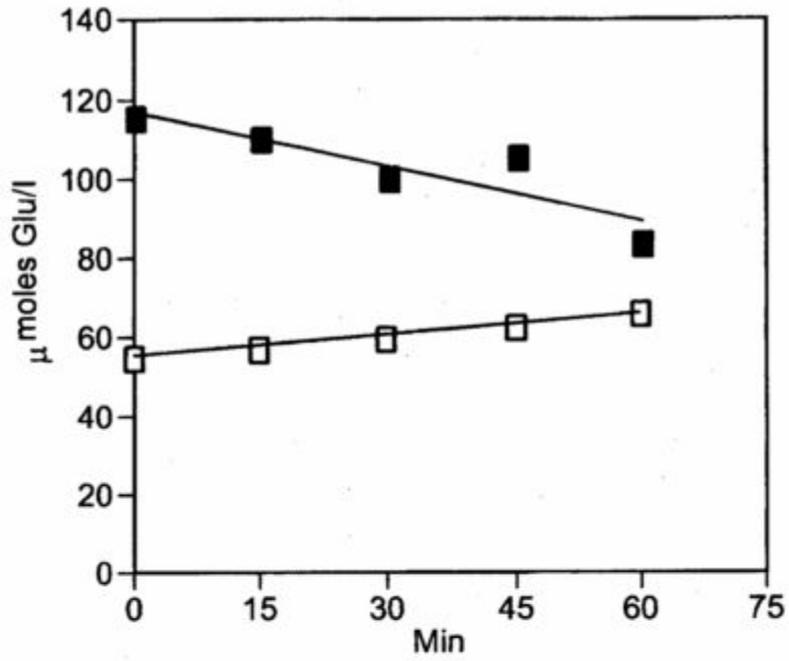


Fig. 6

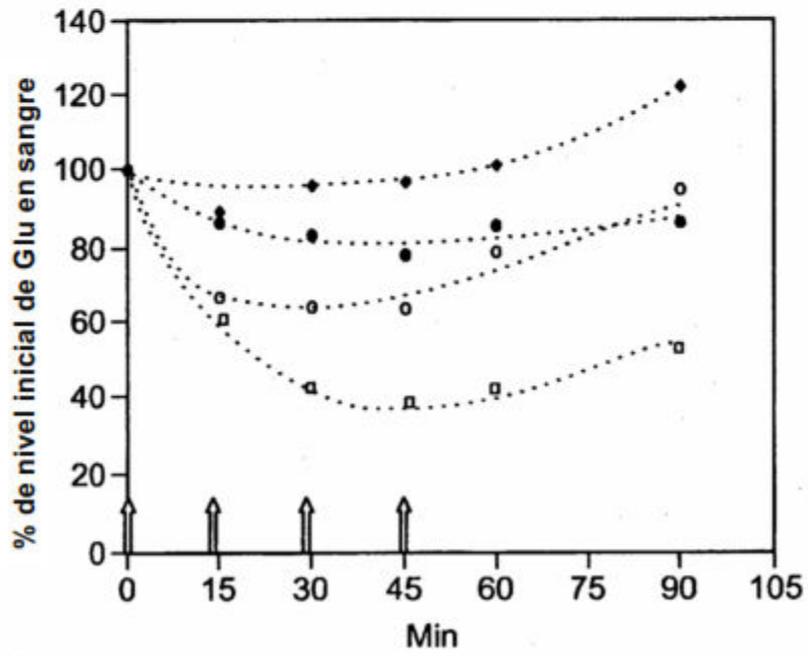


Fig. 7

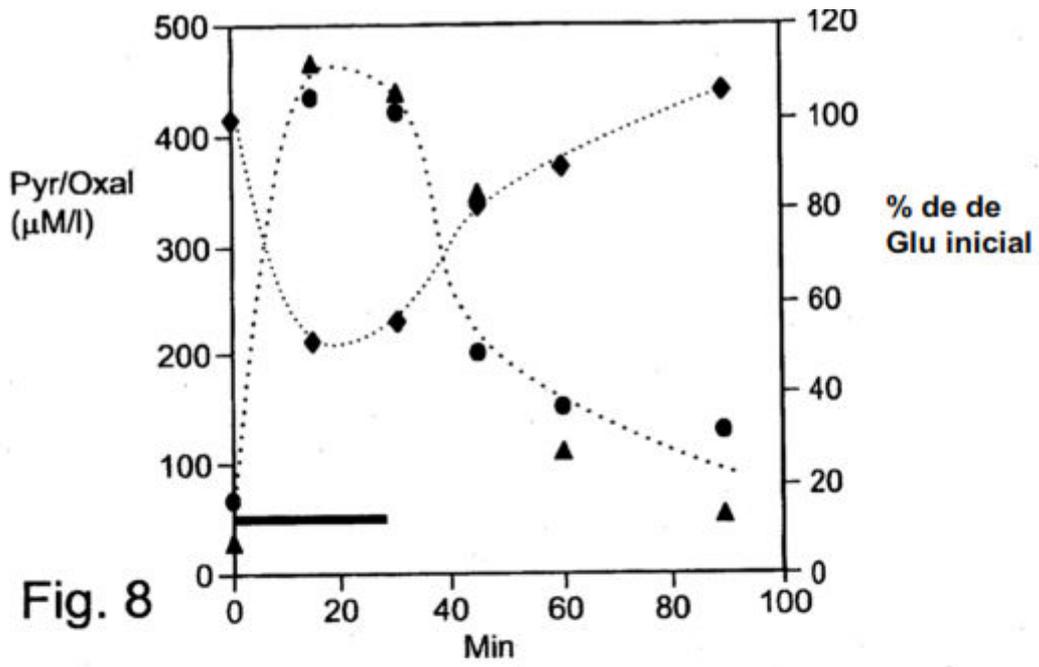


Fig. 8

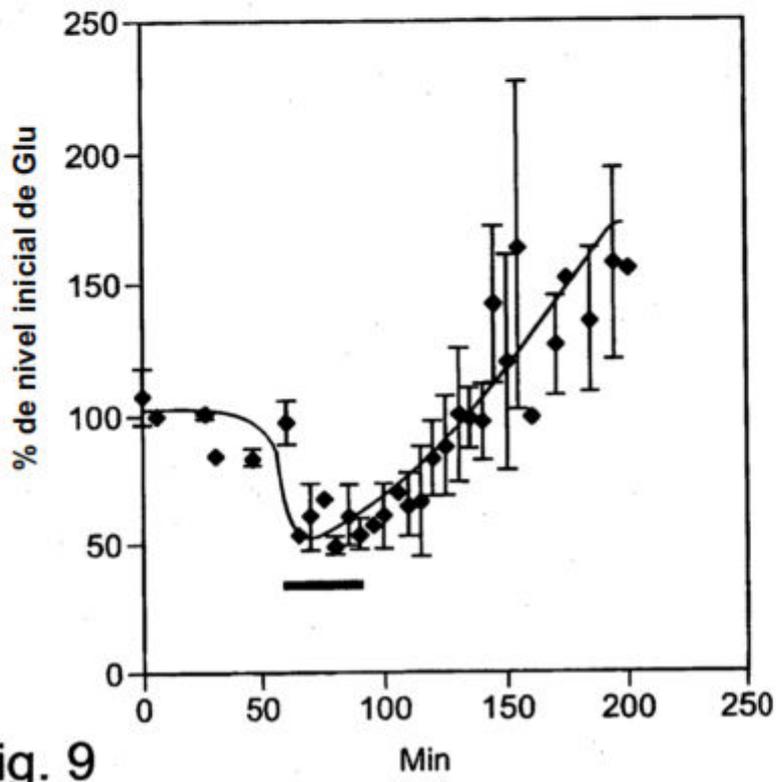


Fig. 9

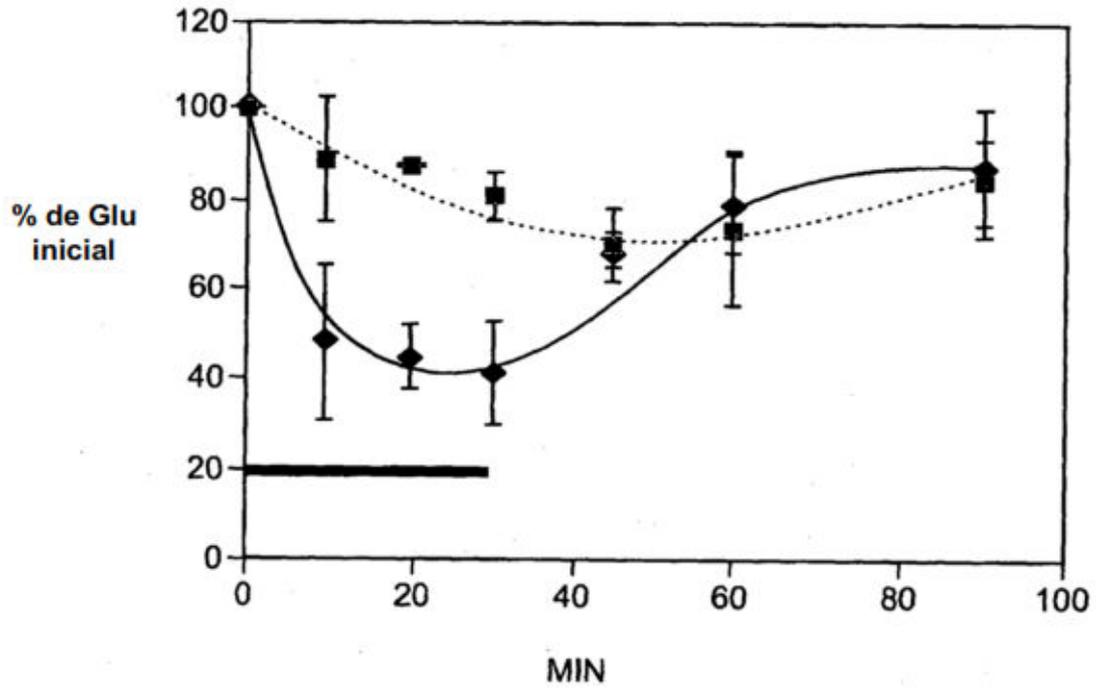


Fig. 10

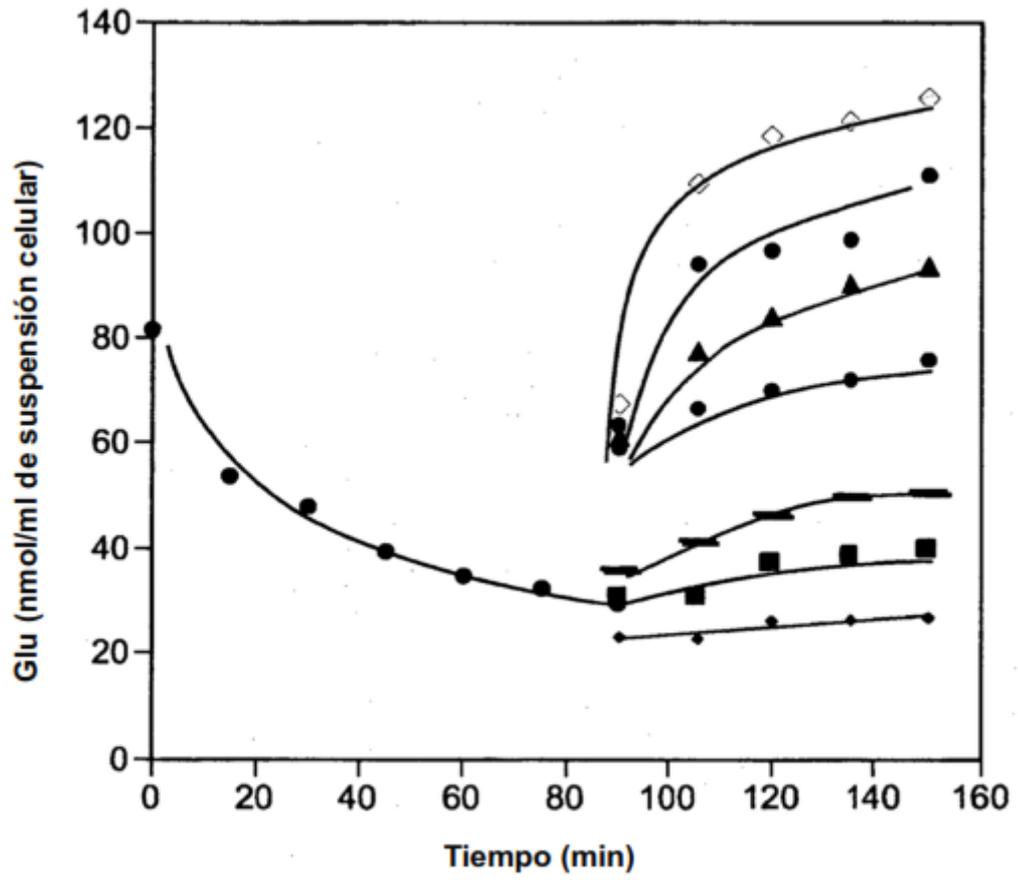


Fig. 11

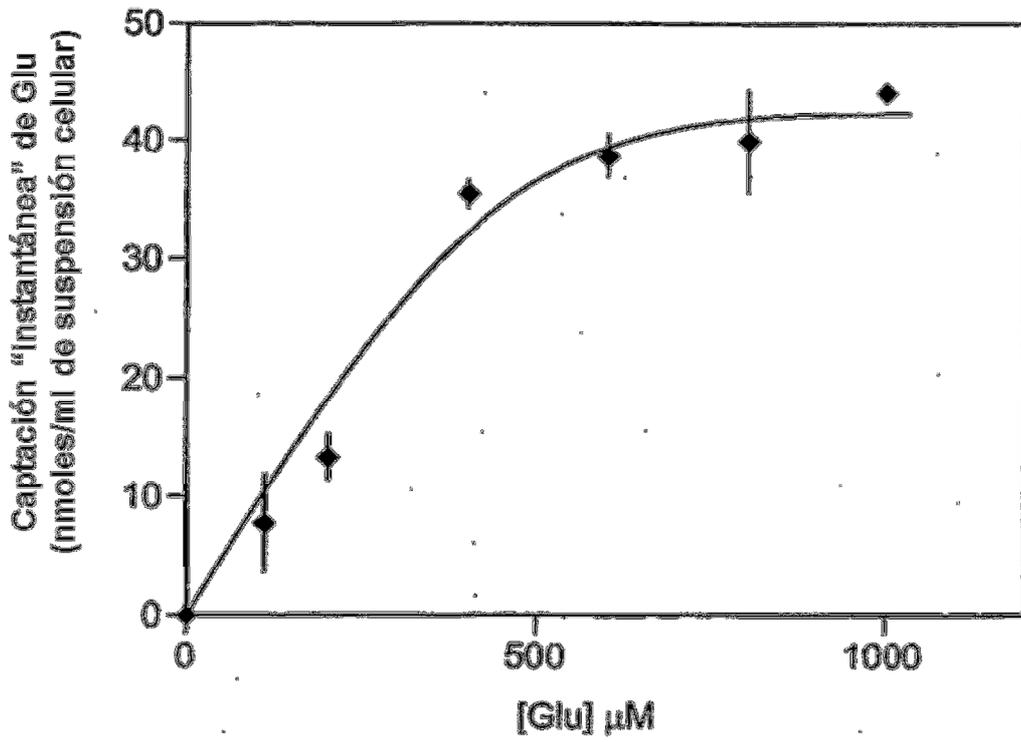


Fig. 12

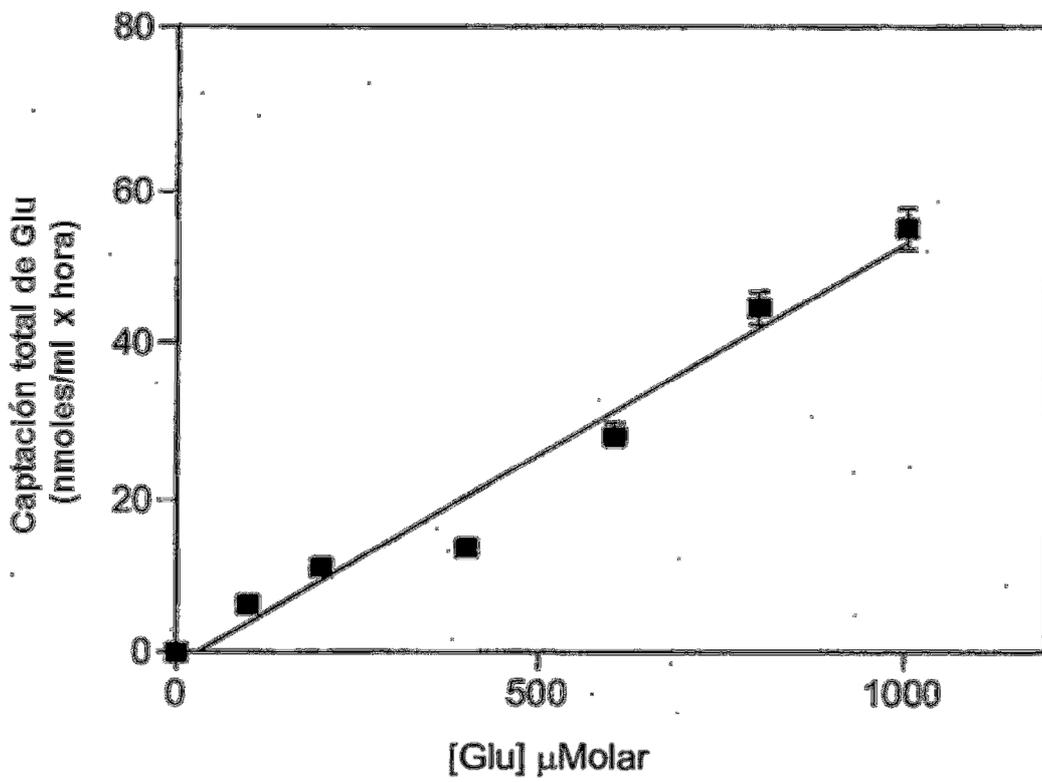


Fig. 13

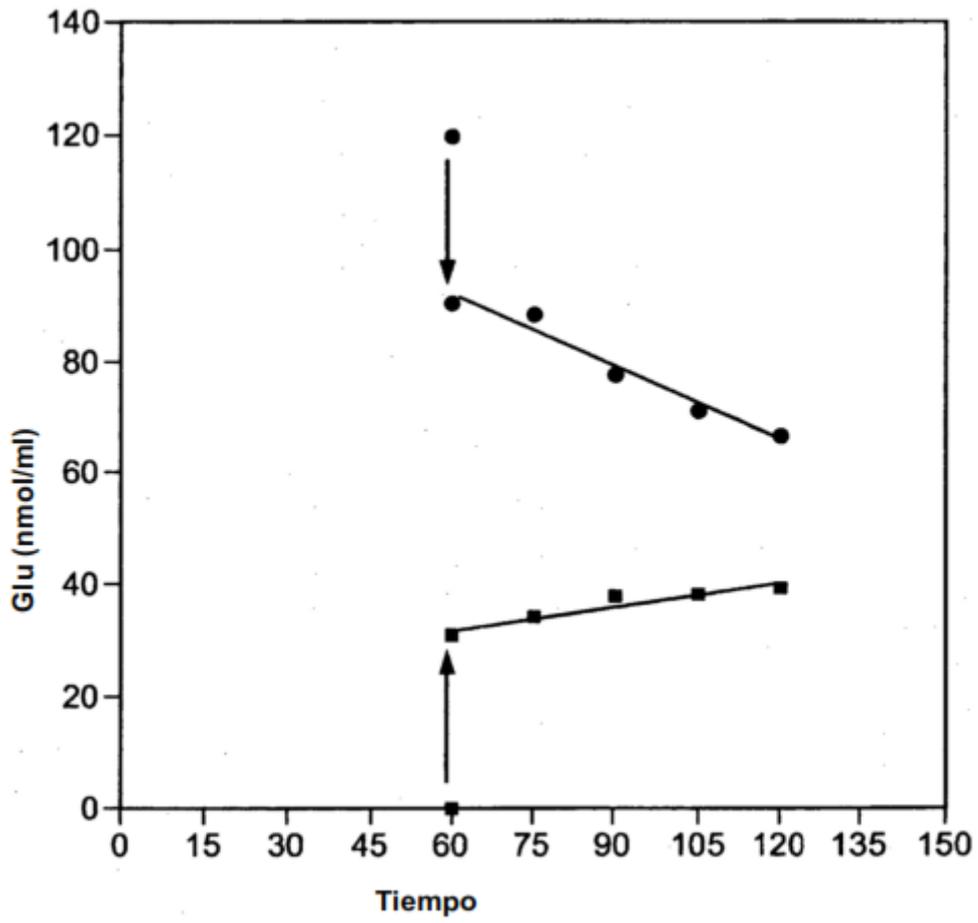


Fig. 14

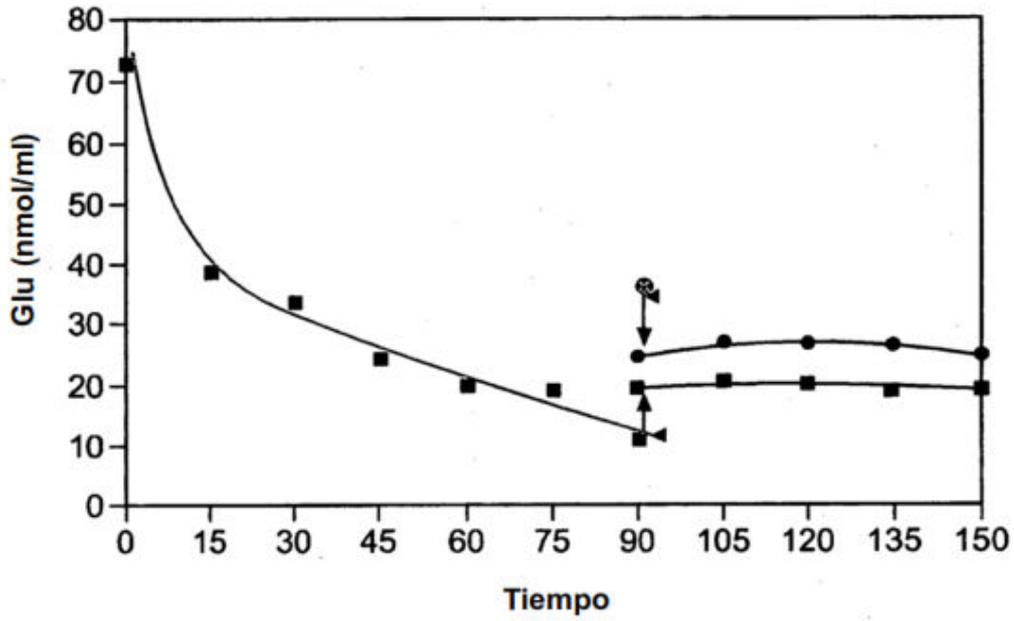


Fig. 15

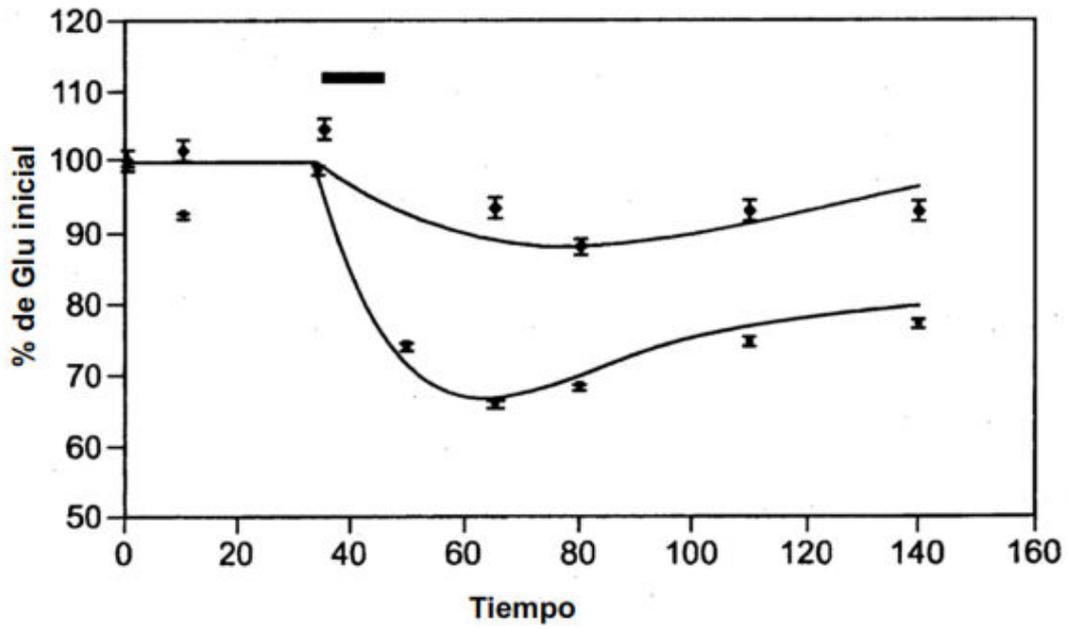


Fig. 16

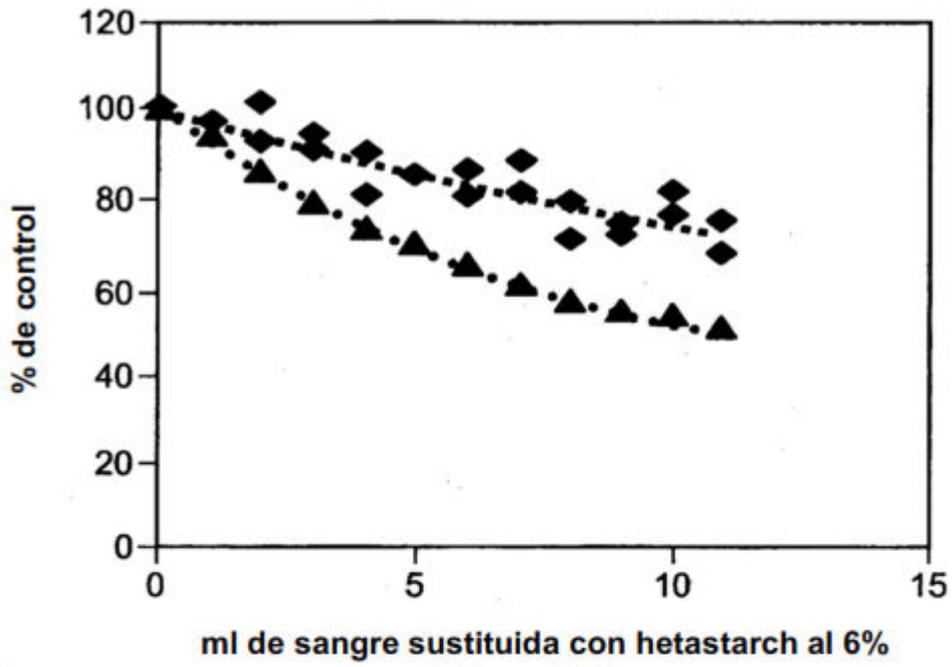


Fig. 17

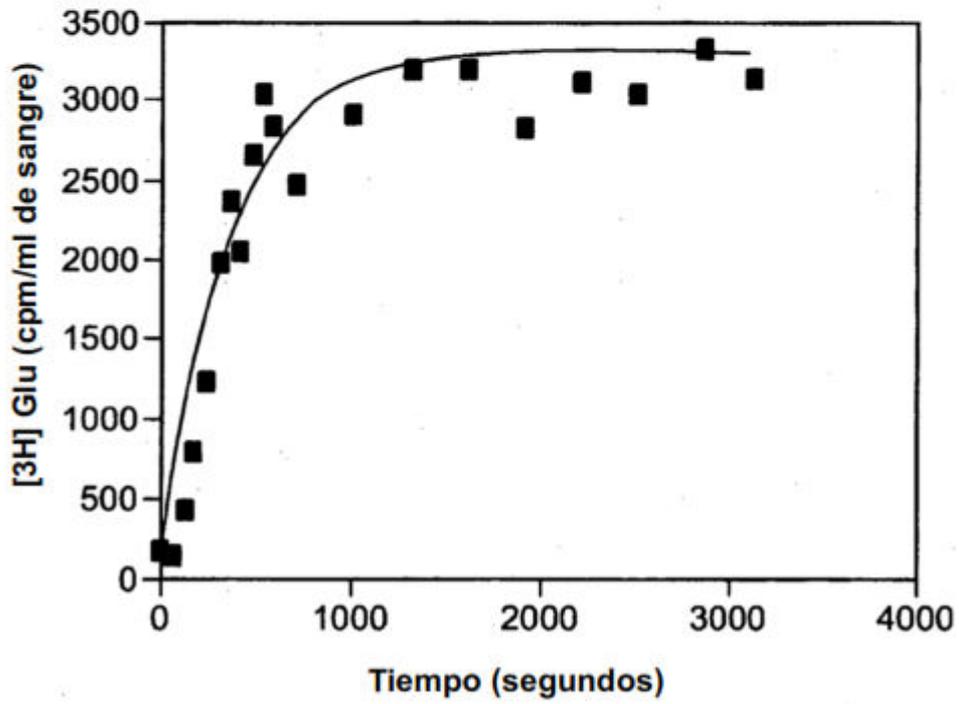


Fig. 18

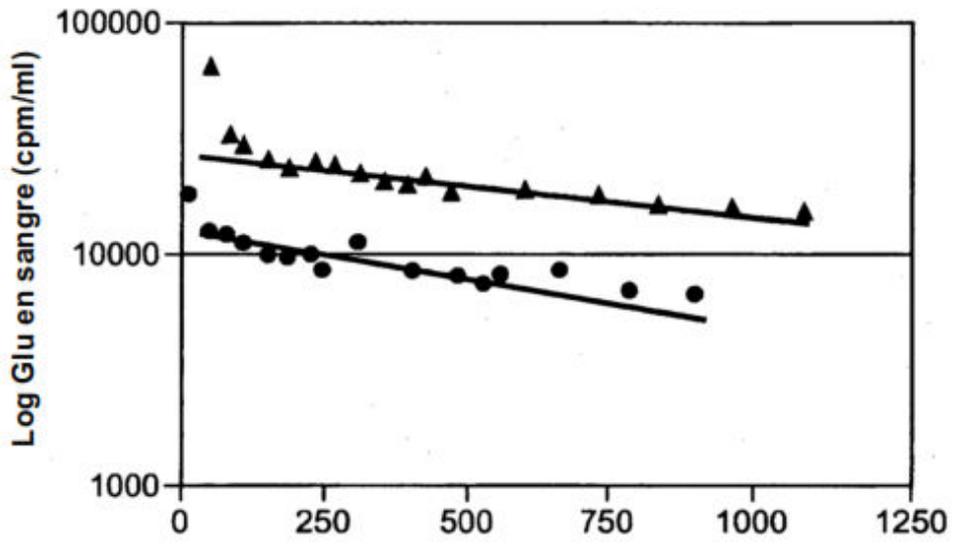


Fig. 19

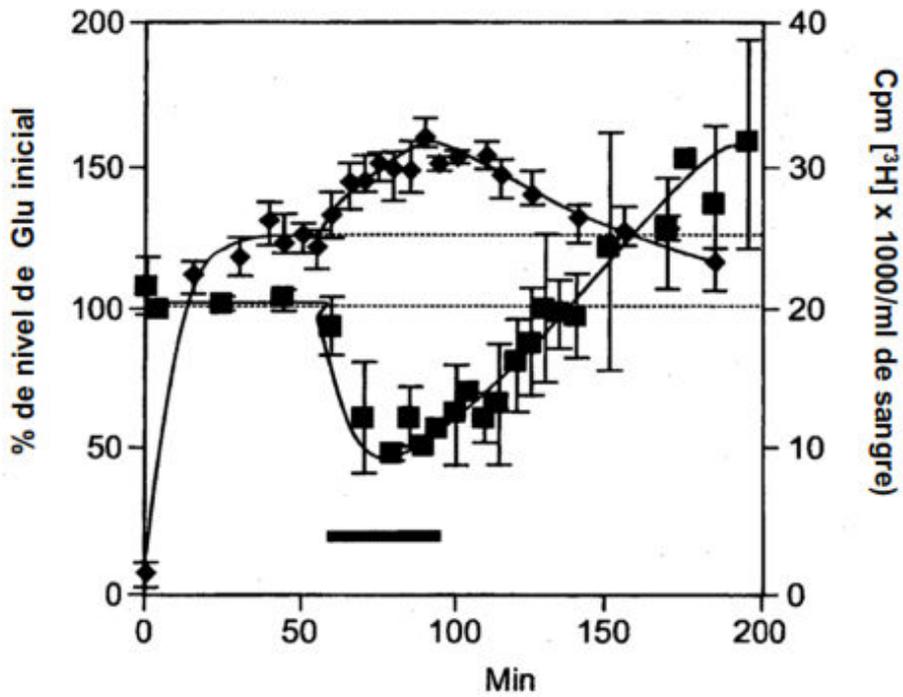


Fig. 20

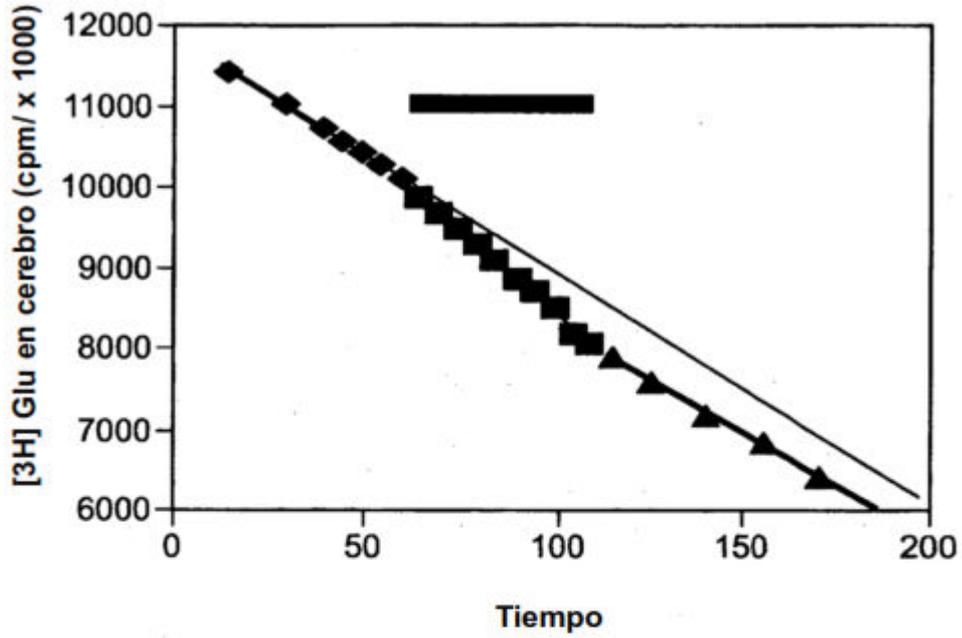


Fig. 21

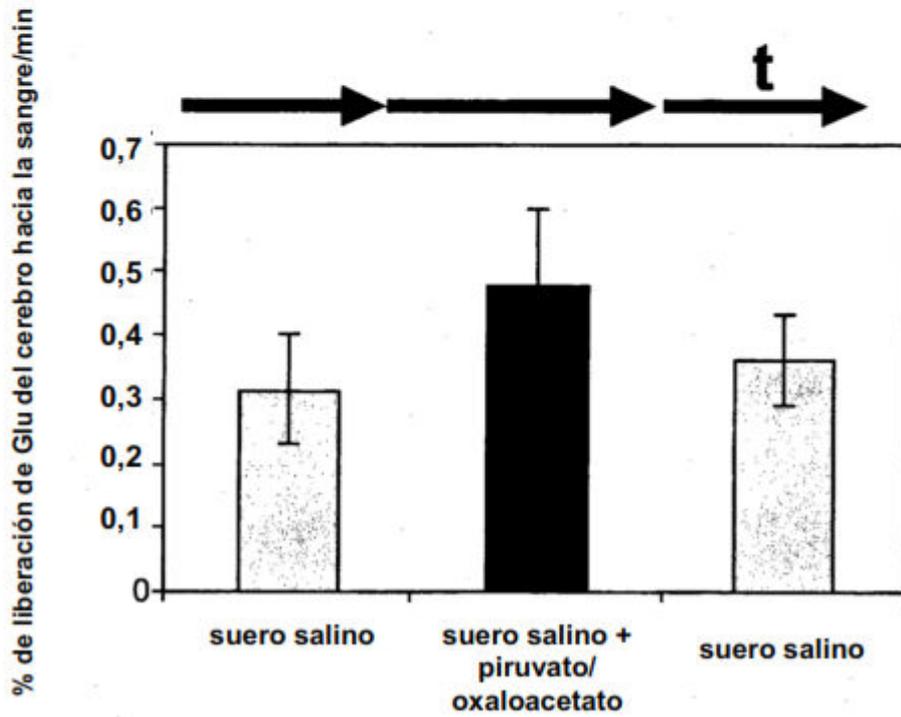


Fig. 22

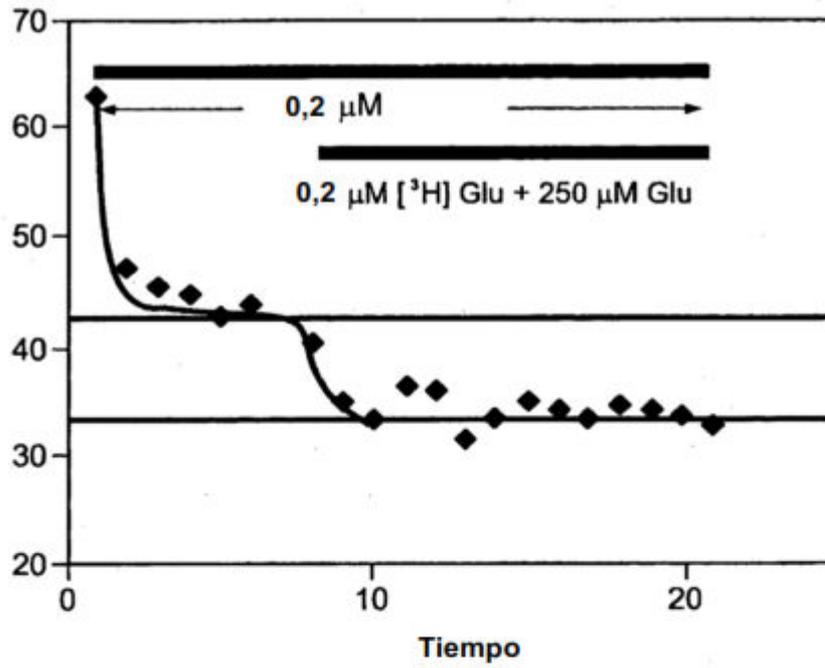


Fig. 23

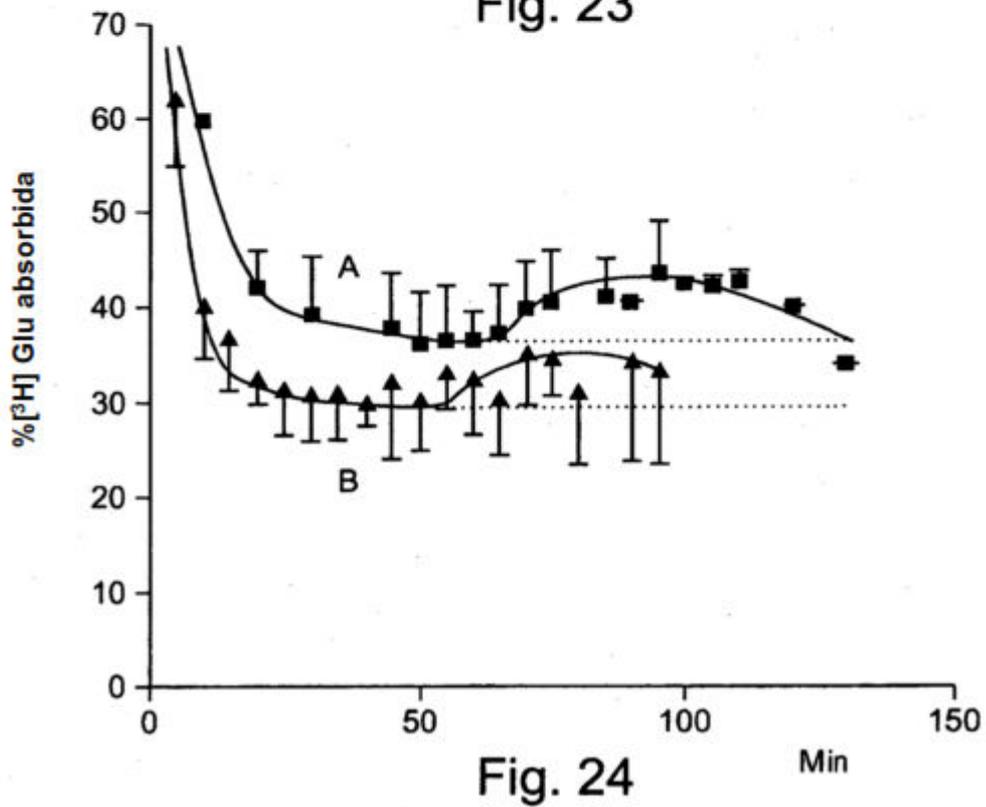


Fig. 24

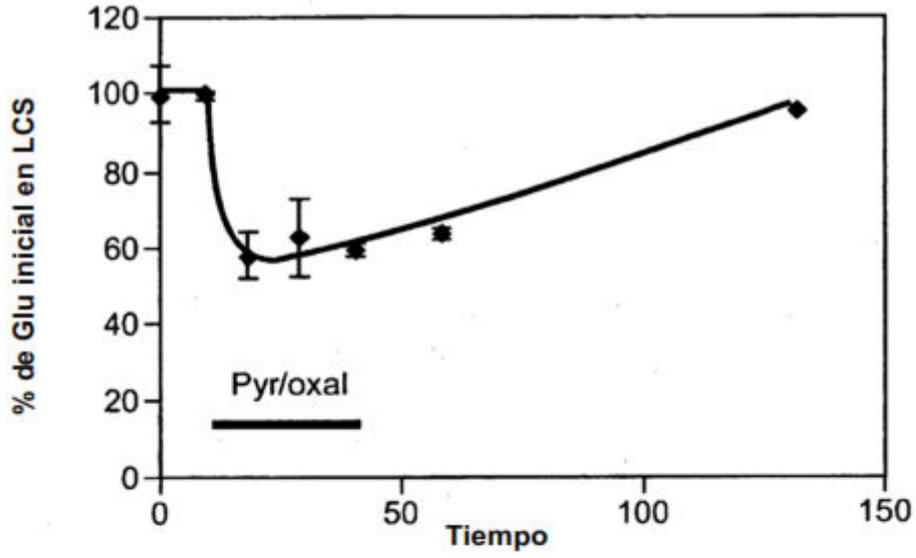


Fig. 25

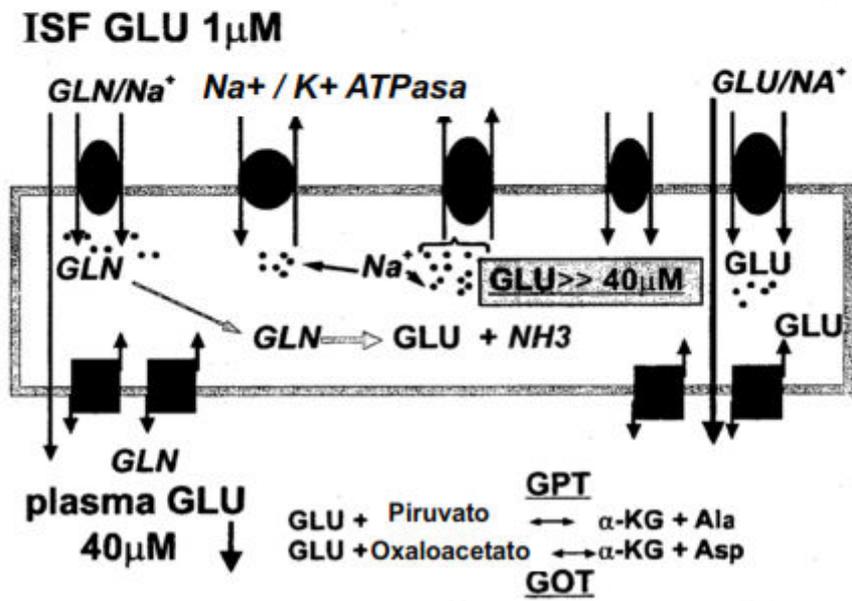


Fig. 26

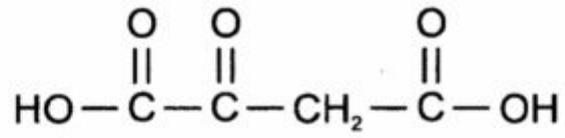


Fig. 27a

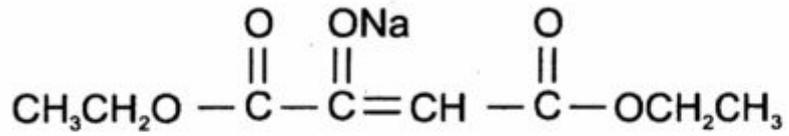


Fig. 27b

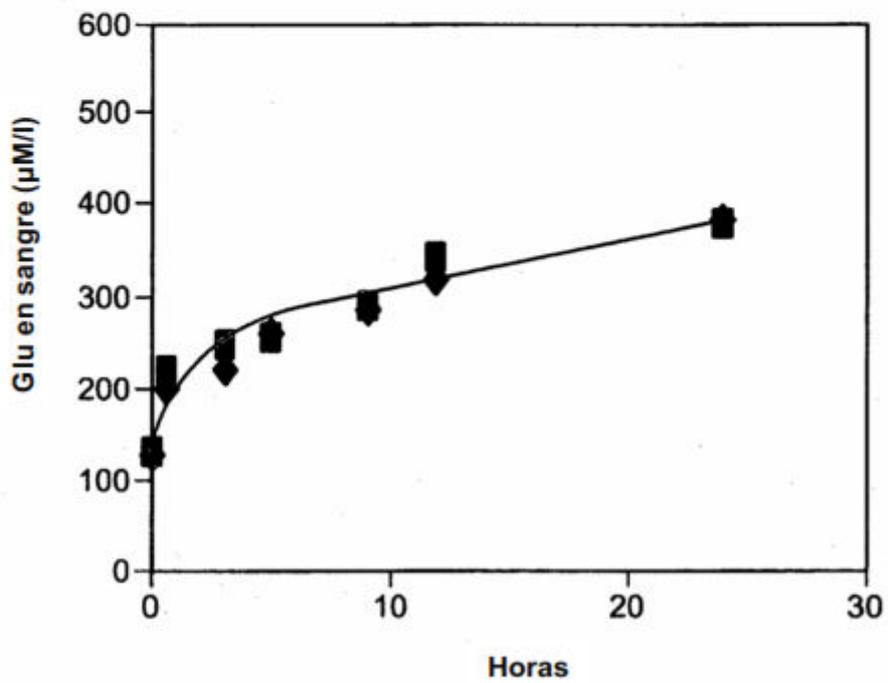


Fig. 28

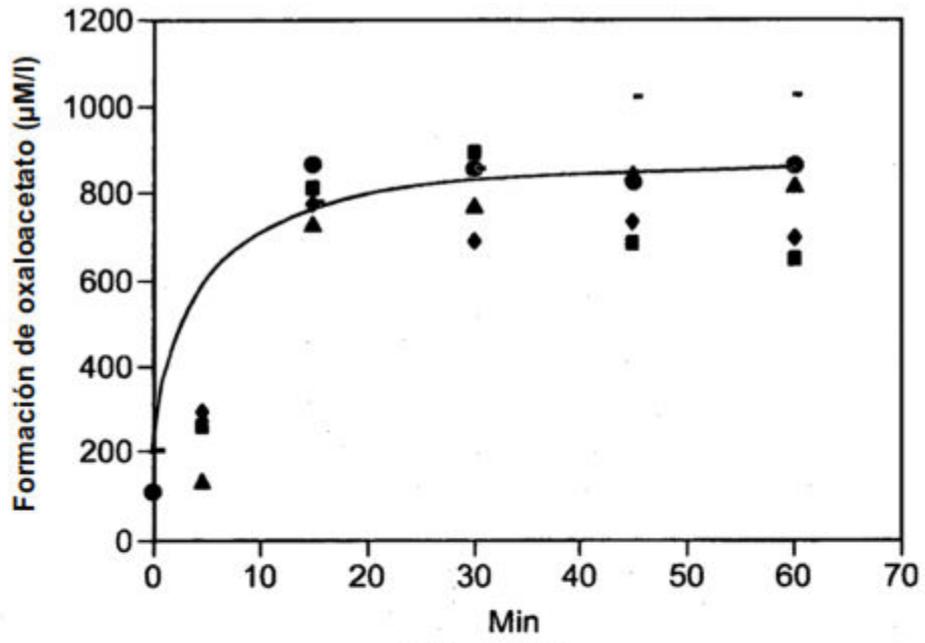


Fig. 29a

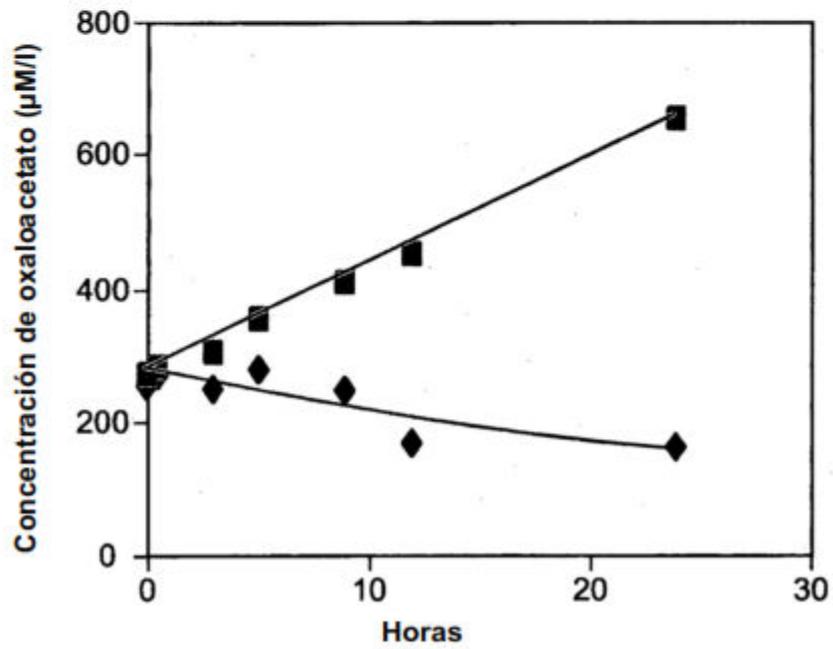


Fig. 29b

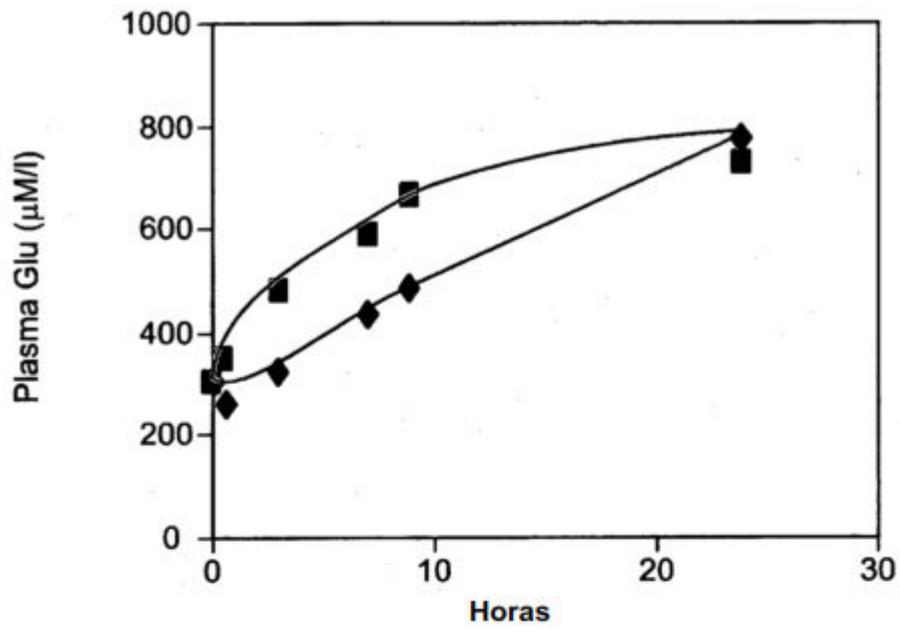


Fig. 30

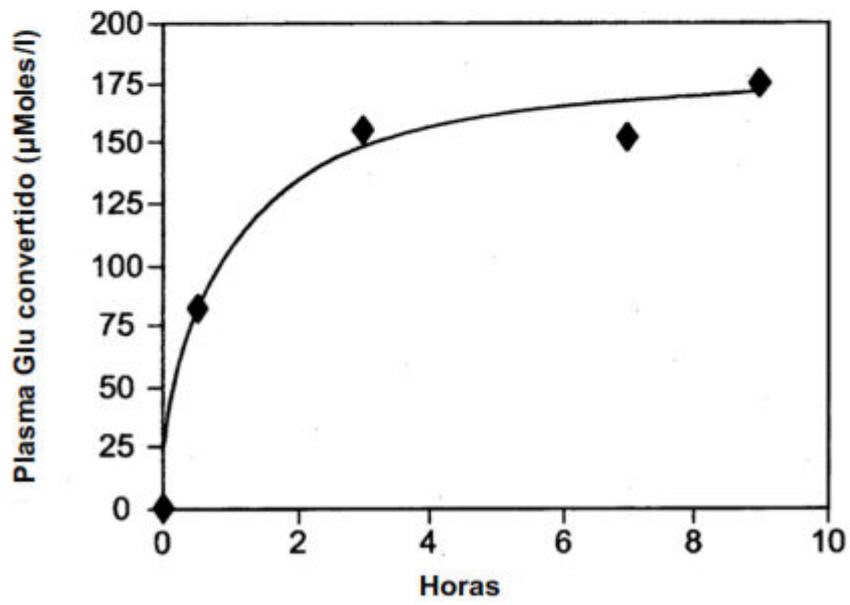


Fig. 31

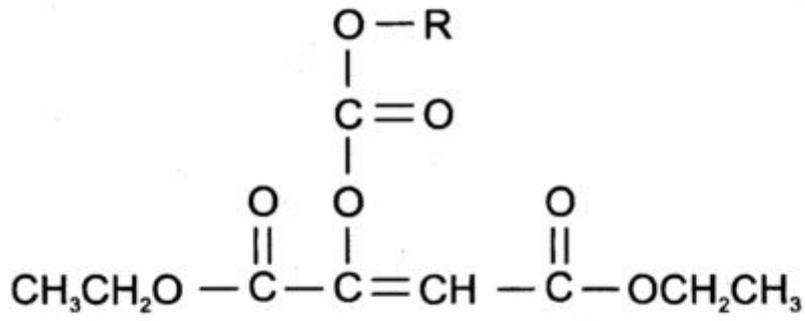


Fig. 32

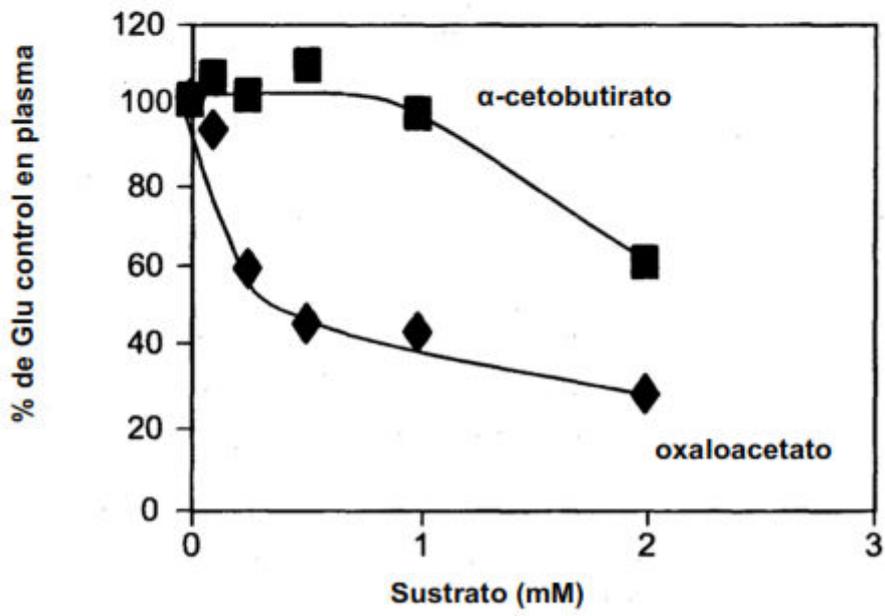


Fig. 33

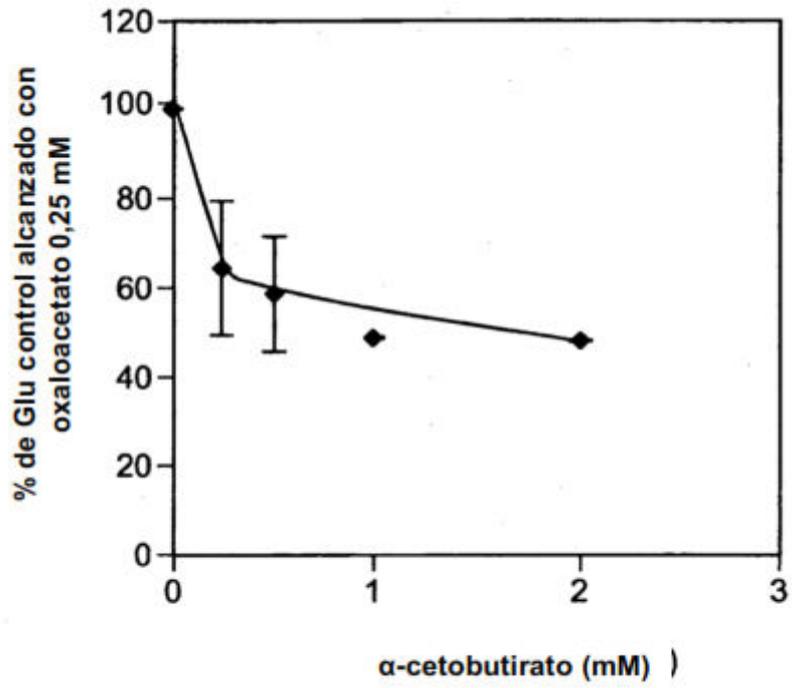


Fig. 34