

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 557**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19 (2006.01) **A61K 45/06** (2006.01)

A61K 31/20 (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01)

A61K 31/185 (2006.01)

A61K 31/22 (2006.01)

A61K 31/047 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61K 31/23 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2005** **E 05799591 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016** **EP 1796658**

54 Título: **Miméticos dopaminérgicos**

30 Prioridad:

21.09.2004 US 611302 P

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

20.06.2016

73 Titular/es:

BTG INTERNATIONAL LIMITED (100.0%)
5 Fleet Place
London EC4M 7RD, GB

72 Inventor/es:

MARTIN, KEITH FRANK y
HEAL, DAVID JOHN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 574 557 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

Miméticos dopaminérgicos

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para proporcionar alivio sintomático en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP). Más en particular, la invención se refiere a las ventajas inesperadas de elevar las concentraciones en plasma y encefálicas de cuerpos cetónicos para proporcionar alivio sintomático en el tratamiento de EP.

10 La EP fue descrita por vez primera en 1817 como "parálisis agitante" por el médico James Parkinson. Esta enfermedad es un trastorno neurodegenerativo progresivo que procede de la muerte de células que contienen el neurotransmisor de monoamina, dopamina, en regiones específicas del encéfalo. Estas áreas, la sustancia negra y las vías neuronales nigroestriatales, son responsables del control fino del movimiento. Esta pérdida de función dopaminérgica produce un síndrome motor de bradicinesia (movimientos lentos), discinesia (movimientos
15 anómalos), acinesia (rigidez), temblor en reposo e inestabilidad postural. Con frecuencia, la enfermedad provoca también depresión, demencia, cambios de personalidad y déficits del habla. Los síntomas de la EP se agravan gradualmente con el tiempo para conducir a una incapacidad motora casi total.

La farmacoterapia actual repone el déficit en la función de dopamina estriatal para proporcionar alivio sintomático de los déficits motores en EP. Las estrategias farmacológicas para este criterio de valoración incluyen administrar L-DOPA (el precursor metabólico de la dopamina), potenciar las concentraciones sinápticas de dopamina usando inhibidores de recaptación selectivos, evitar el metabolismo de la dopamina usando inhibidores de la monoaminoxidasa o de la catecol-O-metiltransferasa o directamente activar receptores de la dopamina usando agonistas de la dopamina selectivos.

25 Sin embargo, ninguno de estos fármacos es efectivo a largo plazo y su uso está asociado a efectos secundarios graves porque pueden provocar sobreestimulación de los receptores de la dopamina nigroestriatales que se han hecho "supersensibles" como consecuencia del proceso neurodegenerativo. Estos efectos secundarios incluyen movimientos motores anómalos (espasmos, contorsiones, estereotipos orofaciales), el síndrome de "on-off"
30 (periodos de control de movimientos normales seguidos por periodos de rigidez, bradicinesia y temblor), insomnio y psicosis farmacoinducida.

En el caso de los cuerpos cetónicos, se sabe que pueden ser usados por el encéfalo como combustibles metabólicos alternativos a la D-glucosa y ofrecen beneficios neurológicos y psiquiátricos. Por ejemplo, se sabe que
35 los estados neurodegenerativos agudos y crónicos en los mamíferos como, por ejemplo, el ser humano pueden ser tratados induciendo una cetosis. Dicha cetosis puede proporcionarse por restricción de la dieta, por ejemplo por inanición o exclusión de hidratos de carbono, o por administración de materiales cetógenos, tales como triglicéridos, ácidos grasos libres, alcoholes (por ejemplo, butano-1,3-diol), acetoacetato y (R)-3-hidroxiacetato y conjugados de los mismos entre sí y fracciones adicionales, por ejemplo, ésteres y polímeros de los mismos. Los materiales
40 cetógenos producen así una cetosis fisiológicamente aceptable cuando se administran a un paciente.

Las indicaciones terapéuticas adicionales para la aplicación de cetosis incluyen epilepsia, depresión, ansiedad, trastorno esquizoafectivo, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de pánico, trastorno de ansiedad social, trastorno de ansiedad generalizado y trastorno por estrés postraumático, deterioro de la función cognitiva resultante de una
45 neurodegeneración, dolor, diabetes, distrofias y trastornos mitocondriales. En el caso de epilepsia, se ha aplicado dieta cetógena en el tratamiento de convulsiones intratables con cierto éxito durante muchos años, aunque el mecanismo por el que se consigue la supresión de las convulsiones no se conoce con certeza.

Veech, en el documento US-6.207.856, describe el uso de cuerpos cetónicos para el tratamiento de la neurodegeneración, entre otros, la causada por proteínas tóxicas como las encontradas en la enfermedad de
50 Parkinson. Veech enseña que dicho tratamiento puede causar también reinervación debido al efecto neurotrófico en la regeneración de axones. Tieu y col. J. Clin. Invest Sept 2003 Vol. 112, nº 6 confirma estudios anteriores de Hiraide y col. solicitud EP-01/122563.8 de que los cuerpos cetónicos pueden usarse para proteger las mitocondrias del SNC, como sería beneficioso en los aspectos inducidos de defecto de fosforilación oxidativa de la enfermedad de
55 Parkinson.

Los autores de la presente invención han demostrado ahora de forma sorprendente que el aumento en las concentraciones plasmáticas de cuerpos cetónicos produce cambios imprevistos en la actividad eléctrica del encéfalo similares a los evocados por fármacos dopaminérgicos usados para proporcionar alivio sintomático en el

tratamiento de la EP y otros trastornos del SNC derivados de déficit de dopamina en el encéfalo. Por otra parte, la presente invención proporciona la ventaja terapéutica adicional de que la cetogenia como tratamiento clínico para EP tiene lugar sin efecto estimulante lo que indica que la cetogenia estará desprovista de los graves efectos secundarios dopaminérgicos de movimientos motores anómalos, síndrome de "on-off", insomnio o psicosis farmacoinducida debido a que los animales no mostraron signos de estimulación de la conducta debida a activación de receptores de la dopamina en las concentraciones plasmáticas terapéuticas predichas de cuerpos cetónicos.

Así, mientras el uso en el estado de la técnica de la cetogenia se aplica al tratamiento de la degeneración, la presente invención permite la administración de materiales cetógenos con el fin de proporcionar un efecto dopaminérgico, y puede proporcionarse cuando la degeneración de la sustancia negra y las vías nigroestriatales ha avanzado más allá del punto en el que sería de esperar efectividad en la interrupción de la neurodegeneración, al menos en la instauración aguda.

El análisis de los potenciales del campo cerebral ("Tele-Stereo-EEG") ha demostrado ser una herramienta muy sensible para la caracterización de los efectos farmacológicos en el sistema nervioso central (Dimpfel y col., 1986). Después de la administración de un fármaco activo centralmente, los cambios cuantitativos en los potenciales de campo cerebral pueden considerarse una huella característica de ese fármaco en particular. Se han obtenido "huellas" de más de 100 compuestos entre ellos 8 categorías de fármacos establecidas, por ejemplo estimulantes, sedantes, alucinógenos, tranquilizantes, analgésicos, antidepresivos, neurolépticos y narcóticos. Dosificaciones diferentes del mismo fármaco provocan cambios cuantitativos en la potencia eléctrica. Por tanto, esta metodología muestra también posibles relaciones dosis-respuesta. La comparación directa con fármacos de referencia específicos, o mediante análisis discriminante con referencia a una extensa base de datos de estas huellas, permite la detección de cualquier posible semejanza con fármacos establecidos. En general, las "huellas" muestran diferencias destacadas para fármacos prescritos para diferentes indicaciones y son similares para fármacos con una indicación similar (Dimpfel, 2003). Además, el patrón de cambios EEG en la rata es una herramienta útil en la predicción de posibles cambios en el espectro de potencia EEG en seres humanos.

Aplicando esta técnica a la cetogenia, en particular la inducida por administración directa de un material cetógeno tal como la sal sódica de (R)-3-hidroxi-butarato, los autores de la presente invención han sido capaces claramente de mostrar cambios EEG consistentes con la acción expuesta anteriormente que son eficaces en el tratamiento sintomático de la EP y otros trastornos del SNC derivados de déficit de dopamina en el encéfalo.

Así en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona material cetógeno tal como se define en la reivindicación adjunta para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto que necesita terapia aguda para el tratamiento agudo de los síntomas de enfermedad de Parkinson, por ejemplo, uno o más de entre síndrome motor de bradicinesia (movimientos lentos), discinesia (movimientos anómalos), acinesia (rigidez), temblor en reposo, inestabilidad postural y déficits del habla que comprende la administración a dicho sujeto de una dosis terapéuticamente efectiva de un material cetógeno. Preferentemente la dosis es suficiente para producir una cetosis terapéuticamente efectiva.

Por tratamiento agudo se incluye en particular el alivio de los síntomas durante el periodo de cetosis, es decir, con la instauración de alivio en unos minutos o hasta dos horas desde el inicio de la cetosis. Esto contrasta con el tratamiento que tiene efecto después de unos días o meses tal como se contempla en el estado de la técnica.

La cetosis producida es preferentemente un estado en el que los niveles de las concentraciones de acetoacetato y/o (R)-3-hidroxi-butarato en la sangre del sujeto están elevados. Preferentemente la concentración total de estos "cuerpos cetónicos" en la sangre está elevada por encima de los niveles suministrados normales a entre 0,1 y 30 mM, más preferentemente a entre 0,2 y 15 mM, y con la máxima preferencia a entre 0,5 y 8 mM. Para el objetivo de elevar al máximo los niveles de dichos compuestos en el SNC es conveniente saturar el transportador a través del cual el (R)-3-hidroxi-butarato atraviesa la barrera hematoencefálica: esto sucede a entre 1 y 5 mM.

En su interpretación más extensa, el material cetógeno puede ser cualquiera de los usados en el tratamiento de epilepsia refractaria, tales como cremas y grasas combinadas con bajos hidratos de carbono y posiblemente alto contenido en proteínas, tal como se expone por ejemplo en el documento US-6.207.856 (Veech). Sin embargo, con el fin de evitar las consecuencias no deseadas de dichas dietas, los materiales preferidos se seleccionan de entre el (R)-3-hidroxi-butarato, las sales, los ésteres y los oligómeros de los mismos. También se desvelan conjugados de éstos con otras fracciones fisiológicamente aceptables, tales como carnitina y otros aminoácidos. Otros materiales divulgados son precursores metabólicos de cetonas tales como (R)-1,3-butanodiol, triacetina, ácidos grasos libres, triglicéridos y ésteres de sacáridos.

Se conocen materiales particulares a partir de las siguientes referencias tal como se exponen en la Tabla 1 mostrada a continuación. Las dosis y los formatos son tal como se describen en los documentos identificados en la tabla. Normalmente la cantidad de material cetógeno necesario puede determinarse midiendo las concentraciones en sangre mediante el uso directamente de un dispositivo de medida tal como Medisense Precision Extra (MedisenseInc, 4A Crosby Drive Bedford, MA 01730); BioScanner 2000 (antes llamado MTM BioScanner 1000) de Polymer Technology Systems Inc. Indianápolis, Indiana. De esta manera puede determinarse la cantidad de cetosis derivada de una dosis establecida, y la dosis repetida para adecuarse a cada individuo.

- 10 Los intervalos típicos de dosis pueden estar comprendidos por ejemplo en el intervalo de 5 a 5.000 mg/kg de peso corporal, en particular para un material que contiene (R)-3-hidroxi-butilato tal como (R)-3-hidroxi-butilato oligómero o sus ésteres con, por ejemplo, glicerol o (R)-butano-1,3-diol, más preferentemente de 30 a 2.000 mg/kg de peso corporal, con la máxima preferencia de 50 a 1.000 mg/kg de peso corporal al día. Las dosis se suministran convenientemente con las comidas cuando se administran por vía oral, convenientemente antes de o al mismo tiempo que dichas comidas. Se alcanzan niveles en sangre regulares de forma más fácil con dosis administradas tres o cuatro veces al día.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un material cetógeno para la fabricación de un medicamento para el tratamiento agudo de enfermedad de Parkinson. De nuevo, los materiales cetógenos adecuados son tal como se describe y se ilustra en la Tabla 1.

TABLA 1

Material	Tipo	Referencia
(R)-3-hidroxi-butilato de sodio	Salt	US-4.579.955 US-4.771.074
(R)-1,3-butanodiol	Precursor metabólico	Guedry & Bralet (1994) Metabolic Brain Diseases 9(2): 171-181
Acetoacetilbutanodiol	Precursor metabólico	US-4.997.976 US-5.126.373
BHB dímero y trímero	Precursor metabólico	JP-5.009.185 JP-2.885.261
Acetoacetiltri-3HB	Precursor metabólico	US-6.207.856
Triglicérido de cadena media	Precursor metabólico	WO-01/82.928
Triolide	Precursor metabólico	WO-00/15.216 WO-00/04.895
Triglicérido de (R)-3-hidroxi-butilato	Precursor metabólico	US-5.420.335 US-6.306.828
Multímeros/sacáridos de (R)-3-hidroxi-butilato	Precursor metabólico	WO-00/14.985 WO-04/077.938

- 25 En particular el medicamento es para el alivio sintomático agudo del síndrome motor de bradicinesia (movimientos lentos), discinesia (movimientos anómalos), acinesia (rigidez), temblor en reposo e inestabilidad postural. Como tratamiento agudo se incluye en particular la reducción de dichos síntomas durante el periodo en el que los niveles de cuerpos cetónicos están elevados, a diferencia del tratamiento de acción más crónico o retardado propuesto por el estado de la técnica cuando se interrumpe o se revierte la neurodegeneración. Otros síntomas de la EP tratados mediante el presente procedimiento son los cambios de personalidad y los déficits del habla.

Un tercer aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Parkinson, que comprende como ingrediente activo un material cetógeno tal como se define en las reivindicaciones.

- 35 La composición incluye preferentemente materiales diluyentes, excipientes y/o vehículos.

A continuación se describirá la presente invención por medio de los siguientes Ejemplos y Figuras no limitativos. A la vista de los mismos, los expertos en la materia encontrarán realizaciones adicionales que se encuadren dentro del ámbito de las reivindicaciones en la presente memoria descriptiva.

FIGURAS**FIGURAS**

5 Figura 1: Cambios en 24 variables y cambios de frecuencia en regiones encefálicas individuales. La varianza/covarianza se estimó sobre la base de 88 grupos de parte de nuestras bases de datos de fármacos de referencia con un total de 674 experimentos realizados en condiciones idénticas. Variables: intervalo de frecuencia - región encefálica *F>2,10 corresponde a p<0,05 y **F>2,80 corresponde a p<0,01. Para evaluación de 24 variables: *F>1,52 corresponde a p<0,05 y **F>1,79 corresponde a p<0,01. Número de experimentos: n=12 (100 mg/kg); n=12
10 (300 mg/kg); n=11 (600 mg/kg); n=11 (1.000 mg/kg). Valores F – estadísticas para diversos periodos de tiempo después de una única inyección intraperitoneal de BHB de sodio (KTX 0101): 100, 300, 600 ó 1.000 mg/kg de peso corporal.

Figura 2: Acción de vehículo (n=13) en la potencia eléctrica de cuatro áreas de cerebro de rata. Cambios
15 dependientes del tiempo (cambio porcentual de valores pre-fármaco) en patrones espectrales EEG (60 min cada uno) durante 300 min después de aplicación de dosis única i.p. Definición de intervalos de frecuencia: delta (1,25-4,5 Hz, rojo), theta (4,75-6,75 Hz, naranja), alfa1 (7,00-9,50 Hz, amarillo), alfa2 (9,75-12,50 Hz, verde), beta1 (12,75-18,50 Hz, azul claro), beta2 (18,75-35,00 Hz, azul oscuro).

20 Figura 3: Acción de BHB 100 mg/kg (n=12) en la potencia eléctrica de cuatro áreas de cerebro de rata. Cambios dependientes del tiempo (cambio porcentual de valores pre-fármaco) en patrones espectrales EEG (60 min cada uno) durante 300 min después de aplicación de dosis única i.p. Definición de intervalos de frecuencias véase fig. 2.

Figura 4: Acción de BHB 300 mg/kg (n=12) en la potencia eléctrica de cuatro áreas de cerebro de rata. Cambios
25 dependientes del tiempo (cambio porcentual de valores pre-fármaco) en patrones espectrales EEG (60 min cada uno) durante 300 min después de aplicación de dosis única i.p. Definición de intervalos de frecuencias véase fig. 2.

Figura 5: Acción de BHB 600 mg/kg (n=11) en la potencia eléctrica de cuatro áreas de cerebro de rata. Cambios
30 dependientes del tiempo (cambio porcentual de valores pre-fármaco) en patrones espectrales EEG (60 min cada uno) durante 300 min después de aplicación de dosis única i.p. Definición de intervalos de frecuencias véase fig. 2.

Figura 6: Acción de BHB 1.000 mg/kg (n=11) en la potencia eléctrica de cuatro áreas de cerebro de rata. Cambios
dependientes del tiempo (cambio porcentual de valores pre-fármaco) en patrones espectrales EEG (60 min cada uno) durante 300 min después de aplicación de dosis única i.p. Definición de intervalos de frecuencias véase fig. 2.

35 Figura 7: Semejanza de las "huellas de qEEG" de KTX 0101 (BHB de sodio) en comparación con diferentes clases de fármacos usando análisis discriminante durante el periodo "20° a 50° min después de aplicación de dosis única". Obsérvense los diferentes sombreados para la clasificación de diferentes acciones de fármacos.

40 Figura 8: Efecto de inyección intraperitoneal de varias dosis de KTX 0101 en concentraciones plasmáticas de (R)-3-hidroxi-butarato (BHB). Curso de acción en el tiempo para grupos de 4-6 ratas. Significativamente diferentes de los valores de control de referencia para prueba t, *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001.

Figura 9: Efecto de inyección intraperitoneal de varias dosis de KTX 0101 en concentraciones plasmáticas de
45 acetoacetato. Aumento 30 minutos después de dosificación para grupos de 6 ratas. Significativamente diferentes de los valores de control de referencia para prueba t, *p<0,05, *** p<0,001.

EJEMPLOS**50 Medidas de EEG**

En ratas Fisher adultas (4-6 meses de vida y conversión día-noche, peso corporal de aproximadamente 400 g) se implantaron 4 electrodos de acero concéntricos bipolares usando un procedimiento quirúrgico estereotáxico. De acuerdo con las coordenadas de Paxinos y Watson (1982), los cuatro electrodos se colocaron 3 mm laterales en el
55 hemisferio izquierdo. Las coordenadas anteriores fueron 12,2, 5,7, 9,7 y 3,7 mm para corteza frontal, hipocampo, cuerpo estriado y formación reticular, respectivamente. Se fijó una placa de base que llevaba los electrodos y una toma de 5 derivaciones al cráneo mediante cemento dental a 3 tornillos de acero fijados en el cráneo. Se dio a los animales dos semanas para su recuperación de la intervención quirúrgica.

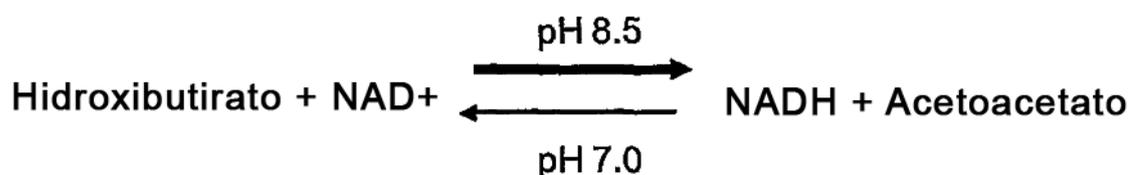
Se registraron las señales EEG de la corteza frontal, el hipocampo, el cuerpo estriado y la formación reticular y se amplificaron y procesaron tal como describen Dimpfel y col. (1986). Después del rechazo automático de artefactos, se recopilaron las señales en barridos de 4 s de duración y se sometieron a transformadas de Fourier rápidas. Se dividieron los espectros de potencia eléctrica resultantes en 6 intervalos de frecuencia: delta (0,8-4,5 Hz); theta (4,75-6,75 Hz); alfa1 (7,00-9,50 Hz); alfa2 (9,75-12,50 Hz); beta (12,75-18,50 Hz); beta2 (18,75-35,00 Hz). Se promediaron los espectros en etapas de 3 minutos cada una y se visualizaron en línea. En un procedimiento fuera de línea se promediaron los espectros para proporcionar periodos de 15 minutos o más para posterior análisis estadístico.

- 10 Se administraron cuatro dosis de KTX 0101 ((R)-3-hidroxi-butirato de sodio: 100, 300, 600 y 1.000 mg/kg de peso corporal) (suministrado por Solvias AG, CH 4002 Basilea, Suiza, lote n°: SO-1058.047.1.120) y un control de vehículo (suero salino al 0,9% p/v) por vía intraperitoneal a un grupo de 12 animales usando un diseño cruzado con al menos 3 fármacos entre las aplicaciones. Después de un periodo de pre-fármaco de 45 minutos para registro de referencia, se observaron los efectos farmacológicos de forma continua durante 300 minutos. Los cambios en la potencia eléctrica ($\mu\text{V}^2/\text{W}$) se expresan en forma de porcentaje de los valores de pre-fármaco de 45 minutos. Los valores estadísticos multivariantes se calcularon de acuerdo con Ahrens y Läuter (1974).

Determinación en plasma de (R)-3-hidroxi-butirato y acetoacetato

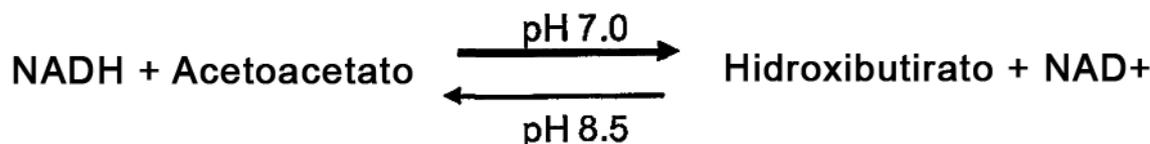
- 20 Se usaron 171 ratas macho Sprague-Dawley (intervalo de pesos 200-250 g) alojadas en un ciclo estándar de luz/oscuridad. Los animales tenían acceso libre a una dieta estándar en pellets para ratas y a agua del grifo en todo momento. Se administró KTX 0101 ((R)-3-hidroxi-butirato de sodio; 100, 300, 600 y 1.000 mg/kg de peso corporal) suministrado por Sigma (H6501, Lote 111K2618) por inyección intraperitoneal. Los animales de control recibieron el vehículo salino al 0,9% apropiado por la misma vía. Se sacrificó a los animales con asfixia con CO_2 0 h, 0,5 h, 1,0 h o 2,0 h después de la administración de la dosis y se recogió una muestra de sangre terminal por punción cardiaca. Se tomó sangre en tubos heparinizada con litio y se guardó en hielo antes de la centrifugación para producir las muestras de plasma para el análisis.

- Los kits de ensayo clínico comerciales para la determinación de D- β -hidroxi-butirato se obtuvieron de Randox Laboratories (Antrim, RU). El kit cuantificó NADH a través de la actividad de β -hidroxi-butirato-deshidrogenasa medida como un aumento en el valor de DO340nm. Es necesario un pH alcalino para impulsar el equilibrio de la reacción hacia la producción de NADH y acetoacetato.



- 35 Este ensayo espectrofotométrico se modificó para la aplicación a un formato de microplacas de 96 pocillos. A continuación se determinó la velocidad de reacción a partir del incremento en la DO340nm durante 1 minuto de curso temporal, después de permitir el periodo necesario para que se asentara la velocidad de reacción.

- 40 El ensayo desarrollado para la determinación de acetoacetato se basó en ensayos clínicos publicados anteriormente (Li y col., 1980; McMurray y col., 1984). Se preparó un tampón de ensayo diferente (Na_2PO_4 0,1 M ajustado a pH 7,0 con HCl) con el fin de desplazar el equilibrio de la reacción hacia la producción de β -hidroxi-butirato y NAD^+ . Otras modificaciones incluyeron el uso adicional de oxalato de sodio para una concentración final de ensayo de 20 mM con el fin de inhibir la lactato-deshidrogenasa (LDH) presente en las muestras de plasma. Por tanto, el reactivo optimizado final contenía NADH 0,3 mM, oxalato 20 mM, 0,5 U/ml de β -hidroxi-butirato-deshidrogenasa y tampón de fosfato 0,1 M a pH 7,0.



Se midió el acetoacetato por medio de la reducción en la DO340nm durante un periodo de 1 minuto después de permitir que se asentara la velocidad de reacción.

Resultados

5

Medidas EEG

La administración intraperitoneal de suero salino al 0,9% p/v no produjo cambios significativos en el espectro de potencia EEG en comparación con los valores pre-fármaco (Fig. 2).

10

KTX 0101 (100 mg/kg de peso corporal). La administración de esta dosis más elevada de KTX 0101 produjo cambios de frecuencia, especialmente en el hipocampo y algo menos en la formación reticular. Todas las regiones mostraron una disminución de la potencia eléctrica principalmente con respecto a alfa2 y en menor medida con respecto a las frecuencias delta. En el hipocampo la potencia theta, alfa1 y beta1 también disminuyó (Fig. 3). Los efectos duraron sólo 1-2 horas. Sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos (Fig. 1).

15

KTX 0101 (300 mg/kg de peso corporal). KTX 0101 300 mg/kg i.p. produjo un patrón consistente de cambios de frecuencia caracterizado por descensos en la potencia alfa2 en todas las regiones encefálicas. Además, la potencia delta cambió en todas las regiones, aunque en menor medida. El patrón de cambios (Fig. 4) duró exactamente 2 horas. Los cambios sólo fueron estadísticamente significativos en la formación reticular (Fig. 1).

20

KTX 0101 (600 mg/kg de peso corporal). KTX 0101 600 mg/kg i.p. produjo un patrón de cambios similar al observado después de 300 mg/kg. Los efectos duraron generalmente 2 horas excepto para la formación reticular, donde las disminuciones de potencia persistieron durante la tercera hora (Fig. 5). Los resultados fueron estadísticamente significativos, incluyendo la primera hora en el cuerpo estriado. Considerando las 24 variables (6 frecuencias en las cuatro áreas del encéfalo), el efecto global también fue estadísticamente significativo (Fig. 1).

25

KTX 0101 (1.000 mg/kg de peso corporal). La administración de KTX 0101 1.000 mg/kg indujo un patrón idéntico de cambio, aunque con disminuciones más acusadas de potencia en la tercera hora y, con respecto a la formación reticular, en todo el tiempo experimental de 5 horas (Fig. 6). De nuevo, estos cambios fueron estadísticamente significativos, incluso para la 4ª hora en la formación reticular (Fig. 1).

30

En resumen, pudieron observarse claros estadísticamente significativos dependientes del tiempo y de la dosis después de la administración de KTX 0101 en un intervalo de dosis de 300 a 1.000 mg/kg i.p.

35

Concentraciones en plasma de (R)-3-hidroxitirato y acetoacetato

KTX 0101 (100, 300, 600 y 1.000 mg/kg i.p.), cuando se inyecta por vía intraperitoneal, produjo aumentos claros dependientes de la dosis en la concentración en plasma de (R)-3-hidroxitirato (Fig. 8). El efecto tuvo lugar rápidamente después de la inyección de KTX 0101 con las elevaciones máximas en (R)-3-hidroxitirato observadas en los primeros 30 min en la muestra. Posteriormente, la concentración de estos 2 cuerpos cetónicos se redujo rápidamente y recuperó los valores de control 1 hora después de la inyección de KTX 0101 (Fig. 8). Cuando se analizaron los niveles en plasma de acetoacetato en las muestras de un subgrupo (24) de estas ratas, KTX 0101 también aumentó significativamente la concentración en plasma de acetoacetato 30 min después de la administración en dosis de 600 y 1.000 mg/kg (Fig. 9).

40

45

Discusión

Una única inyección intraperitoneal de KTX 0101 en el intervalo de 100 a 1.000 mg/kg indujo cambios claros dependientes de la dosis en el espectro de potencia EEG en ratas en movimiento libre. A dosis de 300 mg/kg, estos cambios sólo fueron estadísticamente significativos en comparación con un vehículo en la formación reticular (Figura 1). Sin embargo en las 2 dosis más elevadas, se observaron también cambios significativos en la corteza frontal, el hipocampo y el cuerpo estriado (Figura 1). Los cambios fueron máximos en la primera 1 hora después de la inyección de KTX 0101. Los cambios observados afectaron a todas las frecuencias, excepto en el intervalo beta2, con los efectos más sobresalientes en las frecuencias delta y alfa2.

50

55

En relación con los cambios específicos de frecuencia observados, todos los fármacos que actúan para potenciar la función dopaminérgica en el encéfalo, por ejemplo, los precursores de dopamina (L-DOPA), los agentes de liberación de dopamina (anfetamina) o los agonistas dopaminérgicos (SKF 38393), reducen las frecuencias delta,

theta y alfa2 (Dimpfel y col., 1987; Dimpfel, 2003). Así, las disminuciones en la actividad delta, theta y alfa2 están también asociadas generalmente con un aumento en la activación de la conducta y el estado de alerta. La capacidad de potenciar la función dopaminérgica en el encéfalo es el mecanismo terapéutico que usan los principales fármacos para proporcionar alivio sintomático en caso de EP, es decir, L-DOPA, inhibidores de la recaptación de dopamina selectivos, inhibidores de la monoaminoxidasa o la catecol-O-metiltransferasa o agonistas de dopamina selectivos. La capacidad de KTX 0101 de reducir las frecuencias EEG delta, theta y alfa2 es consistente con la hipótesis de que este compuesto potencia indirectamente la función dopaminérgica en el encéfalo, y como consecuencia de esta acción, será beneficioso en el tratamiento sintomático de la EP y otros trastornos del SNC que se deben a déficit de dopamina en el encéfalo.

10

La diferenciación estadística de la acción del fármaco es posible también usando la herramienta matemática del análisis discriminante. Con 6 intervalos de frecuencias y 4 áreas diferentes del encéfalo los cálculos se realizan con 24 variables. En la Fig. 7 se muestran los resultados para un periodo de tiempo. Debe observarse que además de los 2 ejes de proyección, los resultados de la función discriminante tercero a quinto se representan mediante el uso de una mezcla de colores aditivos (similar a la usada en la TV en color). Así, no sólo se usa una proyección bidimensional para la clasificación de la "huella", sino también el color. El análisis de los efectos EEG de BHB también sitúa este compuesto en estrecha proximidad con el inhibidor de recaptación de la dopamina, el agente de liberación de cocaína y dopamina, la d-anfetamina (Figura 7), lo que sustenta aún más la hipótesis de que KTX 0101 será beneficioso en el tratamiento sintomático de la EP y otros trastornos del SNC debidos a déficit de dopamina en el encéfalo.

20

La clara evidencia de que las elevaciones en las concentraciones de cuerpos cetónicos son responsables de los efectos observados de KTX 0101 en los patrones EEG procede del análisis farmacocinético de los cuerpos cetónicos en plasma después de la inyección de KTX 0101 (100, 300, 600 y 1.000 mg/kg i.p.). Se evocaron sólo cambios significativos en los patrones EEG (Tabla 2) con dosis de KTX 0101, es decir, 300, 600 y 1.000 mg/kg, que produjeron elevaciones importantes en los niveles en plasma cuerpos cetónicos, es decir, (R)-3-hidroxi butirato y acetoacetato (Figuras. 8 y 9). Por otra parte, los cambios más importantes en los patrones EEG tuvieron lugar en el periodo de 5 a 65 min (Figura 1) lo cual es consistente con los aumentos máximos en las concentraciones en circulación de los cuerpos cetónicos (Figuras 8 y 9).

30

Referencias

Ahrens H, Läuter J (1974). *Mehrdimensionale Varianzanalyse*. Akademie-Verlag, Berlin.

35 Biederman J, Spencer T (1999). Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Pediatr Psychopharmacol Biol Psychiat* 1: 1234-1242.

Dimpfel W (2003). Preclinical data base of pharmaco-specific rat EEG fingerprints (Tele-Stereo-EEG). *Eur J Med Res* 8: 199-207.

40

Dimpfel W, Schober F (2001). Norepinephrine, EEG theta waves and sedation. *Brain Pharmacology* 1: 89-97.

45 Dimpfel W, Spüler M, Nickel B (1986). Radioelectroencephalography (Tele-Stereo-EEG) in the rat as a pharmacological model to differentiate the central action of flupirtine from that of opiates, diazepam and phenobarbital. *Neuropsychobiology* 16: 163-168.

Gueldry S, Bralet J (1994). Effect of 1,3-butanediol on cerebral energy metabolism. Comparison with beta-hydroxybutyrate. *Metab Brain Dis* 9: 171-181.

50 Li PK, Lee JT, MacGillivray MH, Schaefer PA, Siegel JH (1980). Direct, fixed-time kinetic assays for β -hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyser or a computer-backed spectrophotometer. *Clin Chem* 26:1713-1717.

McMurray CH, Blanchflower WJ, Rice DA (1984) 1984;. Automated kinetic method for D-3-hydroxybutyrate in plasma or serum. *Clin Chem* 30:421-425.

Paxinos G, Watson C (1982). *The rat brain in stereotactic coordinates*, Academic Press, New York.

REIVINDICACIONES

1. Un material cetógeno seleccionado de entre (R)-3-hidroxiacetato, (R)-3-hidroxiacetato oligómero y ésteres de (R)-3-hidroxiacetato con glicerol o (R)-butano-1,3-diol, para su uso en el suministro de un alivio
5 sintomático agudo para los síntomas de la enfermedad de Parkinson resultantes de un déficit de dopamina en el
encéfalo por administración a una dosis de 50 a 1.000mg/kg de peso corporal al día para producir una cetosis de tal
manera que la concentración total de acetoacetato y (R)-3-hidroxiacetato en la sangre se eleva a entre 0,5 y 8mM;

caracterizado porque

10

la administración proporciona una dosis terapéuticamente efectiva del material cetógeno para el alivio sintomático
agudo de uno o más de los síntomas del síndrome motor de bradicinesia (movimientos lentos), discinesia
(movimientos anómalos), acinesia (rigidez), temblor en reposo, inestabilidad postural y déficits del habla;

15

donde estos síntomas se reducen durante este periodo de cetosis, con la instauración de alivio sintomático en un
máximo de dos horas desde el inicio de la cetosis.

Fig.1.

Tiempo	5 - 65 min	65 - 125 min	125 - 185 min	185 - 245 min	245 - 305 min
24 variables					
100mg/kg	0,63	0,34	0,57	0,28	0,26
300mg/kg	1,23	1,24	0,55	0,42	0,63
600mg/kg	1,89**	1,16	0,58	0,47	0,54
1000mg/kg	2,72**	1,97**	1,28	1,27	1,03
Corteza frontal					
100mg/kg	0,97	0,45	0,23	0,20	0,27
300mg/kg	2,26	1,92	0,52	0,30	0,60
600mg/kg	4,44**	1,67	0,41	0,36	0,85
1000mg/kg	7,52**	3,18*	2,05	1,20	0,86
Hipocampo					
100mg/kg	1,36	0,63	0,65	0,47	0,39
300mg/kg	1,89	1,97	0,70	0,61	0,85
600mg/kg	3,84**	1,94	0,52	0,45	0,19
1000mg/kg	5,00**	2,66*	1,05	0,32	0,54
Cuerpo estriado					
100mg/kg	0,54	0,17	0,15	0,16	0,23
300mg/kg	0,99	0,99	0,55	0,33	0,56
600mg/kg	2,54*	0,72	0,80	0,87	1,50
1000mg/kg	3,80**	1,83	0,59	0,27	0,62
Formación reticular					
100mg/kg	1,55	0,54	0,39	0,14	0,31
300mg/kg	3,03*	3,14*	0,65	0,24	0,70
600mg/kg	4,84**	3,10*	0,62	0,22	0,35
1000mg/kg	6,28**	5,12**	2,57*	2,72*	2,26

Fig.2.

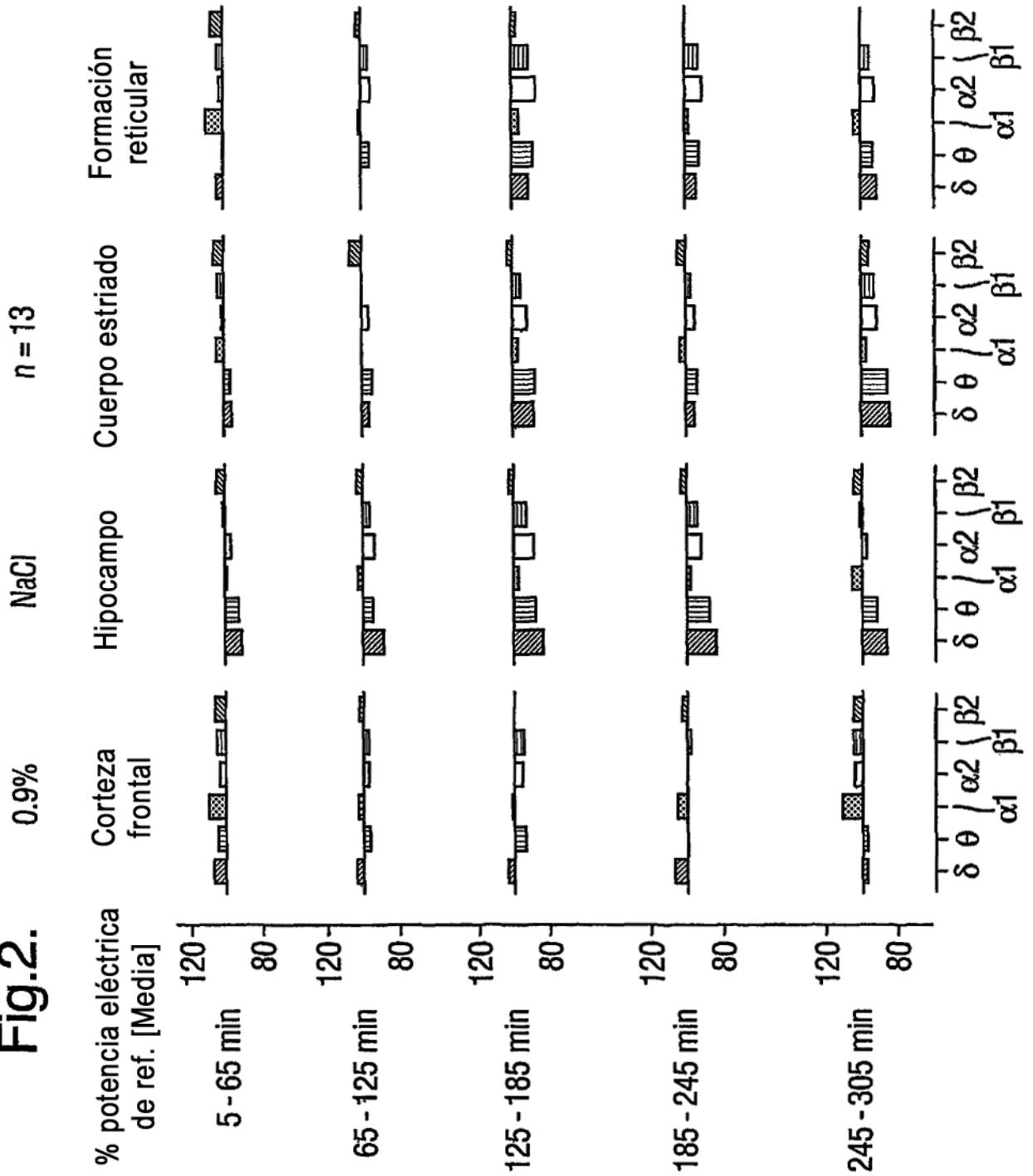


Fig.3.

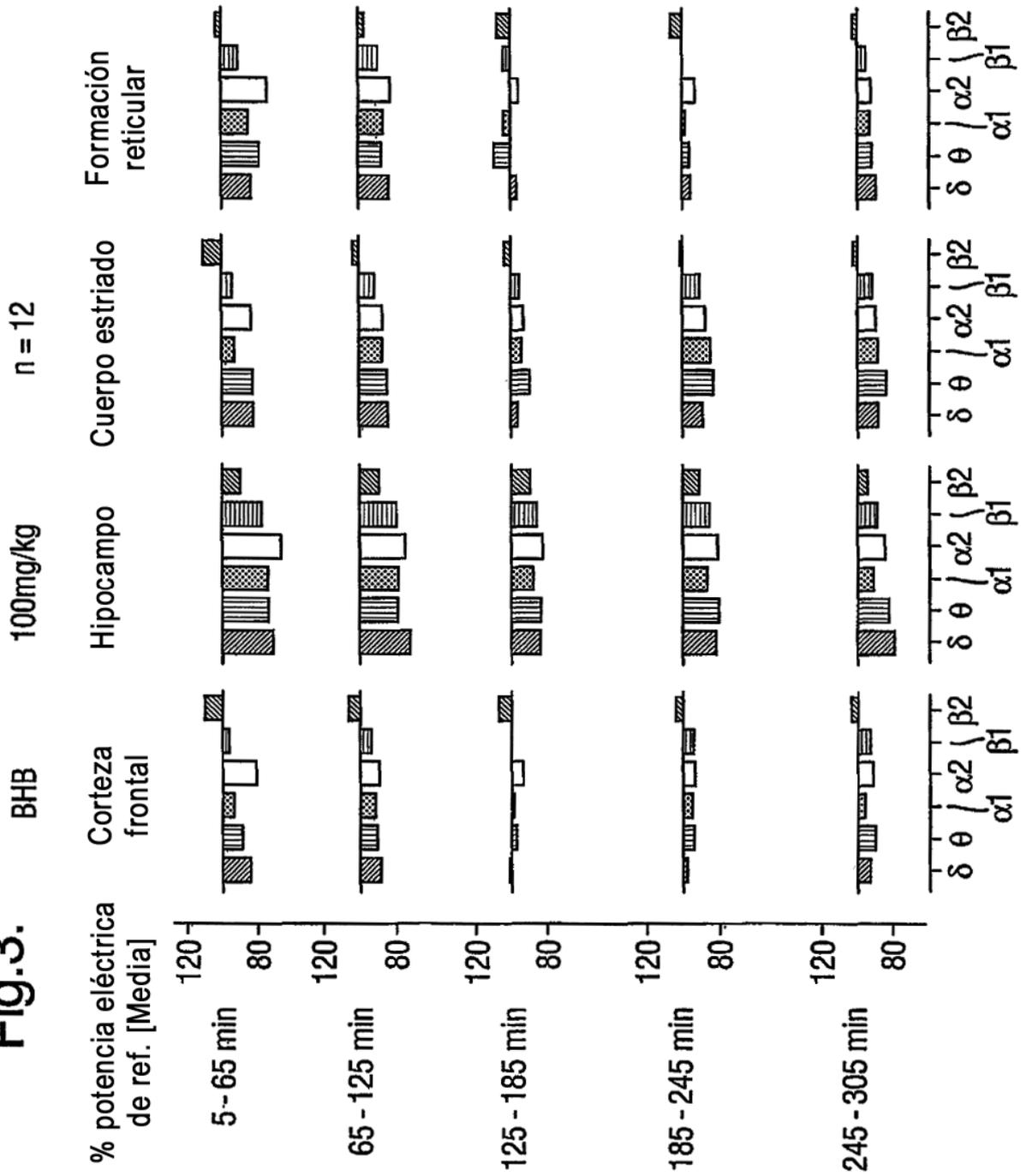


Fig.4.

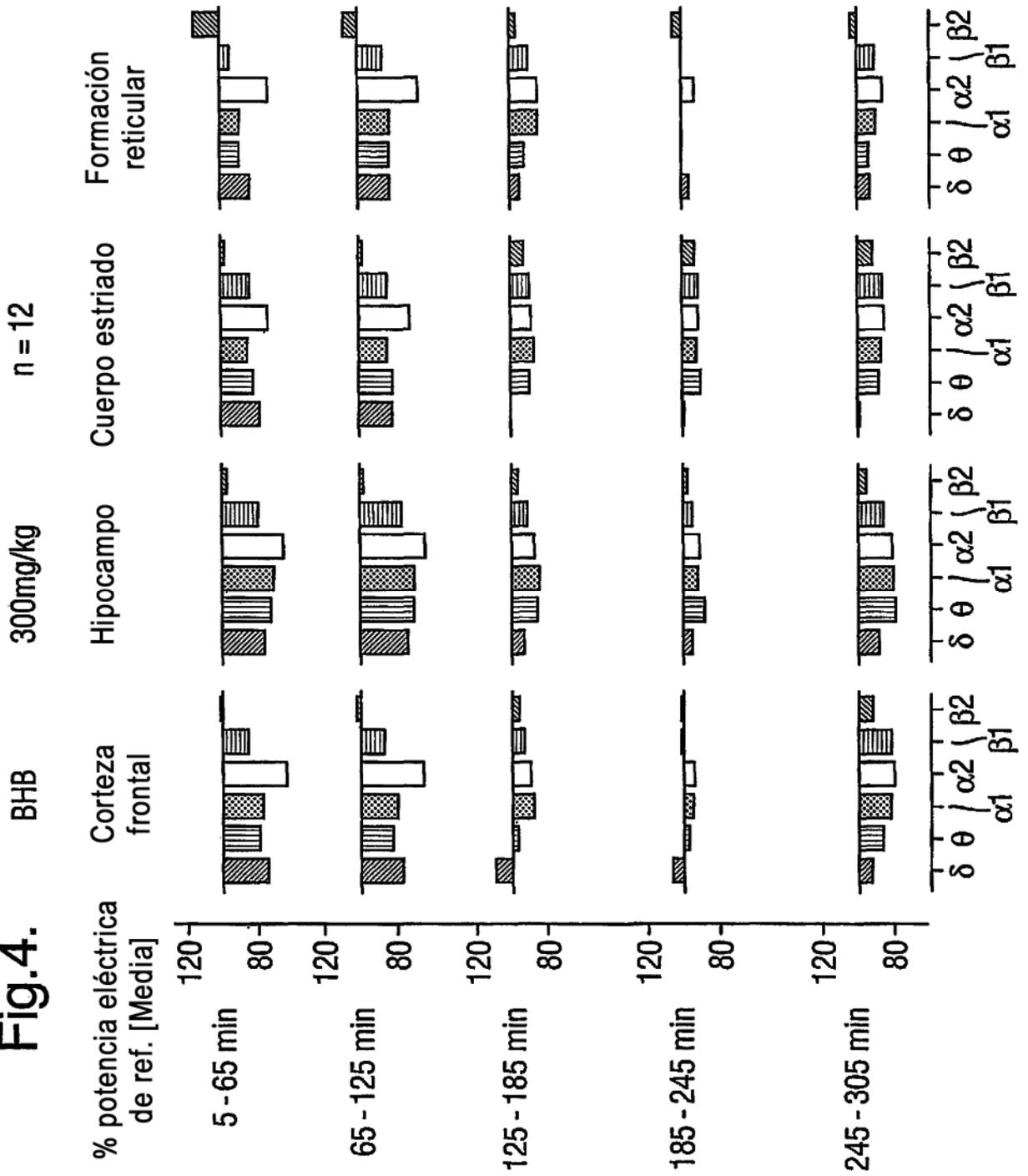


Fig.5.

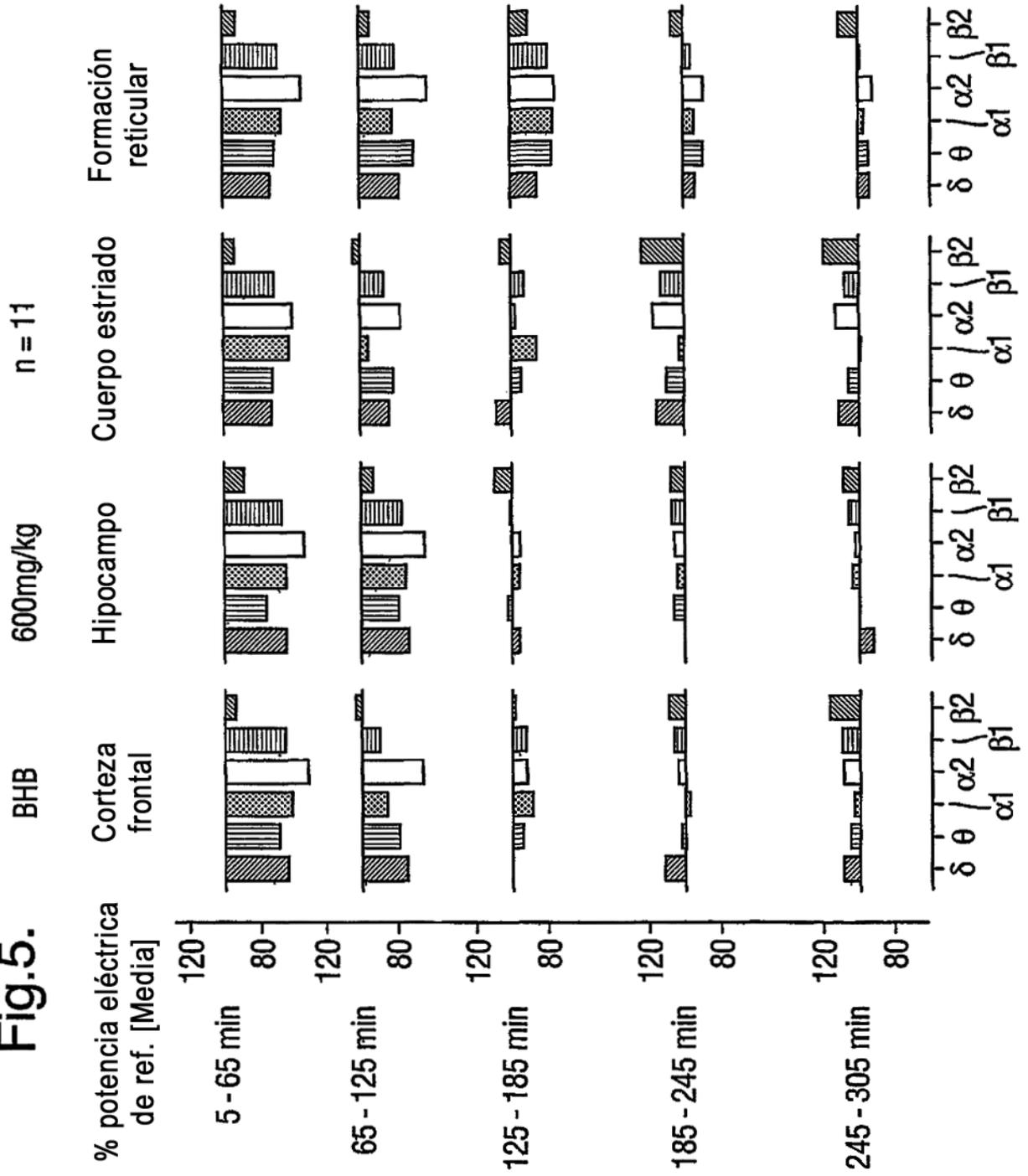


Fig.6.

