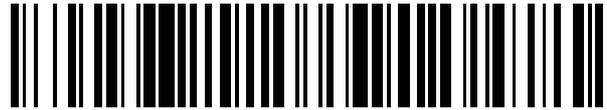


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 341**

51 Int. Cl.:

A61K 31/137 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2007 E 07814124 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 2053919**

54 Título: **Procedimiento de reducción de daño a células neuronales**

30 Prioridad:

23.08.2006 US 839974 P

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

01.04.2014

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MONTANA (100.0%)
UNIVERSITY HALL 116
MISSOULA, MT 59812-4104, US**

72 Inventor/es:

**POULSEN, DAVID J. y
RAU, THOMAS FREDERICK**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 452 341 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

Procedimiento de reducción de daño a células neuronales

Campo de la técnica

La presente invención está dirigida a usos para la reducción de la aparición de daño en las células neuronales, incluyendo la muerte celular, causada por la hipoxia transitoria cerebral y / o isquemia, que comprende las etapas de: diagnóstico de un sujeto que tiene una afección hipóxica y/o isquémica cerebral transitoria y en las 16 horas posteriores al inicio de la afección, la administración al sujeto de una cantidad neuroprotectora de un metanfetamina. En el presente documento también se divulgan, pero no reivindican, usos que implican un agente farmacéutico seleccionado del grupo que consiste en: un estimulante del sistema nervioso central (ESNC), un neurotransmisor de monoamina, inhibidor de la monoaminoxidasa (IMAO), antidepresivos tricíclicos (TCA), o una combinación de los mismos, tales como anfetaminas, metilfenidato, metilendioximetanfetamina, o una combinación de los mismos.

Antecedentes de la invención

Los accidentes cerebrovasculares son la principal causa de discapacidad entre los adultos, de los que más del 80% implica de lesión isquémica. Hasta la fecha, ninguna terapia preventiva o neuroprotectora ha demostrado ser eficaz en seres humanos. Las anfetaminas son uno de los grupos más ampliamente estudiados y prometedor de los medicamentos utilizados para facilitar la recuperación del accidente cerebrovascular después de haberse producido daños en las células neuronales (véase (Martinsson y Eksborg 2004)). En ratas, una dosis única de anfetaminas (por ejemplo, dexanfetamina) administrada 24 horas después de la ablación de la corteza sensitivomotora estimula la recuperación hemipléjica (Feeney et al. 1982). Este efecto beneficioso se ha confirmado en una variedad de diferentes modelos de lesión focales y especies (Sutton et al. 1989; Hovda y Fenney 1984; Hovda y Feeney 1985; Schmanke et al. 1996; Dietrich et al. 1990; Stroemer et al. 1998). En cada uno de estos estudios, la lesión isquémica de modeló mediante por la ligadura / embolia permanente de un componente vascular, o ablación cortical.

Un tipo diferente de lesión isquémica implica la interrupción transitoria y reperusión del flujo sanguíneo al cerebro. El hipocampo es extremadamente sensible a este tipo de agresión isquémica. En los seres humanos y modelos experimentales con roedores, los episodios de isquemia breves pueden tener como resultado la muerte selectiva y retardada de neuronas localizadas en el hipocampo, en especial de las células piramidales del sector CA1 (Kirino 1982). Este tipo de lesión afecta al rendimiento de las tareas cognitivas que involucran la memoria espacial (Zola-Morgan et al. 1986, Squire y Zola-Morgan 1991). Aunque la administración de anfetamina se asocia con una mejora de la recuperación del comportamiento en modelos de isquemia focal o ablación cortical, en la técnica anterior se notificó que el tratamiento con anfetaminas no reduce el volumen del infarto y por lo tanto, no es un protector preventivo o neuronal. La técnica anterior también sugiere que las anfetaminas facilitan la recuperación conductual después de una lesión cortical al influir en la plasticidad del cerebro (Gold et al. 1984) así como la resolución de la diasquisis ((Hovda et al. 1987; Sutton et al. 2000). No obstante, la técnica anterior, enseña, además, que las anfetaminas no mejoran la recuperación después de ciertos tipos de lesiones, incluidas las lesiones en la sustancia negra (Mintz y Tomer 1986). La técnica anterior también enseña que la administración de anfetaminas (por ejemplo, metanfetamina; MA) antes de la isquemia focal en realidad aumenta el volumen del infarto en regiones corticales y del cuerpo estriado (Wang et al. 2001).

Todavía existe la necesidad de un tratamiento que prevenga el daño neuronal antes de que ocurra y, de hecho proporciona protección neuronal después de la aparición de una afección hipóxica y / isquémica cerebral transitoria para minimizar o prevenir el daño. Tal procedimiento preventivo se describe en el presente documento, que proporciona un procedimiento para prevenir o reducir el daño a las células neuronales cerebrales antes de que ocurra en lugar de intentar tratar el daño después de su aparición y estimular la recuperación.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y se refiere a usos para la reducción de la aparición de daño celular neuronal causado por hipoxia y / o isquemia cerebral transitoria, que comprende las etapas de: el diagnóstico de un sujeto que tiene una afección hipóxica y / o isquémica cerebral transitoria; y en un plazo de 16 horas después del inicio de la afección, la administración al sujeto de una cantidad neuroprotectora de una metanfetamina. En el presente documento también se divulga, pero no se reivindican, usos que impliquen un agente farmacéutico seleccionado del grupo que consiste en: un estimulante del sistema nervioso central (ESNC), neurotransmisor de monoamina, inhibidor de la monoaminoxidasa (IMAO), antidepresivos tricíclicos (TCA), o una combinación de los mismos, tales como anfetaminas, metilfenidato, metilendioximetanfetamina, o una combinación de los mismos.

En una forma de realización específica, el agente farmacéutico es metanfetamina administrada al sujeto en cantidades de dosis unitarias de inferiores a 5 mg / kg.

En otras formas de realización específicas, el agente farmacéutico es una combinación de metanfetamina, metilfenidato, metilendioximetanfetamina, o una combinación de los mismos y al menos un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en: un neurotransmisor de monoamina, un IMAO o un TCA. El agente adicional

también puede incluir un neurotransmisor de monoamina, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en: dopamina, norepinefrina o serotonina.

La presente invención reduce la aparición de daño celular neuronal cerebral, que incluye la muerte celular, y más preferentemente, reduce la aparición de daño celular neuronal a las células neuronales. En una realización preferida, la presente invención reduce la aparición de daño celular neuronal a las células neuronales del hipocampo.

Típicamente, la afección hipóxica y/o isquémica cerebral transitoria hipoxia se debe a una pérdida de sangre, un ataque al corazón, estrangulación, cirugía (por ejemplo, cirugía cardíaca), un accidente cerebrovascular, bloqueo de las vías respiratorias, neuropatía óptica isquémica, lesiones medulares, lesiones cerebrales traumáticas lesión, o hipotensión. La afección sin embargo, puede estar causada por muchas condiciones, condiciones que causan daño celular neuronal debido a la falta de oxígeno y / o de glucosa en las células neuronales durante un período de tiempo temporal.

En ciertas realizaciones preferidas, el agente farmacéutico se administra en un plazo de 14, 12, 10, 8, 6, 4, o 2 horas desde la aparición de la afección. El agente se administra preferentemente por vía parenteral u oral, pero se contemplan otras vías y se pueden utilizar dependiendo de la afección.

En una forma de realización, el agente farmacéutico se administra en una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede ser una formulación de liberación inmediata o extendida dependiendo de la afección y la probabilidad de recurrencia.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: muestra una respuesta a la dosis neuroprotectora de MA tras privación de oxígeno-glucosa (POG). Se muestran imágenes representativas de cultivos de cortes de hipocampo de rata teñidos con yoduro de propidio tomadas 48 horas después de la POG. Los cultivos se trataron con las siguientes dosis de MA: (a) control sin POG, (B) 125 μM de MA añadidos 5 minutos después de la POG, (C) 250 μM añadidos 5 minutos después de la POG, (D) 500 μM de MA añadidos 5 minutos después de la POG; (E) MA 1mM añadida 5 minutos después de la POG, (F) sólo PGD. El panel (G) muestra el análisis estadístico de la tinción con PI indicado como la intensidad de la fluorescencia relativa (IOD). ** = $P < 0,01$, ANOVA de una vía, análisis post hoc de Dunnet (POG), barras de error = media y SEM, (POG) $n = 10$, (Sin POG) $n = 13$, (1 mM de MA) $n = 10$, (500 μM de MA) $n = 11$, (250 μM de MA) $n = 9$, (125 μM DE MA) $n = 7$.

Figura 2: muestra un análisis temporal de la neuroprotección mediada por MA tras POG. Se muestran imágenes representativas de cultivos de cortes de hipocampo de rata teñidos con yoduro de propidio tomadas 48 horas después de la POG. Una dosis de 250 μM de MA se administró después del accidente cerebrovascular en los puntos de tiempo indicados: (A) sin PGD, (B) 0-5 min después de la PGD, (C) 2 horas después de la PGD, (D) 4 horas después de la PGD, (E) 8 horas después de la PGD, (F) 16 horas después de la PGD, (G) PGD no tratada. El Panel (H) muestra el análisis estadístico de la tinción con PI indicado como la intensidad de fluorescencia relativa (IOD). $n = 4$, * = $p < 0,05$, ANOVA de una vía, análisis post hoc de Dunnet (POG), barras de error = media y SEM

Figura 3: muestra la distancia media (\pm SEM) recorrida en un aparato novedoso campo abierto. Los animales se analizaron 24 horas después de 5 min de 2-VO (Isq.) o cirugía simulada (Sim.). Después de la cirugía (1-2 min), los jerbos recibieron metanfetamina (5 mg) o vehículo de solución salina (0 mg). Los jerbos se colocaron en la región central y se les permitió explorar el nuevo entorno durante 5 minutos y los datos de distancia se recogieron usando un sistema de seguimiento automatizado. Los jerbos isquémicos sin tratamiento con metanfetamina fueron significativamente más activos en comparación con el grupo sin tratamiento simulado sin fármacos. Los jerbos isquémicos y tratados de forma simulada con fármaco no eran diferentes y el tratamiento con el fármaco no alteró significativamente los niveles de actividad relativa a la afección control. * $P < 0,05$ frente a afección isquémica más fármaco.

Figura 4: muestra las puntuaciones de clasificación histológica individuales de las secciones del hipocampo evaluadas 21 días después de la lesión isquémica (Isq) o cirugía de control simulado (Sim). Los jerbos se trataron con metanfetamina (5 mg) o vehículo (0 mg) 1-2 minutos después de la cirugía. El daño en la región del hipocampo CA1 se evaluó usando una escala de clasificación de 4 puntos. A cada animal se asignó una puntuación de 0 (4-5 capas compactas de cuerpos neuronales normales), 1 (4-5 capas compactas con presencia de algunas neuronas alteradas), 2 (algunos cuerpos neuronales con "espacios fantasmas" y / o células gliales entre ellos), 3 (completa ausencia o presencia de únicamente algunos cuerpos neuronales normales con una gliosis intensa del subcampo CA1). El análisis reveló que el tratamiento con metanfetamina reduce significativamente el daño en la CA1 del hipocampo después de una agresión isquémica.

Figura 5: son microfotografías de secciones de hipocampo procesado 21 días después de la lesión isquémica o un procedimiento simulado seguido de la administración de metanfetamina (5 mg / kg) o vehículo. Un 5-min 2-VO tuvo como resultado la pérdida selectiva de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo (Paneles C, D). Como era de esperar, la cirugía simulada (paneles A, B) no dio lugar a ninguna pérdida de células neuronales. Los jerbos tratados con metanfetamina 1-2 minutos después de lesión isquémica no pudieron presentar ningún deterioro del hipocampo (paneles E, F). Las secciones se tiñeron con violeta de cresilo. Barras de escala = 200 μm (A, C, E) y 60 μm (B, D, F).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y reduce la aparición de daños en las células neuronales cerebrales, incluyendo la muerte celular, causados por una afección hipóxica y/o isquémica cerebral transitoria. Preferentemente, la invención reduce la aparición de daños en las células neuronales del hipocampo. La afección hipóxica y/o isquémica cerebral transitoria puede estar causada por muchas afecciones que provocan falta de oxígeno y / o glucosa en las células cerebrales, durante un período de tiempo temporal. Por ejemplo, un ataque al corazón, estrangulamiento, cirugía (por ejemplo, cirugía cardíaca), un derrame cerebral, pérdida de sangre, obstrucción de las vías respiratorias o hipotensión. Preferentemente, el sujeto que está siendo tratado es un mamífero, por ejemplo, mono, perro, gato, caballo, vaca, oveja, cerdo, y más preferentemente el sujeto es un ser humano.

En contraste con la técnica anterior, la presente invención proporciona realmente protección y evita el daño a las células neuronales cerebrales después de la aparición de la afección hipóxica y/o isquémica cerebral transitoria en lugar de simplemente promover la recuperación después del daño celular neuronal ya causado. Para proporcionar la mayor protección neuronal al sujeto, el agente neuroprotector debería administrarse al sujeto en un plazo de 16 horas desde el inicio (por ejemplo, 10, 8, 6, 4, 2 horas) de la afección hipóxica y/o isquémica cerebral transitoria. El agente neuroprotector es un metanfetamina. Otros agentes neuroprotectores incluyen: un estimulante del sistema nervioso central (ESNC), neurotransmisor de monoamina, inhibidor de la monoamino oxidasa (IMAO), antidepresivos tricíclicos (TCA), o una combinación de los mismos.

En el presente documento también se divulgan, pero no se reivindican, usos que implican a anfetamina, metilfenidato, etilendioximetanfetamina, o combinaciones de los mismos. La anfetamina es un compuesto que contiene feniletilamina. La feniletilamina es una d-anfetamina, dextroanfetamina, tales como, por ejemplo, aspartato dextroanfetamina, sulfato de dextroanfetamina, sacarato de dextroanfetamina, etc. Ejemplos específicos incluyen, ADREX, BIPHETAMINE, DESOXYN DEXEDRINE, FERINDEX, ROBESE, SPANSULE, OXYDESS II, DEXTROSTAT.

En una forma de realización, el agente farmacéutico se administra en una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede ser una formulación de liberación inmediata o extendida dependiendo de la afección y la probabilidad de recurrencia. Las composiciones pueden incluir además otros compuestos farmacéuticamente activos, incluyendo, por ejemplo, al menos un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en: un neurotransmisor de monoamina, IMAO, o un TCA. El agente adicional también puede incluir un neurotransmisor de monoamina, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en: dopamina, norepinefrina, o serotonina, y más preferentemente norepinefrina.

Los expertos en la técnica reconocerán diversas metodologías sintéticas que pueden emplearse para preparar composiciones farmacéuticamente aceptables no tóxicos que comprenden el agente neuroprotector.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar en formas de dosificación individuales. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación comprenden los ingredientes activos como se define en las reivindicaciones adjuntas. La notación de "agente farmacéutico" o "agente neuroprotector" significa los compuestos como se definen en las reivindicaciones adjuntas o sales de los mismos. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación pueden comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o indicado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra un ingrediente activo. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos pueden ser solución salina, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea, y similares. Además, se pueden usar otros excipientes.

Formas de dosificación unitarias son adecuadas para administración oral, mucosal (por ejemplo, nasal, sublingual, vaginal, bucal, o rectal), parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, inyección en bolo, intramuscular o intraarterial), o transdérmica a un paciente. Ejemplos de formas de dosificación incluyen, entre otras: comprimidos oblongos; comprimidos, cápsulas, tales como cápsulas gelatina blandas elásticas; sellos; trociscos; pastillas; dispersiones; supositorios; ungüentos; cataplasmas (emplastos); pastas; polvos; apósitos; cremas; emplastos, soluciones, parches; aerosoles (por ejemplo, pulverizaciones o inhaladores nasales); geles; formas de dosificación líquidas adecuadas para administración oral o mucosa a un paciente, incluyendo suspensiones (por ejemplo, suspensiones líquidas acuosas o no acuosas, emulsiones líquidas de aceite-en-agua o de agua-en-aceite), soluciones y elixires; formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración parenteral a un paciente, y sólidos estériles (por ejemplo, sólidos cristalinos o amorfos) que pueden reconstituirse para proporcionar formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración parenteral a un paciente. El agente se administra preferentemente a través de una vía parenteral u oral, pero se contemplan otras vías como se trata con detalle en presente documento y dependen en gran medida de la afección isquémica.

La composición, forma, y tipo de las formas de dosificación generalmente variarán dependiendo de su vía de administración y el animal que se esté tratando. Por ejemplo, una forma de dosificación parenteral puede contener cantidades más pequeñas de uno o más de los ingredientes activos que comprende, que una forma de dosificación oral usada para tratar la misma enfermedad. Estas y otras maneras en que las formas de dosificación específicas variarán de una a otra, serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing, Easton Pennsylvania (1990).

Las composiciones farmacéuticas y las formas farmacéuticas típicas comprenden uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica de la farmacia, y ejemplos no limitantes de excipientes adecuados se proporcionan en el presente documento. Si un excipiente particular es adecuado para su incorporación en una composición farmacéutica o forma de dosificación depende de una variedad de factores bien conocidos en la técnica, incluyendo, entre otros, la manera en que la forma de dosificación se administrará a un paciente. Por ejemplo, las formas de dosificación orales tales como comprimidos pueden contener excipientes no adecuados para uso en formas farmacéuticas parenterales. La idoneidad de un excipiente particular también puede depender de los ingredientes activos específicos en la forma de dosificación. Por ejemplo, la descomposición de algunos ingredientes activos se puede acelerar con algunos excipientes tales como lactosa, o cuando se expone al agua.

Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación pueden comprender uno o más compuestos que reducen la velocidad a la que un ingrediente activo se descompondrá. Tales compuestos, que se denominan en la presente memoria "estabilizadores", incluyen, entre otros, antioxidantes tales como ácido ascórbico, tampones de pH, o tampones de sales.

Para una afección o procedimiento de tratamiento particular, la dosis se determina empíricamente, usando procedimientos conocidos, y dependerá de hechos tales como la actividad biológica del compuesto particular empleado, los medios de las administraciones, el peso, la edad, la salud y el cuerpo del huésped; la naturaleza y extensión de los síntomas; la frecuencia de tratamiento; la administración de otras terapias y el efecto deseado. En lo sucesivo se describen diversas dosificaciones y procedimientos de administración posibles con el entendimiento de que el siguiente están destinados a ser solamente ilustrativos. Las dosificaciones reales y procedimiento de administración o de entrega pueden ser determinadas por un experto en la técnica. Cuando el agente neuroprotector es metanfetamina administrada a seres humanos, la cantidad de dosificación unitaria es típicamente menos de 5 mg / kg. Grandes dosis son generalmente tóxicas y no deben usarse de forma habitual.

La frecuencia de dosificación también puede variar dependiendo del compuesto utilizado y de si se utiliza una formulación de liberación prolongada. Sin embargo, para el tratamiento de la mayoría de los trastornos, se prefiere una dosis única.

Formas farmacéuticas orales

Las composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración oral pueden presentarse como formas de dosificación discretas, tales como, entre otros, comprimidos (por ejemplo, comprimidos masticables), comprimidos oblongos, cápsulas y líquidos (por ejemplo, jarabes saborizados). Tales formas de dosificación contienen cantidades predeterminadas de ingredientes activos, y se pueden preparar por procedimientos de farmacia bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, en general, Remington Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing, Easton Pennsylvania (1990).

Las formas de dosificación oral típicas se preparan combinando los ingredientes activos en una mezcla íntima con al menos un excipiente de acuerdo con técnicas de composición farmacéutica convencionales. Los excipientes pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Por ejemplo, los excipientes adecuados para su uso en líquido oral o formas de dosificación de aerosol incluyen, pero sin limitación, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, y agentes colorantes. Ejemplos de excipientes adecuados para uso en formas de dosificación orales sólidas (por ejemplo, polvos, comprimidos, cápsulas y comprimidos ovalados) incluyen, pero sin limitación, almidones, azúcares, celulosa micro-cristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, y agentes disgregantes.

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas unitarias de dosificación oral más ventajosas, en cuyo caso se emplean excipientes sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse por técnicas acuosas o no acuosas estándar. Tales formas de dosificación se pueden preparar por cualquiera de los procedimientos de farmacia. En general, las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación se preparan mezclando uniforme e íntimamente los ingredientes activos con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego dar forma al producto en la presentación deseada si es necesario.

Por ejemplo, un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo. Las pastillas comprimidas se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada los ingredientes activos en una forma de flujo libre tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un excipiente. Los comprimidos moldeados se pueden hacer moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

- Los ejemplos de excipientes que se pueden usar en formas de dosificación orales incluyen, pero sin limitación, aglutinantes, cargas, disgregantes, y lubricantes. Los aglutinantes adecuados para uso en composiciones farmacéuticas y formas de dosificación incluyen, pero sin limitación, almidón de maíz, almidón de patata, u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, alginato de sodio, ácido alginico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio), pirrolidona de polivinilo, metilcelulosa, almidón pregelatinizado, hidroxipropilmetilcelulosa, (por ejemplo, n° 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina, y mezclas de los mismos.
- Las formas adecuadas de celulosa microcristalina incluyen, pero sin limitación, los materiales comercializados como AVICEL-PH-101, AVICEL-PH-103 AVICEL RC-581, AVICEL-PH-105 (disponibles en FMC Corporation, División de American Viscose, Avicel Sales, Marcus Hook, PA), y mezclas de los mismos. Un aglutinante específico es una mezcla de celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa de sodio comercializada como AVICEL RC-581. Excipientes anhidros o de baja humedad adecuados o aditivos incluyen AVICEL-PH-103 y Almidón 1.500 LM.
- Ejemplos de cargas adecuadas para uso en las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación descritas en la presente incluyen, pero sin limitación, talco, carbonato de calcio (por ejemplo, gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextranos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, y mezclas de los mismos. El aglutinante o carga en las composiciones farmacéuticas está presente típicamente en de aproximadamente 50 a aproximadamente 99 por ciento en peso de la composición farmacéutica o forma de dosificación.
- Los disgregantes se utilizan en las composiciones para proporcionar comprimidos que se desintegran cuando se exponen a un ambiente acuoso. Los comprimidos que contienen demasiado disgregante se pueden disgregar en el almacenamiento, mientras que los que contienen demasiado poco pueden no desintegrarse a una velocidad deseada o bajo las condiciones deseadas. Por lo tanto, una cantidad suficiente de disgregante que no sea ni demasiado ni demasiado poco para modificar perjudicialmente la liberación de los ingredientes activos se debe utilizar para formar formas de dosificación oral sólidas de la invención. La cantidad de disgregante usada varía basándose en el tipo de formulación, y es fácilmente discernible para los de experiencia ordinaria en la técnica. Las composiciones farmacéuticas típicas comprenden de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 por ciento en peso de disgregante, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 por ciento en peso de disgregante.
- Los disgregantes que se pueden utilizar en composiciones farmacéuticas y formas de dosificación incluyen, pero sin limitación, agar-agar, ácido alginico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, polacrilina de potasio, glicolato de almidón sódico, almidón de patata o de tapioca, otros almidones, almidón pre-gelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas, y mezclas de los mismos.
- Los lubricantes que se pueden usar en composiciones farmacéuticas y formas de dosificación incluyen, pero sin limitación, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio , talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja), estearato de cinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar, y mezclas de los mismos. Los lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice Syloid (AEROSIL 200, fabricado por WR Grace Co. de Baltimore, MD), un aerosol coagulado de sílice sintética (comercializado por Degussa Co. de Plano, TX), CAB-O -SIL (un producto de dióxido de silicio pirógeno vendido por Cabot Co., de Boston, MA), y mezclas de los mismos. Si se usan, los lubricantes se usan típicamente en una cantidad de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso de las composiciones farmacéuticas o formas farmacéuticas en que se incorporan.
- Una forma de dosificación oral sólida preferida comprende un ingrediente activo, la lactosa anhidra, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, ácido esteárico, sílice anhidra coloidal, y gelatina.

Formas de dosificación parenterales

- Formas de dosificación parenterales se pueden administrar a pacientes por diversas vías incluyendo, pero no limitadas a, subcutánea, intravenosa, inyección de bolo, intramuscular e intraarterial. Debido a que su administración típicamente deriva las defensas naturales de los pacientes contra los contaminantes, las formas de dosificación parenterales son preferentemente estériles o capaces de ser esterilizadas antes de la administración a un paciente. Ejemplos de formas de dosificación parenteral incluyen, pero sin limitación, soluciones listas para inyección, productos secos listos para ser disueltos o suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable para inyección, suspensiones listas para inyección y emulsiones.
- Los vehículos adecuados que se pueden usar para proporcionar formas de dosificación parenterales son bien conocidos para los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: Agua para Inyección USP, vehículos acuosos tales como, pero no limitados a, inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, y inyección de Ringer Lactato, vehículos miscibles en agua tales como, pero no limitados a, alcohol etílico, polietilenglicol, y polipropilenglicol y vehículos no acuosos tales como, pero

no limitados a, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, y bencilo benzoato.

Ejemplos

5 La eficacia neuroprotectora de anfetaminas tras una lesión isquémica cerebral transitoria no se ha investigado previamente. En el presente estudio, la metanfetamina (MA) se evaluó mediante *in vitro* y en modelos *in vivo* de isquemia cerebral transitoria. Para el modelo *in vitro*, cultivos de cortes de hipocampo de rata se expusieron a la privación de oxígeno-glucosa. En una segunda serie de experimentos, se utilizó un 5-min 2-VO modelo de jerbo de oclusión en combinación con las pruebas de comportamiento para probar la eficacia neuroprotectora de MA *in vivo*.
10 Durante el presente estudio se descubrió sorprendentemente y demostró que la administración MA dentro de 16 horas después de la isquemia cerebral transitoria es en realidad neuroprotector, reduciendo el daño de células neuronales, incluyendo la muerte.

Materiales y procedimientos

1.1 Animales

15 Todos los procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por el University Institutional Animal Care and Use Committee. Veintiocho jerbos mongoles machos adultos (*Meriones unguiculatus*) con un peso de 60-80 g se utilizaron para los experimentos *in vivo*. Estos animales se estabularon individualmente en un ambiente de luz-oscuridad y temperatura controlado (ciclo de 12 h luz / oscuridad) (23 ° C) ambiente controlado. Se proporcionó a los roedores comerciales pellas y agua *ad libitum*.

1.2 Estudios *in vitro* de los cortes de hipocampo

20 Las ratas neonatas (Sprague-Dawley) fueron decapitadas a los 7 días del nacimiento (P7) n y los hipocampos diseccionaron en condiciones estériles. Los hipocampos se cortaron en láminas de 400 µm con un cortador de tejidos McIlwain y las secciones individuales se cultivaron en membranas Millicell permeables (tamaño de poro 0,4 µm) en placas de seis pocillos durante 6 días a 37 ° C en 5% de CO₂. Durante los dos primeros días, las láminas se mantuvieron en un medio de siembra primario (50% de DMEM (+) glucosa, 25% de HBSS (+) glucosa, suplementado con 25% de suero de caballo inactivado por calor, 5 mg / ml de D-glucosa (Sigma), Glutamax 1mM, 1,5% de PenStrep / Fungizona (Gibco) y 5 ml de 50X B27 (Gibco) más antioxidantes, que se cambió cada 24 horas.
25 Al cuarto día, las láminas se colocaron en medio neurobasal sin suero (10 ml Neurobasal-A, 200 µl de 50X B27 suplemento, 100 µl de 100X Fungizone, y 100 µl de 100X Glutamax) y este medio se cambió cada 48 horas. 24 horas antes de la experimentación, los insertos se colocaron en un medio Neurobasal y B27 suplemento sin suero sin antioxidantes. Antes de la privación de oxígeno-glucosa (POG), una solución de salina equilibrada sin glucosa (BSS) (NaCl 120 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 1,25 mM, MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 2 mM, NaHCO₃ 25 mM, HEPES 20 mM, sacarosa 25 mM, a pH de 7,3) se infundió durante 1 hora con 5% de CO₂ y gas nitrógeno 10 l/h. Los insertos se transfirieron después a BSS desoxigenado y se colocaron en un tanque de 37o (Pro-Ox) con un sensor de realimentación de oxígeno que mantiene los niveles de gas en 0,1% O₂, 5% CO₂, 94,4% de nitrógeno para 90m.
30 Después de la POG, las láminas se transfirieron inmediatamente de nuevo en los medios Neurobasal precalentado y se analizaron siguiendo los protocolos experimentales.
35

1.3 Isquemia cerebral transitoria

40 Los jerbos se anestesiaron con isoflurano y la temperatura central del cuerpo se mantuvo a 37-38 ° C durante la cirugía usando una manta homeotérmica (Harvard Apparatus, South Natick, EE.UU.). Se realizó una incisión en la línea media del cuello y se aislaron las arterias carótidas comunes y se ocluyeron durante 5 minutos usando pinzas de presión de aneurisma de 85 gm (ISQ, n = 14). Un segundo grupo de jerbos (SIM, n = 14) fue sometido a un procedimiento idéntico, a excepción de que no se pinzaron las arterias carótidas. La incisión se suturó y los animales recibieron MA (5 mg / kg; i.p.) o un volumen igual de vehículo (solución salina; 0 mg) en los 2 minutos posteriores a la reperusión. Los animales se introdujeron en una jaula caliente y se observaron durante 30 minutos. Se añadió Tylenol (8 mg / ml) al agua de bebida para proporcionar analgesia postoperatoria.
45

1.4 Pruebas de Comportamiento y evaluación histológica.

Cada jerbo se analizó 48 horas después de la cirugía en un aparato de campo abierto que consiste en un suelo de malla de metal de 77 cm x 77 cm con paredes de 15 cm de altura. Los animales se colocaron en el centro de la región y se les permitió explorar el entorno novedoso durante 5 minutos. Los datos del comportamiento (distancia recorrida, velocidad) se recogieron mediante un sistema de seguimiento automático (laberinto ANY, Stoelting, IL) y se evaluó por separado usando ANOVA y el test post hoc apropiado (P < 0,05 se consideró significativo). Veintiún días después de la cirugía, los jerbos fueron sacrificados con CO₂ y perfundidos con solución salina tamponada con fosfato seguida de paraformaldehído al 4%. El tejido de los jerbos tratados simulados tratados con MA (SIM + 0 mg) no se evaluó ya que no se esperaba que la administración aguda de MA alterara histológicamente el hipocampo de este grupo. Se extrajeron los cerebros y después se fijaron durante al menos 48 horas antes de la recogida de 40 µm de secciones vibratome a través de la región del hipocampo. Las secciones se montaron en portaobjetos y se tiñeron con violeta de cresilo. El daño en la región CA1 del hipocampo se evaluó sin el conocimiento de la afección
55

de tratamiento por dos observadores independientes utilizando una escala de calificación de 4 puntos descrita en otro lugar (Babcock *et al.* 1993). A cada animal se asignó una puntuación de 0 (4-5 capas compactas de cuerpos neuronales normales), 1 (4-5 capas compactas con presencia de algunas neuronas alteradas), 2 (algunos cuerpos neuronales con "espacios fantasmas" y / o células gliales entre ellos), 3 (completa ausencia o presencia únicamente de pocos cuerpos neuronales normales con una gliosis intensa del subcampo CA1). Las puntuaciones se promediaron y se evaluaron utilizando estadísticas no paramétricas (prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney, $P < 0,05$ se consideró significativo).

Resultados

2.1 Estudios *in vitro* de láminas de hipocampo

Láminas de hipocampo de rata expuestas a 90 minutos de privación de glucosa y oxígeno (POG) y tratados con metanfetamina (MA) mostraron niveles significativamente disminuidos ($p = < 0,01$) de captación de yoduro de propidio (PI) indicativos de una disminución de la absorción de la muerte neuronal en comparación con las láminas sometidas únicamente a POG (Figura 1). En los estudios de dosis-respuesta con MA, observamos la dosificación óptima con 250 μM MA y aumentar la captación de PI como la concentración aumentada o disminuida de esta cantidad. Sin embargo, en todas las concentraciones sometidas a ensayo (125 μM , 250 μM , 500 μM , 1 mM) que observó neuroprotección significativa ($p = < 0,01$) cuando se compara con la OGD-sólo láminas.

Para aclarar aún más el efecto de la MA, los inventores añadieron 250 μM en varios puntos de tiempo después de la POG y encontraron que la MA disminuía significativamente ($p < 0,05$) la muerte neuronal cuando se administraba hasta 16 horas después de la POG. La adición de MA de 24 horas después de la POG disminuyó la muerte neuronal, pero no difirió significativamente de la POG.

2.2 Estudios de isquemia cerebral transitoria

Los jerbos mostraron movimientos coordinados en los 10 minutos posteriores la terminación de la administración de isoflurano. En los animales tratados con MA el se produjo piloerección con la cola apuntando hacia arriba. Los animales fueron examinados en un aparato de campo abierto 48 horas después de la cirugía. Los jerbos que se sometieron a lesión isquémica sin tratamiento con MA recorrieron 129,4 m (± 20 ; SEM), mientras que los controles simulados con y sin tratamiento farmacológico recorrieron 72,7 m (± 6) y 73,2 m ($\pm 7,5$), respectivamente. Los jerbos isquémicos tratados con MA tras la cirugía recorrieron 66,3 m $\pm 5,6$. El análisis de los datos de actividad reveló una interacción significativa entre el tratamiento farmacológico y las condiciones quirúrgicas ($P < 0,05$). Las comparaciones planificadas posteriores indicaron que los jerbos isquémicos, en ausencia de tratamiento con MA, eran significativamente más activos en comparación con el grupo simulado sin tratamiento farmacológico ($P < 0,05$). Los jerbos isquémicos y falsos tratados con MA no fueron significativamente diferentes ($P > 0,05$). Por último, el tratamiento con MA no alteró significativamente los niveles de actividad relativa a la afección control (SIM + 0 mg vs SIM + 5 mg; $P > 0,05$). Análisis de los datos de velocidad (distancia recorrida / tiempo) reveló un patrón similar con los jerbos isquémicos tratados con solución salina (ISQ que exhiben velocidades significativamente más rápidas con respecto a todos los demás grupos experimentales (datos no presentados).

Las puntuaciones de la histopatología y las fotomicrografías representativas de los grupos evaluados se ilustran en las Figuras 4 y 5, respectivamente. Los jerbos ISCH + 0 mg exhibieron grandes daños en la región CA1 del hipocampo. Cuatro de los seis jerbos de este grupo tuvieron ausencia completa de cuerpos neuronales normales con intensa gliosis del subcampo CA1. Por el contrario, todos los jerbos en el grupo SIM + 0 mg fueron calificados como sin daño perceptible en el hipocampo (valoración 0 ± 0 media). Seis de los animales en el grupo MA ISQ + 5 mg exhibieron 4-5 capas compactas de cuerpos neuronales normales en el hipocampo (valoración grupo $0,07 \pm 0,07$). Sólo 1 jerbo en esta afección exhibió algún daño perceptible en la región CA1. El análisis de las puntuaciones de evaluación reveló una diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,05$). La evaluación posterior de los datos individuales del grupo indicó que las afecciones SIM + 0 mg e ISQ + 5 mg no fueron significativamente diferentes ($P > 0,05$) y ambas fueron significativamente diferentes del grupo ISQ + 0 mg ($p < 0,05$).

Discusión

Los resultados del presente estudio indican que si un agente neuroprotector, por ejemplo, MA, se administra dentro de las 16 horas posteriores a la agresión isquémica transitoria, el daño a las células neuronales puede reducirse o impedirse en el hipocampo. La MA, por ejemplo, dio como resultado una respuesta neuroprotectora dependiente de la dosis en cultivos de cortes de hipocampo de rata expuestos a privación de oxígeno-glucosa. La dosis de 250 μM s mostró el mayor grado de protección y era eficaz cuando se administró hasta 16 horas después de la privación de oxígeno-glucosa. A las 24 horas de la POG, la administración MA no redujo significativamente la captación de PI, lo que indica que la dosificación de MA debe realizarse dentro de un período de tiempo relativamente corto después de la POG para activar el o los mecanismo (s) responsables de reducir el daño y muerte neuronal.

La eficacia neuroprotectora de la MA también se demostró *in vivo* utilizando un jerbo 2-VO, modelo de isquemia transitoria de 5 min. La administración de MA en los 1-2 minutos posteriores a la reperusión impidió cualquier pérdida significativa de células piramidales en la región CA1 del hipocampo. La evaluación histológica reveló que los jerbos isquémicos tratados con MA que exhibían una protección casi completa de la región CA1 del hipocampo con

sólo 1 de 7 animales que no mostró ninguna patología neuronal detectable en el hipocampo. Una oclusión de la carótida bilateral de 5 min en el jervo produce el aumento de la actividad locomotora que se correlaciona con la muerte de células en CA1 del hipocampo (Wang y Corbett 1990; Babcock *et al.* 1993). La actividad locomotora de los jervos isquémicos tratados con MA en el presente estudio fue comparable a los niveles del control, lo cual es indicativo de una neuroprotección significativa. Es muy posible que la excitación e hiperactividad que las anfetaminas producen podrían interactuar con los efectos conductuales de la isquemia. Sin embargo, las pruebas de comportamiento en el presente estudio se llevaron a cabo después de el fármaco debería haberse metabolizado (48 horas). En consonancia con esta interpretación fue la observación de que los jervos control tratados con MA no eran hiperactivos en relación con los animales que recibieron solución salina (SIM + 0 mg). La dosis de MA usada en el experimento *in vivo* se deriva de un informe anterior que utiliza jervos (Teuchert-Noodt *et al.* 2000; Araki *et al.* 2002) como modelo experimental. También se llevó a cabo un estudio preliminar en el que se descubrió que dosis de MA superiores a 5 mg / kg (*por ejemplo*, 10 y 20 mg / kg) eran letal en jervos después de la cirugía y no se evaluó adicionalmente.

La anfetamina en combinación con la formación ha demostrado ser una prometedora estrategia farmacológicas para la recuperación del comportamiento de un accidente cerebrovascular (véase Martinsson y Eksborg, 2004). La observación de que la MA en realidad previene el daño del hipocampo detectable tras una lesión isquémica si se administra dentro de un lapso de tiempo determinado después de la agresión, es decir, en el plazo de 16 horas, representa un hallazgo novedoso. Es de destacar que estos resultados muestran que la neuroprotección es independiente de cualquier formación del comportamiento tras la agresión. Es posible que la capacidad de la MA para proteger con eficacia y prevenir el daño neuronal en el hipocampo en contraste con las enseñanzas de la técnica anterior de tratamiento después de que haya ocurrido el daño, actúa con la isquemia cerebral transitoria. A diferencia de la isquemia focal u otros tipos de lesión cortical, la isquemia cerebral transitoria se caracteriza por un patrón de muerte celular retardada limitado a las células piramidales del hipocampo. La reperfusión que sigue a la breve episodio isquémico en este modelo es un acontecimiento clave para la posterior muerte celular que se produce 3-5 días después de la agresión.

Los estudios actuales de la administración MA antes de un acontecimiento de ictus agudo indican que la MA aumenta significativamente la muerte neuronal (Wang et al. 2001). Sin embargo, a la luz de nuestros resultados actuales, es muy posible que el tratamiento con MA antes de un acontecimiento de ictus agota las reservas de dopamina y norepinefrina que queda disponible para su liberación después de un acontecimiento de derrame cerebral, y la consiguiente disminución en la señalización neuronal pueden estar desempeñando un papel clave en el daño observado en pre-tratamiento con ma. y el accidente cerebrovascular. La capacidad del ESNC, por ejemplo, MA, para inducir una extremadamente grande liberación de estos neurotransmisores en un lapso de tiempo muy corto puede explicar en parte el efecto neuroprotector que se ha observado en los experimentos de los autores. La investigación futura destinada a comprender el mecanismo neuroprotector de agentes ESNC puede dilucidar el mecanismo exacto y el tratamiento de los acontecimientos isquémicos agudos.

Referencias

- Araki, H., Yamamoto, T., Kobayashi, Y., Futagami, K., Kawasaki, H., Gomita, Y. 2002. Effect of methamphetamine and imipramine on cerebral ischemia- induced hyperactivity in Mongolian gerbils. *Japan Journal of Pharmacology* 88, 293 - 299.
- Babcock, A.M., Baker, D. A., Lovac, R. 1993. Locomotor activity in the ischemic gerbil. *Brain Research* 625, 351 - 354.
- Boyeson, M.G., Feeney, D.M. 1990. Intraventricular norepinephrine facilitates motor recovery following sensorimotor cortex injury. *Pharmacology Biochemistry Behavior* 35, 497 - 501.
- Boyeson, M.G., Harmon, R. L., Jones, J. L. 1994. Comparative effects of fluoxetine, amitriptyline and serotonin on functional motor recovery after sensorimotor cortex injury. *American Journal Physical Medicine Rehabilitation* 73, 76 - 83.
- Culmsee C, Semkova L, Krieglstein J. 1999. NGF mediates the neuroprotective effect of the beta2-adrenoceptor agonist clenbuterol in vitro and in vivo: evidence from an NGF- antisense study. *Neurochemistry International* 35, 47 - 57.
- Dietrich W.D., Alonso O., Busto R., Watson B.D., Loo Y., Ginsberg M.D. 1990. Influence of amphetamine treatment on somatosensory function of the normal and infarcted rat brain. *Stroke* 21, III147-III150.
- Feeney D.M., Gonzalez A., Law W.A. 1982. Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. *Science* 217, 855 - 857.
- Follesa P., Mocchetti I. 1993. Regulation of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor mRNA by beta-adrenergic receptor activation and adrenal steroids in rat central nervous system. *Molecular Pharmacology* 43, 132 - 138.

- Gold P.E., Delanoy R.L., Merrin J. 1984. Modulation of long-term potentiation by peripherally administered amphetamine and epinephrine. *Brain Research* 305, 103 - 107.
- Hovda D.A., Feeney D.M. 1985. Haloperidol blocks amphetamine induced recovery of binocular depth perception after bilateral visual cortex ablation in cat. *Proceedings Western Pharmacology Society* 28, 209 - 211.
- 5 Hovda D.A., Fenney D.M. 1984. Amphetamine with experience promotes recovery of locomotor function after unilateral frontal cortex injury in the cat. *Brain Research* 298, 358 - 361.
- Hovda D.A., Sutton R.L., Feeney D.M. 1987. Recovery of tactile placing after visual cortex ablation in cat: a behavioral and metabolic study of diaschisis. *Experimental Neurology* 97, 391 - 402.
- 10 Kirino T. 1982. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Research* 239, 57 - 69.
- Martinsson L., Eksborg S. 2004. Drugs for stroke recovery: the example of amphetamines. *Drugs Aging* 21, 67 - 79.
- Mintz M., Tomer R. 1986. Exposure to amphetamine after substantia nigra lesion interferes with the process of behavioral recovery. *Pharmacology Biochemistry Behavior* 25, 1307 - 1311:
- 15 Schmanke T.D., Avery R.A., Barth T.M. 1996. The effects of amphetamine on recovery of function after cortical damage in the rat depend on the behavioral requirements of the task. *Journal of Neurotrauma* 13, 293 - 307.
- Semkova I., Schilling M., Henrich-Noack P., Rami A., Krieglstein J. 1996. Clenbuterol protects mouse cerebral cortex and rat hippocampus from ischemic damage and attenuates glutamate neurotoxicity in cultured hippocampal neurons by induction of NGF. *Brain Research* 717, 44 - 54.
- 20 Squire L.R., Zola-Morgan S. 1991. The medial temporal lobe memory system. *Science* 253, 1380 - 1386.
- Stroemer R.P., Kent T.A., Hulsebosch C.E. 1998. Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats. *Stroke* 29, 2381 - 2393.
- Sutton R.L., Hovda D.A., Chen M.J., Feeney D.M. 2000. Alleviation of brain injury-induced cerebral metabolic depression by amphetamine, a cytochrome oxidase histochemistry study. *Neural Plasticity* 7, 109 - 125.
- 25 Sutton R.L., Hovda D.A., Feeney D.M. 1989. Amphetamine accelerates recovery of locomotor function following bilateral frontal cortex ablation in cats. *Behavioral Neuroscience* 103, 837 - 841.
- Teuchert-Noodt G, Dawirs RR, Hildebrandt K. 2000. Adult treatment with methamphetamine transiently decreases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. *Journal Neural Transmission* 107, 133 - 143.
- 30 Wang D., Corbett D. 1990. Cerebral ischemia, locomotor activity and spatial mapping. *Brain Research* 533, 78 - 82.
- Wang Y., Hayashi T., Chang C.F., Chiang Y.H., Tsao L.I., Su T.P., Borlongan C., Lin S.Z. 2001. Methamphetamine potentiates ischemia/reperfusion insults after transient middle cerebral artery ligation. *Stroke* 32, 775 - 782.
- 35 Zola-Morgan S., Squire L.R., Amaral D.G. 1986. Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *Journal of Neuroscience* 6, 2960 - 2967.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una metanfetamina en la fabricación de un medicamento para reducir la aparición de daño o muerte celular cerebral causada por una afección hipóxica y/o isquémica cerebral transitoria en un sujeto, por un procedimiento que comprende las etapas de: identificar un sujeto que tiene una afección hipóxica y/o isquémica cerebral transitoria, y en las 16 horas posteriores a la aparición de la afección, la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un metanfetamina.
- 10 2. Un medicamento que comprende metanfetamina para su uso en la reducción de la aparición de daño o muerte celular cerebral causada por la afección hipóxica y/o isquémica cerebral transitoria en un sujeto, por un procedimiento que comprende las etapas de: identificar a un sujeto que tiene que tiene una afección hipóxica y/o isquémica cerebral transitoria, y en las 16 horas posteriores a la aparición de la afección, la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una metanfetamina.
3. El uso de la reivindicación 1 o el medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la metanfetamina administrada al sujeto en cantidades de dosificación unitaria es de menos de 5 mg / kg.
- 15 4. El uso de la reivindicación 1 o el medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el tratamiento reduce la aparición de daño celular neuronal en las células cerebrales del hipocampo.
5. El uso de la reivindicación 1 o el medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la afección está causada por hipotensión, pérdida de sangre, un ataque al corazón, lesión cerebral traumática, estrangulación, cirugía, un accidente cerebrovascular, neuropatía óptica isquémica u obstrucción de las vías respiratorias.
- 20 6. El uso o medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la afección está causada por cirugía cardíaca.
7. El uso o medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la afección está causada por una lesión cerebral traumática.
- 25 8. El uso de la reivindicación 1 o el medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la administración se produce en las 14 horas posteriores al inicio de la afección y sólo se administra una dosis única de la metanfetamina.
9. El uso de la reivindicación 1 o el medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la administración es mediante inyección en bolo.
- 30 10. El uso o medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la metanfetamina es en una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. El uso o medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la composición farmacéutica es una formulación de liberación prolongada.
12. El uso de la reivindicación 1 o el medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el medicamento consiste en metanfetamina y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 13. El uso de la reivindicación 1 o el medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el sujeto es un ser humano que necesita dicho tratamiento.
14. El uso o medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la afección está causada por un accidente cerebrovascular isquémico, cirugía cardíaca o neuropatía óptica isquémica.
- 40 15. El uso o medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la metanfetamina se administra en las 12 horas posteriores a la cirugía.
16. El uso o medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la metanfetamina se administra en las 2 horas posteriores a la cirugía.
- 45 17. Uso de un metanfetamina en la fabricación de un medicamento para reducir la aparición de daño o muerte celular cerebral causada por una lesión cerebral traumática en un sujeto, por un procedimiento que comprende las etapas de: identificar un sujeto que tiene una lesión cerebral traumática y en las 16 horas posteriores a la aparición de la lesión, la administración al sujeto de una cantidad eficaz terapéutica de un metanfetamina.
- 50 18. Un medicamento que comprende metanfetamina para su uso en la reducción de la aparición de daño o muerte celular cerebral causada por una lesión cerebral traumática en un sujeto, por un procedimiento que comprende las etapas de: identificar un sujeto que tiene una lesión cerebral traumática y en las 16 horas posteriores a la aparición de la lesión, administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un metanfetamina.

19. El uso de la reivindicación 17 o el medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el medicamento consiste en metanfetamina y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

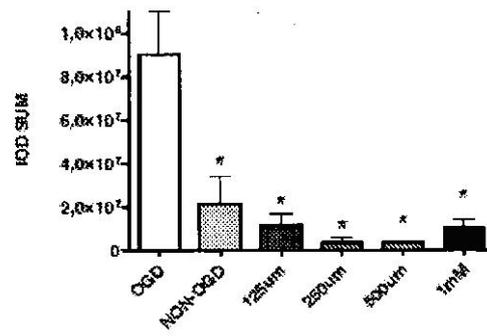
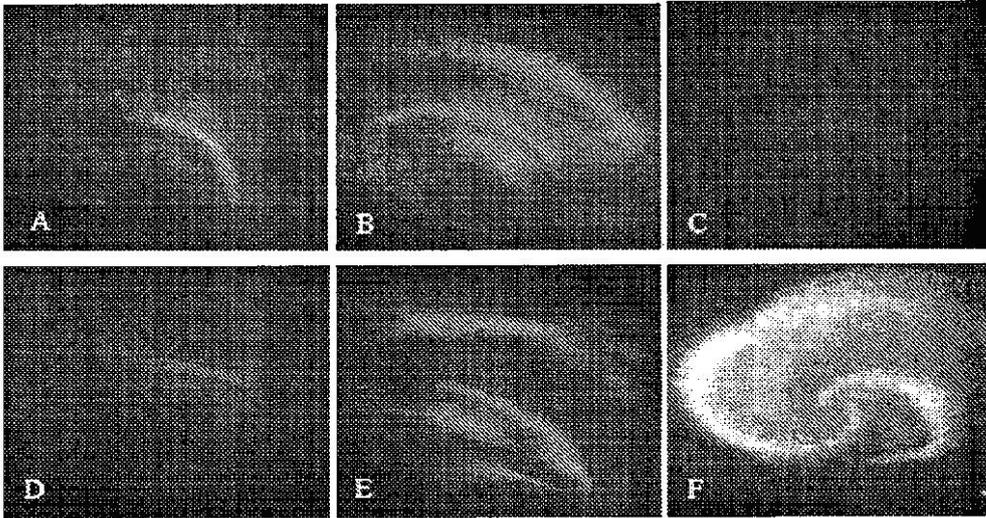


FIGURA 1

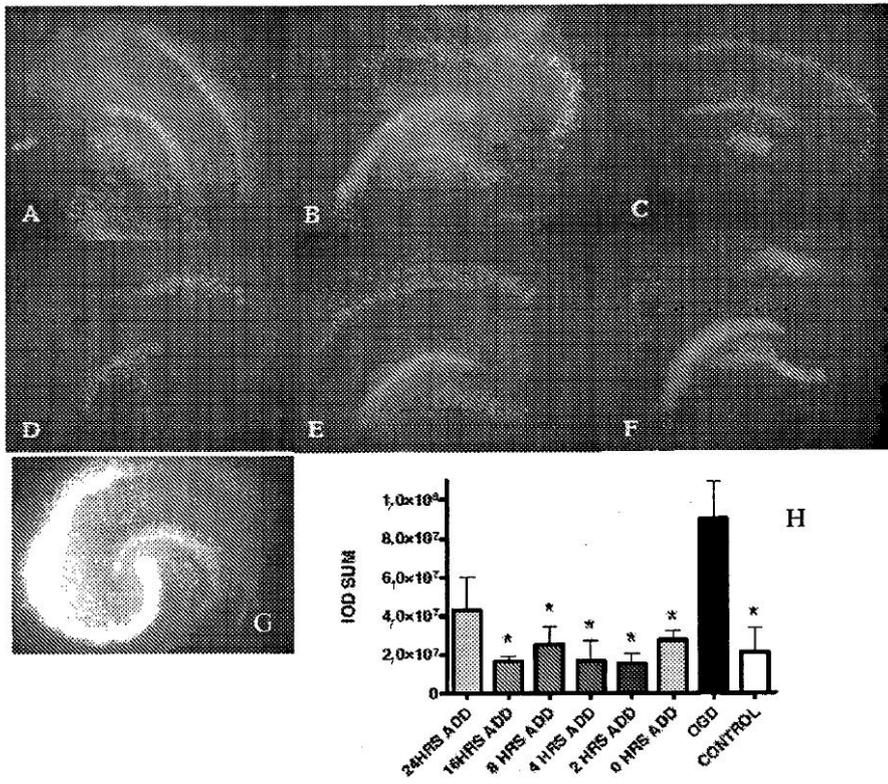


FIGURA 2

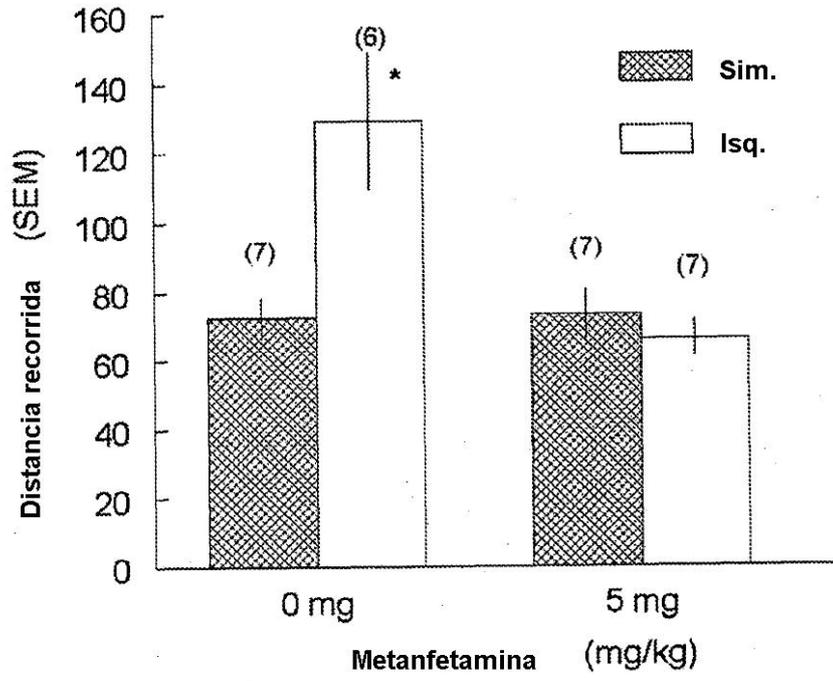


FIGURA 3

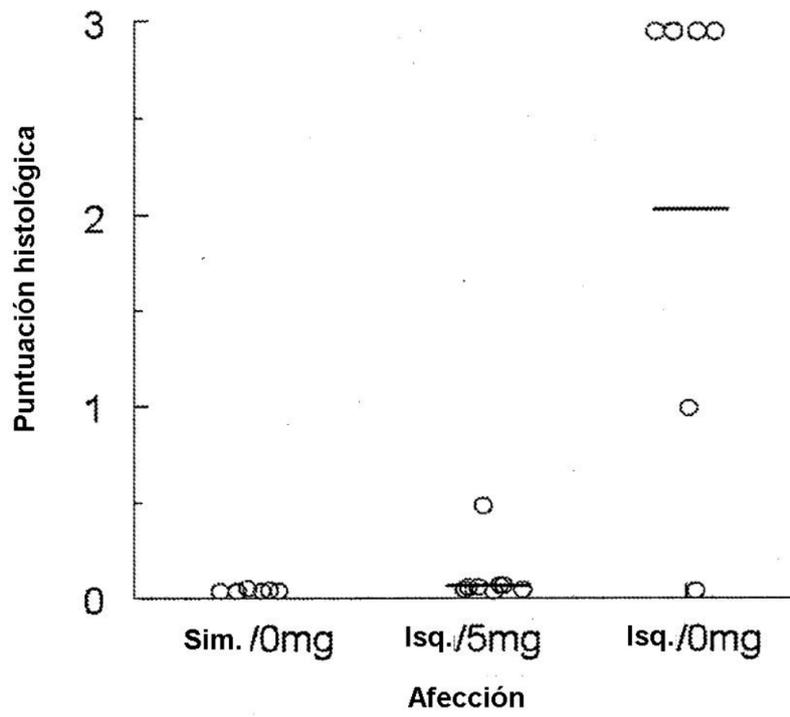


FIGURA 4

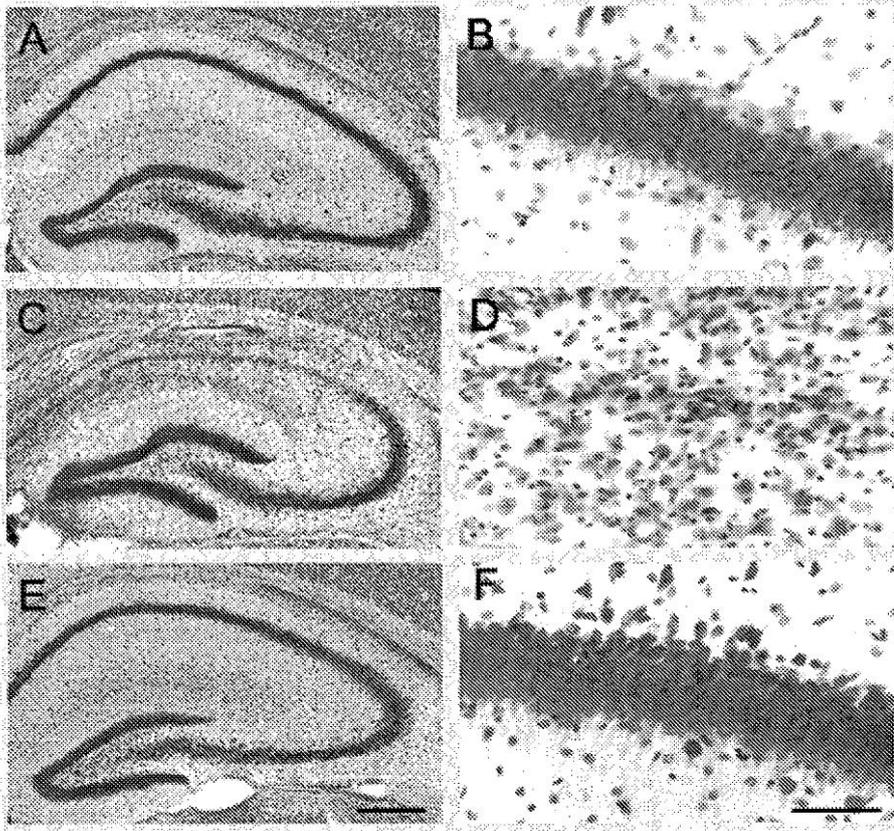


FIGURA 5