

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 826**

51 Int. Cl.:

A61K 31/52 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2009 PCT/US2009/036671**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2009 WO2009114533**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2009 E 09720014 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2274007**

54 Título: **Modulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica**

30 Prioridad:

17.03.2008 US 37145

10.03.2008 US 35250

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

02.06.2017

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
Cornell Center For Technology Enterprise And
Commercialization 395 Pine Tree Road Suite 310
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

BYNOE, MARGARET, S.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 614 826 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

Modulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la modulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Antecedentes de la invención

10 Las barreras a la entrada de sangre en el sistema nervioso central ("SNC") se denominan de forma conjunta en el presente documento barrera hematoencefálica ("BHE"). La BHE es una capa muy tejida de células endoteliales que recubre 643 kilómetros de capilares y vasos sanguíneos en el cerebro (Ransohoff et al., "Three or More Routes for Leukocyte Migration Into the Central Nervous System," Nature Rev. Immun. 3:569–581 (2003)). Las uniones casi
15 impermeables entre las células de la BHE se forman mediante la interdigitación de aproximadamente de 20 tipos diferentes de proteínas. Las moléculas deben entrar en una célula de la BHE a través de los transportadores de proteínas embebidos en la membrana o deslizándose directamente a través de su membrana externa cerosa. Una vez dentro, los compuestos extraños deben evitar una alta concentración de enzimas metabólicas y diversas bombas de proteínas cebadas para eliminar sustancias extrañas. Habiendo evitado estos obstáculos, las moléculas
20 extrañas deben pasar a través de la membrana interna de una célula de la BHE para finalmente llegar al cerebro. Estas elaboradas defensas permiten a la BHE secuestrar al cerebro de posibles daños, pero la BHE también obstruye la liberación fármacos neurológicos en un sitio de enfermedad en el cerebro. Los investigadores en el mundo académico y las industrias biotecnológicas y farmacéuticas están aprendiendo a evitar la BHE o dejar que permita la entrada de posibles fármacos en el cerebro. Están diseñando fármacos pequeños que pueden difundirse
25 de forma pasiva a través de la BHE o viajar en transportadores de nutrientes para entrar en el cerebro. Otros están uniendo potenciales sustancias terapéuticas diseñadas para que el cerebro los absorba sin querer.

Los capilares que suministran sangre a los tejidos del cerebro constituyen la barrera hematoencefálica (Goldstein et al., "The Blood–Brain Barrier," Scientific American 255:74–83(1986); Pardridge, "Receptor–Mediated Peptide
30 Transport Through the Blood–Brain Barrier," Endocrin. Rev. 7:314–330(1986)). Las células endoteliales que forman los capilares cerebrales son diferentes de las encontradas en otros tejidos del cuerpo. Las células endoteliales capilares cerebrales se unen entre sí mediante estrechas uniones intercelulares que forman una pared continua contra la difusión pasiva de moléculas desde la sangre al cerebro y otras partes del SNC. Estas células también son diferentes en el sentido de que tienen pocas vesículas pinocíticas, que, en otros tejidos, permiten un transporte algo
35 no selectivo a través de la pared capilar. También carecen de huecos o canales continuos que funcionan entre las células, lo que permitiría el paso sin restricciones.

La barrera hematoencefálica funciona para asegurar que el ambiente del cerebro está constantemente controlado. Los niveles de varias sustancias en la sangre, tales como hormonas, aminoácidos e iones, experimentan pequeñas
40 fluctuaciones frecuentes que pueden ser provocadas por actividades tales como comer y hacer ejercicio (Goldstein et al., "The Blood–Brain Barrier," Scientific American 255:74–83(1986); Pardridge, "Receptor–Mediated Peptide Transport Through the Blood–Brain Barrier," Endocrin. Rev. 7:314–330(1986)). Si el cerebro no estuviera protegido por la barrera hematoencefálica frente a estas variaciones en la composición del suero, el resultado podría ser una actividad neural descontrolada.

45 El aislamiento del cerebro de la circulación sanguínea no es completo. Si este fuera el caso, el cerebro sería incapaz de funcionar correctamente debido a la falta de nutrientes y debido a la necesidad de intercambiar productos químicos con el resto del cuerpo. La presencia de sistemas de transporte específicos dentro de las células endoteliales capilares asegura que el cerebro recibe, de manera controlada, todos los compuestos necesarios para
50 el crecimiento y la función normales. En muchos casos, estos sistemas de transporte consisten en proteínas asociadas a la membrana, que se unen selectivamente y transportan ciertas moléculas a través de las membranas de barrera. Estas proteínas transportadoras se conocen como transportadores portadores de soluto.

Aunque se cree que la BHE cumple una función protectora en condiciones normales protegiendo el SNC de la
55 exposición a compuestos potencialmente tóxicos, en la enfermedad del SNC, la BHE puede frustrar los esfuerzos terapéuticos al obstaculizar la entrada de compuestos terapéuticos en el SNC. Por ejemplo, aunque muchas infecciones bacterianas y fúngicas pueden tratarse fácilmente cuando el sitio de la infección está fuera del SNC, tales infecciones en el SNC son a menudo muy peligrosas y muy difíciles de tratar debido a la incapacidad de administrar dosis eficaces de fármacos en el sitio de la infección. De manera similar, la acción de la BHE hace que el
60 tratamiento del cáncer del cerebro sea más difícil que el tratamiento de los cánceres situados fuera del SNC. Incluso cuando puede ser posible administrar una dosis efectiva de fármaco en el SNC administrando cantidades muy grandes de fármaco fuera del SNC, los niveles de fármaco fuera del SNC (tal como en la sangre) suelen ser tan altos que llegan a niveles tóxicos perjudiciales para los riñones, el hígado y otros órganos vitales. Por consiguiente, en la técnica se necesitan métodos para mejorar la liberación de compuestos en el SNC.

65

Además, los pacientes que sufren edema, traumatismos cerebrales, ictus y esclerosis múltiple exhiben degradación de la BHE cerca del sitio de las agresiones principales. El nivel de degradación puede tener efectos profundos sobre el resultado clínico de estas enfermedades. Por ejemplo, el grado de degradación de la BHE en pacientes que sufren esclerosis múltiple ("EM") se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. Mediante resonancia magnética ("MRI") se ha demostrado que, cuando una persona está sufriendo una "crisis" de EM, la barrera hematoencefálica se ha roto en una sección del cerebro o de la médula espinal, permitiendo que los glóbulos blancos llamados linfocitos T atraviesen y destruyan la mielina.

A pesar de la importancia de esta barrera, se sabe muy poco sobre los mecanismos moleculares que controlan la integridad y/o la permeabilidad de la BHE. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad considerable de composiciones y métodos que faciliten dicha investigación y, especialmente, de aplicaciones de diagnóstico y/o terapéuticas.

La presente invención se refiere a la superación de estas y otras deficiencias en la técnica.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un agonista del receptor de la adenosina y/o a un antagonista del receptor A1 de la adenosina para su uso en el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto, en donde el sujeto es aquel que se beneficiaría de un incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y en el que el sujeto no está sometido a un tratamiento que aumente el nivel de adenosina. El agonista del receptor de adenosina y/o un antagonista del receptor A1 de la adenosina modulan los receptores de adenosina en condiciones eficaces para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el sujeto.

La presente invención también se refiere a un antagonista de los receptores A2A de adenosina para su uso en la disminución de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto, en donde el sujeto es uno que se beneficiaría de la disminución de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. El antagonista de los receptores A2A de adenosina modula los receptores de adenosina en condiciones eficaces para disminuir la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el sujeto.

También se divulga un método de tratamiento de un sujeto por un trastorno o afección del sistema nervioso central. Este método implica seleccionar un sujeto con el trastorno o afección del sistema nervioso central y proporcionar una terapéutica eficaz para tratar el trastorno o afección del sistema nervioso central. Se proporciona un agente permeabilizante de la barrera hematoencefálica, en el que el agente aumenta el nivel y/o la biodisponibilidad de adenosina, modula los receptores de adenosina y/o aumenta el nivel y/o la actividad de CD73. La sustancia terapéutica y el agente permeabilizante de la barrera hematoencefálica se administran al sujeto seleccionado en condiciones eficaces para que la sustancia terapéutica pase a través de la barrera hematoencefálica y trate el trastorno o afección.

También se divulga un método de selección de compuestos eficaces para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Este método implica proporcionar a un animal modificado con niveles de expresión de CD73 reducidos, niveles de expresión de adenosina reducidos y/o actividad modulada del receptor de adenosina en comparación con un animal no modificado. También se proporcionan uno o más compuestos candidatos y se administran los uno o más compuestos candidatos al animal modificado. A continuación se evalúa si el uno o más compuestos candidatos aumentan el nivel y/o la biodisponibilidad de adenosina, modula los receptores de adenosina y/o aumenta el nivel y/o la actividad de CD73. A continuación se identifican los compuestos candidatos que aumentan el nivel o la biodisponibilidad de adenosina, modulan los receptores de adenosina y/o aumentan el nivel y/o la actividad de CD73 en el animal modificado como potencialmente eficaces para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

También se divulga un agente farmacéutico. Este agente farmacéutico tiene un efecto terapéutico eficaz para tratar el trastorno o afección del sistema nervioso central y un agente permeabilizante de la barrera hematoencefálica. Este agente aumenta el nivel y/o la biodisponibilidad de adenosina, modula los receptores de adenosina y/o aumenta el nivel y/o la actividad de CD73.

Los agentes de la presente invención proporcionan un tratamiento mejorado de sujetos con trastornos que afectan a la barrera hematoencefálica. Además, la presente invención proporciona agentes para su uso en métodos mejorados de control de la barrera hematoencefálica para potenciar el tratamiento terapéutico de dichos pacientes.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un gráfico que demuestra que los ratones *cd73*^{-/-} son resistentes a la encefalomiелitis autoinmune experimental ("EAE"). Se indujo EAE, se monitorizó diariamente la actividad de la enfermedad y se calculó la puntuación media de EAE para ratones *cd73*^{-/-} (diamantes abiertos, n = 11) y de tipo salvaje (*cd73*^{+/+})

cuadrados cerrados, $n = 13$). Los resultados mostrados son representativos de 11 experimentos separados.

Las Figuras 2A-D muestran que las células T $cd73^{-/-}$ producen niveles elevados de IL-1 β e IL-17 y median en la susceptibilidad a EAE cuando se transfieren a ratones $cd73^{+/+}tcr\alpha^{-/-}$. La Figura 2A muestra la expresión de CD4 y FoxP3 medida en esplenocitos de ratones $cd73^{-/-}$ no tratados previamente y de tipo salvaje 13 días después de la EAE inducida. La Figura 2B muestra esplenocitos de ratones de tipo salvaje inmunizados 13 días después de la inmunización con MOG y no tratados, que se analizaron para determinar la expresión en la superficie celular de CD4 y CD73 mediante citometría de flujo. La Figura 2C muestra células seleccionadas de ratones $cd73^{-/-}$ o salvajes inmunizados que se cultivaron con 1×10^4 esplenocitos irradiados y péptido MOG 0 o 10 μ M. Los sobrenadantes se tomaron a las 18 horas y se sometieron a un ensayo Bio-plex de citocinas. Los resultados representan el cambio de los niveles de citocinas entre los grupos de péptidos MOG de 0 y 10 μ M. Se agruparon muestras de 4 ratones y son representativas de uno de cada tres experimentos similares. La Figura 2D muestra células T CD4 $^{+}$ del bazo y ganglios linfáticos de ratones $cd73^{-/-}$ inmunizados con MOG (rombos abiertos, $n = 5$) o de tipo salvaje (cuadrados cerrados, $n = 5$) que se transfirieron de forma adoptiva en ratones $cd73^{+/+}tcr\alpha^{-/-}$ deficientes en células T. Se indujo EAE y la progresión de la enfermedad se controló diariamente. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

La Figura 3A-L muestra ratones $cd73^{-/-}$ que muestran poca o ninguna infiltración de linfocitos en el SNC después de la inducción de EAE; las células T $cd73^{-/-}$ donantes infiltran el SNC de los ratones receptores $cd73^{+/+}tcr\alpha^{-/-}$ después de la inducción de EAE. Las secciones de tejido congelado de ratones salvajes (Figuras 3A-C) y $cd73^{-/-}$ (Figuras 3D-F) a los 13 días de la inducción de EAE se marcaron con anticuerpo CD4. Las Figuras 3G muestran el número medio de linfocitos infiltrantes CD4 $^{+}$ en el cerebro y la médula espinal cuantificado por campo en secciones de tejido congelado de ratones $cd73^{-/-}$ y de tipo salvaje a los 13 días de la inducción de EAE. Se analizaron ocho campos anatómicamente similares por cerebro y 4 campos por médula espinal por ratón a un aumento de 10x ($n = 5$ ratones/grupo). Las barras de error representan el error estándar de la media. Las Figuras 3H-L muestran secciones de tejido congelado del hipocampo (Figura 3H, 3I y 3K) y el cerebelo (Figura 3J y 3L) marcadas con un anticuerpo CD4 de ratones $tcr\alpha^{-/-}$ inducidos por EAE que recibieron células CD4 $^{+}$ de ratones de tipo salvaje (Fig. 3H-J) o $cd73^{-/-}$ (Fig. 3K-L) a los 12 (Fig. 3K), 18 (Fig. 3H y 3L) o 22 (Fig. 3I y 3J) de la inducción de EAE. Se detectó inmunorreactividad Ig anti-rata con HRP más AEC (rojo) contra un fondo nuclear marcado con hematoxilina (azul). Las flechas indican sitios de infiltración de linfocitos. Las barras de escala representan 500 μ m.

Las Figuras 4A-K muestra ratones $cd73^{-/-}$ que muestran poca o ninguna infiltración de linfocitos en el SNC después de la inducción de EAE; las células T $cd73^{-/-}$ infiltran el SNC después de la transferencia a ratones $cd73^{+/+}tcr\alpha^{-/-}$ e inducción de EAE. Las secciones de tejido congelado de ratones salvajes (Figuras 4A-C) y $cd73^{-/-}$ (Figuras 4D-F) a los 13 días de la inducción de EAE se marcaron con anticuerpo CD45. Las secciones de tejido helado del hipocampo (Fig. 4G, 4H y 4J) y del cerebelo (Figura 4I y 4K) marcadas con un anticuerpo CD45 de ratones $tcr\alpha^{-/-}$ con EAE inducida que recibieron células CD4 $^{+}$ de ratones de tipo salvaje (Fig. 4G-I) o $cd73^{-/-}$ (Fig. 4J-K) el día 12 (Fig. 4J), el día 18 (Figura 4G y 4K) o el día 22 (Fig. 4H y 4I) después de la inducción de EAE. Se detectó inmunorreactividad Ig anti-rata con HRP más AEC (rojo) contra un fondo nuclear marcado con hematoxilina (azul). Las flechas indican sitios de infiltración de linfocitos. Las barras de escala representan 500 μ m.

La Figura 5A-C muestra que las células T específicas de mielina no entran de forma eficaz en el cerebro de ratones $cd73^{-/-}$ después de la inducción de EAE. Se aislaron células T V β 11 $^{+}$ de ratones 2d2 transgénicos inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ que expresan TCR específicos de MOG₃₅₋₅₅ del bazo y los ganglios linfáticos y se transfirieron de forma adoptiva a ratones de tipo salvaje o $cd73^{-/-}$ con inducción concomitante de EAE. En los días 1, 3, 8 y 15 después de la transferencia y la inducción de EAE, se extirparon los bazos (figura 5A), los ganglios linfáticos (figura 5B) y los cerebros (figura 5C) y se recogieron las células. Las células se analizaron para determinar la expresión de CD45 y V β 11 mediante citometría de flujo. Los datos representan el cambio relativo (RFC) en el porcentaje de células V β 11 $^{+}$ en la población de CD45 $^{+}$ para cada órgano en cada día dado. Los valores se normalizaron respecto al porcentaje de células encontradas en cada órgano el día 1 después de la transferencia/inducción de EAE, con 1,0 equivalente al valor basal.

La Figura 6A-D muestran que las células T CD73 $^{+}$ transferidas de forma adoptiva de ratones de tipo salvaje pueden conferir a los ratones $cd73^{-/-}$ susceptibilidad a EAE. La Figura 6A muestra que las células T CD4 $^{+}$ del bazo y los ganglios linfáticos de ratones de tipo salvaje inmunizados con MOG se enriquecieron y se transfirieron de forma adoptiva a ratones de tipo salvaje (cuadrados cerrados, $n = 5$) o $cd73^{-/-}$ (rombos abiertos, $n = 5$), seguido de inducción concomitante de EAE. Se muestran resultados de uno de dos experimentos independientes. La Figura 6B muestra células T procedentes del bazo y los ganglios linfáticos de ratones de tipo salvaje y $cd73^{-/-}$ previamente inmunizados clasificados basándose en la expresión de CD4 y CD73 y se transfirieron de forma adoptiva a ratones $cd73^{-/-}$, seguido de inducción concomitante de EAE ($n = 5$ /cada grupo). Los cuadrados cerrados representan células donantes de ratones de tipo salvaje que expresan CD73; los cuadrados abiertos representan células donantes de ratones de tipo salvaje que carecen de expresión de CD73; los rombos abiertos representan células donantes de ratones $cd73^{-/-}$. La Figura 6C-D muestra secciones de tejido congelado del plexo coroideo del SNC de ratones de tipo salvaje no intactos (Figura 6C, izquierda) y $cd73^{-/-}$ (Figura 6C, derecha y ratones de tipo salvaje 12 días después de la inducción de EAE (Figura 6D) se tiñeron con un anticuerpo específico de CD73 (Figura 6C) o CD45 (Figura 6D). Se detectó inmunorreactividad Ig anti-rata con HRP más AEC (rojo) contra un fondo nuclear marcado con hematoxilina (azul). Las llaves indican tinción de CD73. Las flechas indican tinción de linfocitos CD45. Las barras de escala representan 500 μ m.

La Figura 7A-D muestra que el bloqueo de los receptores de adenosina protege a los ratones del desarrollo de EAE. La Figura 7A muestra las puntuaciones medias de EAE en las que se indujo EAE, se monitorizó diariamente la actividad de la enfermedad y se calculó la puntuación media de EAE en ratones de tipo salvaje (cuadrados) y *cd73^{-/-}* (rombos) a los que se administró agua de bebida (forma cerrada) solo o agua de bebida suplementada con 0,6 g/ml del antagonista del receptor de adenosina de amplio espectro cafeína (forma abierta). Los resultados proceden de un experimento (n = 5 ratones por grupo). La Figura 7B muestra los niveles de expresión de ARNm del receptor de adenosina en relación con el gen constitutivo de GAPDH en la línea celular del plexo coroideo murino Z310. Las muestras se realizaron por triplicado; las barras de error representan el error estándar de la media. La Figura 7C muestra los resultados después de tratar a los ratones con el antagonista del receptor de adenosina A_{2a} SCH58261 a 2 mg/kg (1 mg/kg s.c. y 1 mg/kg i.p.) en DMSO al 45 % (cuadrados cerrados, n = 4 ratones/grupo) o DMSO al 45 % solo (cuadrados abiertos, n = 5 ratones/grupo) 1 día antes y diariamente hasta el día 30 después de la inducción de EAE. Estos resultados son representativos de dos experimentos. Las Figuras 7D muestran el número medio de linfocitos infiltrantes CD4⁺ en el cerebro y la médula espinal cuantificado por campo en secciones de tejido congelado desde el día 15 después de la inducción de EAE en ratones tratados con SCH58261 y DMSO. Se analizaron ocho campos anatómicamente similares por cerebro y 4 campos por médula espinal por ratón a un aumento de 10x (n = 4 ratones). Las barras de error representan el error estándar de la media.

La Figura 8 muestra el antagonista del receptor de adenosina A_{2a} SCH58261 evita la regulación por aumento de ICAM-1 en el plexo coroideo después de la inducción de EAE. Se trató a los ratones con el antagonista del receptor de adenosina A_{2a} SCH58261 a 2 mg/kg (1 mg/kg s.c. y 1 mg/kg i.p.) en DMSO (n = 4 ratones/grupo) o DMSO solo (n = 5 ratones/grupo) 1 día antes y diariamente hasta el día 30 después de la inducción de EAE. Estos resultados proceden de un experimento. Se examinaron secciones de tejido congelado a partir del día 15 después de la inducción de EAE en ratones tratados con SCH58261 y con DMSO para determinar la expresión de ICAM-1 en el plexo coroideo. Los ratones SV tratados con DMSO (izquierda) o SCH58261 (derecha) y teñidos para ICAM-1 (tinción roja, flechas blancas) y DAPI (azul, núcleos) con un aumento de 40x. Las imágenes son de 4 ratones distintos.

La Figura 9A-B demuestra que los ratones *CD73^{-/-}*, que carecen de adenosina extracelular y, por lo tanto, no pueden señalar adecuadamente a través de los receptores de adenosina, se trataron con NECA, dando lugar a un aumento de casi cinco veces de la migración del colorante frente al PBS control (Fig. 9A). Los ratones SV tratados con NECA también muestran un aumento con respecto a los ratones control (Figura 9B). Se usó Pertussis como control positivo, ya que se sabe que induce permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el modelo de EAE de ratón.

La Figura 10 muestra la expresión del receptor de adenosina en la línea de células endoteliales humanas hCMEC/D3.

La Figura 11 muestra los resultados después de sembrar células hCMEC/D3 sobre membranas Transwell y se dejó que crecieran hasta confluencia; se añadieron 2 x 10⁶ células Jurkat a la cámara superior con o sin NECA (agonista general del receptor de adenosina [ARCCPA (agonista A1AR), CGS 21680 (agonista de A2AAR) o vehículo DMSO; y las células migradas se contaron después de 24 horas.

La Figura 12 muestra los resultados después de sembrar células Z310 sobre membranas Transwell y se dejó que crecieran hasta confluencia; se añadieron 2 x 10⁶ células Jurkat a la cámara superior con o sin NECA (n = 1, agonista general de AR), CCPA (n = 1, agonista de A1AR), CGS 21680 (n = 1, agonista de A2AAR) o vehículo DMSO (n = 1); y las células migradas se contaron después de 24 horas.

La Figura 13 muestra los resultados después de cultivar las células hCMEC/D3 hasta confluencia en placas de 24 pocillos; las células se trataron con o sin diversas concentraciones de NECA (agonista general de AR), CCPA (agonista A1AR), CGS 21680 (agonista de A1AR), vehículo DMSO o forskolina (induce AMPc); se añadió tampón de lisis tras 15 minutos y las células se congelaron a -80 °C para detener la reacción; y los niveles de AMPc se analizaron usando un kit de detección de AMPc (Applied Biosystems, Foster City, CA).

La Figura 14 muestra los resultados de ratones hembra defectivos en el receptor de adenosina A1 (A1ARKO, n = 5) y de tipo salvaje (SV, n = 5) inmunizados con CFA/MOG₃₅₋₅₅ + PTX el 12/02/08 y se puntuaron diariamente durante 41 días.

La Figura 15A-B muestra cerebros de ratones de tipo salvaje alimentados con cafeína y cerebros de ratones *CD73^{-/-}* alimentados con cafeína, medidos mediante Extravasación de dextrano-FITC a través del endotelio cerebral.

La Figura 16 muestra los resultados en forma de gráfico de la extravasación de dextrano-FITC a través de la barrera hematoencefálica de ratones de tipo salvaje tratados con agonista de receptor de adenosina, NECA, mientras que SCH58261 inhibe la extravasación de dextrano-FITC.

La Figura 17 muestra los resultados de la extravasación de colorante Evans Blue a través de la barrera hematoencefálica, medida mediante un espectrofotómetro BioTex a 620 nm, después de tratar a los ratones con agonista de receptor de adenosina NECA.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto. Este método implica seleccionar un sujeto que se beneficiará de la permeabilidad aumentada de la barrera hematoencefálica y someter al sujeto seleccionado a un tratamiento. Este tratamiento incrementa el nivel y/o la biodisponibilidad de adenosina, modula los receptores de adenosina y/o aumenta el nivel y/o la actividad de CD73

en condiciones eficaces para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el sujeto.

La invención se refiere a un agonista del receptor A2A de la adenosina y/o a un antagonista del receptor A1 de la adenosina para su uso en el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto, en el que el sujeto es aquel que se beneficiaría de un incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y en el que el sujeto no está sometido a un tratamiento que aumente el nivel de adenosina.

La adenosina es una señal celular de estrés metabólico que se produce en condiciones de hipoxia, isquemia o inflamación. Su principal objetivo es reducir la lesión tisular y estimular la reparación mediante diferentes mecanismos mediados por receptores, incluyendo el aumento de la relación suministro/demanda de oxígeno, el precondicionamiento, los efectos antiinflamatorios y la estimulación de la angiogénesis (Jacobson et al., "Adenosine Receptors as Therapeutic Targets," *Nat. Rev. Drug Discov.* 5:247–264(2006)). Los efectos biológicos de la adenosina son dictados, en última instancia, por el patrón diferente de distribución de receptores y/o la afinidad de los cuatro subtipos conocidos del receptor de adenosina ("AR") en tipos de células específicos.

CD73 (ecto-5'-nucleotidasa) es una molécula de superficie celular anclada a glicosilo, fosfatidilo, inositol de 70 kDa con actividad ecto-enzimática. Se expresa abundantemente en muchos tipos de células incluyendo subpoblaciones de linfocito (Yamashita et al., "CD73 Expression and Fyn-Dependent Signaling on Murine Lymphocytes," *Eur. J. Immunol.* 28:2981–2990 (1998)), células endoteliales (Yamashita et al., "CD73 Expression and Fyn-Dependent Signaling on Murine Lymphocytes," *Eur. J. Immunol.* 28:2981–2990 (1998)) y células epiteliales (Strohmeier et al., "Surface Expression, Polarization, and Functional Significance of CD73 in Human Intestinal Epithelia," *J. Clin. Invest.* 99:2588–2601 (1997)). Es parte de la vía de salvamento de purinas a través de la degradación de nucleósido-5'-monofosfatos (AMP e IMP) en nucleótidos como adenosina e inosina.

Los métodos adecuados de control de CD73 divulgados en el presente documento incluyen la administración de una proteína CD73 recombinante o una citocina u otro factor capaz de inducir la expresión de CD73 endotelial o mediante una combinación de ambas terapias, como se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos de Jalkanen. Más específicamente, los agentes adecuados descritos divulgados en el presente documento incluyen citocinas u otros factores que regulan por aumento directamente o indirectamente la transcripción del gen CD73. Una citocina adecuada es, normalmente, un interferón o una interleucina, pero también pueden usarse otros agentes. En el caso de que la citocina sea un interferón, el interferón puede ser alfa, beta, gamma, omega o cualquier otro interferón y puede ser cualquier subtipo de los interferones mencionados anteriormente. Se cree que, en particular, los interferones alfa y beta son adecuados para tal uso. Cualquier interleucina capaz de inducir la expresión de CD73 endotelial es también adecuada para su uso en este método. Ejemplos de dichas interleucinas incluyen IL-4, IL-10, IL-13 e IL-20.

En una divulgación, la administración de proteína CD73 recombinante o una citocina o ambas se combina con una administración de adenosina monofosfato ("AMP") con el fin de salvaguardar la fuente de adenosina que se va a producir como resultado del nivel elevado de CD73, obtenido mediante expresión elevada o mediante la administración directa de la proteína CD73 recombinante.

La administración de proteína CD73 recombinante o una citocina o ambas puede ser con una administración de un inhibidor de adenilato quinasa, que evita que el AMP se convierta en adenosina difosfato ("ADP") o adenosina trifosfato ("ATP").

Como alternativa, la administración de proteína CD73 recombinante o una citocina o ambas puede combinarse con la administración de un inhibidor de adenosina desaminasa que evita la descomposición de la adenosina. Esto también podría combinarse con la administración de AMP y, opcionalmente, también con un inhibidor de la adenilato quinasa, que evita que el AMP se convierta en adenosina difosfato (ADP) o adenosina trifosfato (ATP).

La adenosina extracelular (que puede generarse por CD73, como se ha descrito anteriormente) regula la entrada de células inmunes en el sistema nervioso central. Por consiguiente, la permeabilidad de la BHE está mediada por la concentración local de adenosina junto con la actividad de los receptores de adenosina: el receptor A1 se activa a baja concentración de adenosina (alta afinidad) y el A2a se activa a concentraciones altas de adenosina (baja afinidad). Por lo tanto, al aumentar la disponibilidad de adenosina se aumentará la permeabilidad de la BHE. Por el contrario, la disminución de la disponibilidad de adenosina disminuirá la permeabilidad de la BHE. Además, el aumento del nivel o actividad de CD73 producirá adenosina local adicional, como se ha descrito con detalle anteriormente, aumentando con ello la permeabilidad de la BHE.

La adenosina, un producto nucleosídico purínico de la actividad enzimática de CD73, se une a receptores específicos en la superficie celular. Se ha informado que la adenosina desempeña un papel en muchos acontecimientos fisiológicos y patológicos. La adenosina se encuentra en todas las células vivas y puede liberarse en condiciones apropiadas, tales como isquemia o anoxia 20, donde puede actuar sobre los receptores de adenosina para producir diversos efectos fisiológicos.

Actualmente se sabe que los receptores de adenosina son proteínas de membrana integrales que se unen a la adenosina extracelular, iniciando de este modo una señal transmembrana a través de proteínas de unión a

nucleótidos de guanina específicas conocidas como proteínas G para modular diversos sistemas de segundo mensajero, incluyendo adenililciclase, canales de potasio, canales de calcio y Fosfolipasa C. Véase Stiles, "Adenosine Receptors and Beyond: Molecular Mechanisms of Physiological Regulation," Clin. Res. 38(1):10-18 (1990); Stiles, "Adenosine Receptors," J. Biol Chem. 267: 6451-6454 (1992).

La activación del receptor de adenosina A2A aumentará la permeabilidad de la BHE. Los activadores adecuados del receptor A2A de la adenosina son agonistas A2a, que son bien conocidos en la técnica (Press et al., "Therapeutic Potential of Adenosine Receptor Antagonists and Agonists," Expert Opin. Ther. Patents 17(8):1-16(2007)). Otros agonistas de receptores A_{2a} de adenosina incluyen los descritos en la patente de Estados Unidos N.º 6.232.297 y en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos 2003/0186926 A1 de Lindin et al., el documento 2005/0054605 A1 de Zablocki et al., y en las solicitudes de patente publicada de Estados Unidos n.º 2006/0040888 A1, 2006/0040889 A1, 2006/0100169 A1 y 2008/0064653 A1 to Li et al. Estos compuestos se pueden sintetizar como se describe en: las patentes de Estados Unidos números 5.140.015 y 5.278.150 to Olsson et al.; la patente de Estados Unidos número 4.956.345 Miyasaka et al.; Hutchinson et al., "CGS 21680C, an A2 Selective Adenosine Receptor Agonist with Preferential Hypotensive Activity," J. Pharmacol. Exp. Ther., 251: 47-55 (1989); Olsson et al., "N6-Substituted N-alkyladenosine-5'-uronamides: Bifunctional Ligands Having Recognition Groups for A1 and A2 Adenosine Receptors," J. Med. Chem., 29: 1683-1689 (1986); Bridges et al., "N6-[2-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-(2-methylphenyl)ethyl]adenosine and its Uronamide Derivatives: Novel Adenosine Agonists With Both High Affinity and High Selectivity for the Adenosine A2 Receptor," J. Med. Chem. 31: 1282 (1988); Hutchinson et al., J. Med. Chem., 33:1919 (1990); Ukeeda et al., "2-Alkoxyadenosines: Potent and Selective Agonists at the Coronary Artery A2 Adenosine Receptor," J. Med. Chem. 34: 1334 (1991); Francis et al., "Highly Selective Adenosine A2 Receptor Agonists in a Series of N-alkylated 2-aminoadenosines," J. Med. Chem. 34: 2570-2579 (1991); Yoneyama et al., "Vasodepressor Mechanisms of 2-(1-octynyl)-adenosine (YT-146), a Selective Adenosine A2 Receptor Agonist, Involve the Opening of Glibenclamide-sensitive K⁺ Channels," Eur. J. Pharmacol. 213(2):199-204 (1992); Peet et al., "Conformationally Restrained, Chiral (phenylisopropyl)amino-substituted pyrazolo[3,4-d]pyrimidines and Purines with Selectivity for Adenosine A1 and A2 Receptors," J. Med. Chem., 35: 3263-3269 (1992); y Cristalli et al., "2-Alkynyl Derivatives of Adenosine and Adenosine-5'-N-ethyluronamide as Selective Agonists at A2 Adenosine Receptors," J. Med. Chem. 35(13): 2363-2368 (1992). Estos agonistas del receptor A2A de adenosina pretenden ser ilustrativos y no limitantes.

El bloqueo o desactivación del receptor A1 de adenosina también aumentará la permeabilidad de la BHE. Los desactivadores adecuados del receptor A1 de la adenosina son antagonistas A1 de adenosina, que son bien conocidos en la técnica (Press et al., "Therapeutic Potential of Adenosine Receptor Antagonists and Agonists," Expert Opin. Ther. Patents 17(8):1-16(2007)). Los antagonistas adecuados del receptor A1 de adenosina incluyen, pero sin limitaciones, los descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2008/0027082 A1 de Hoher et al., las patentes de Estados Unidos n.º 5.446.046 y 5.668.139 de Belardinelli et al., la patente de Estados Unidos n.º 6.117.998 de Neely, y la patente de Estados Unidos n.º 7.247.639 de Wilson et al.

Al aumentar la permeabilidad de la BHE, el sujeto seleccionado puede tener un trastorno del sistema nervioso central ("SNC").

Entre los trastornos del SNC (que abarcan enfermedades o trastornos psiquiátricos/de comportamiento) se pueden incluir, pero sin limitaciones, afasia epileptiforme adquirida, encefalomiелitis aguda diseminada, adrenoleucodistrofia, agenesia del cuerpo calloso, agnosia, síndrome de aicardi, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alpers, hemiplejia alterna, enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, anencefalia, síndrome de Angelman, angiomas, anoxia, afasia, apraxia, quistes aracnoides, aracnoiditis, malformación de Arnold-chiari, malformación arteriovenosa, síndrome de Asperger, ataxia telangiectasia, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, autismo, trastorno de procesamiento auditivo, disfunción autonómica, dolor de espalda, enfermedad de Batten, enfermedad de Behcet, parálisis de Bell, blefaroespasmo esencial benigno, amiotrofia focal benigna, hipertensión intracraneal benigna, polimicrogiria frontoparietal bilateral, enfermedad de Binswanger, blefaroespasmo, síndrome de Bloch-Sulzberger, lesión del plexo braquial, absceso cerebral, daño cerebral, lesión cerebral, tumor cerebral, tumor espinal, síndrome de Brown-Séquard, enfermedad de Canavan, síndrome del túnel carpiano (STC), causalgia, síndrome de dolor central, mielínolisis pontina central, miopatía centronuclear, trastorno cefálico, aneurisma cerebral, arteriosclerosis cerebral, atrofia cerebral, gigantismo cerebral, parálisis cerebral, enfermedad de los dientes de Charcot-Marie, malformación de Chiari, corea, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica ("PDIC"), dolor crónico, síndrome de dolor regional crónico, síndrome de Coffin Lowry, coma (incluido el estado vegetativo persistente), diplegia facial congénita, degeneración corticobasal, arteritis craneal, craneosinostosis, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, trastornos de traumatismo acumulativo, síndrome de Cushing, enfermedad de cuerpos de inclusión citomegálicos ("EIC"), infección por citomegalovirus, síndrome de Dandy Walter, síndrome de De Morsier, parálisis de Dejerine-Klumpke, enfermedad de Dejerine-Sottas, síndrome de fase retardada del sueño, demencia, dermatomiositis, dispraxia del desarrollo, neuropatía diabética, esclerosis difusa, disautonomía, discalculia, disgrafía, dislexia, distonía, encefalopatía epiléptica infantil temprana, síndrome de la silla vacía, encefalitis, encefalocele, angiomas encefalotrigeminal, encopresis, epilepsia, parálisis de Erb, eritromelalgia, temblor esencial, enfermedad de Fabry, síndrome de Fahr, desmayo, parálisis espástica familiar, convulsiones febriles, síndrome de Fisher, ataxia de Friedreich, enfermedad de Gaucher, síndrome de Gerstmann, arteritis de células gigantes, enfermedad de inclusión de células gigantes, leucodistrofia de células globulares, heterotopía de la materia gris, síndrome de

Guillain-Barré, mielopatía asociada a HTLV-1, enfermedad de Hallervorden-Spatz, traumatismo craneal, cefalea, espasmo hemifacial, paraplejía espástica hereditaria, polineurítide atáctica heterodopatoa, herpes zoster oticus, herpes zoster, síndrome de Hirayama, holoprosencefalia, enfermedad de Huntington, hidronencefalia, hidrocefalia, hipercortisolismo, hipoxia, encefalomiелitis inmunomediada, miositis por cuerpos de inclusión, incontinencia pigmentaria, enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico infantil, enfermedad de Refsum infantil, espasmos infantiles, miopatía inflamatoria, quiste intracraneal hipertensión intracraneal, síndrome de Joubert, síndrome de Kearns-sayre, enfermedad de Kennedy, síndrome de Kinsbourne, síndrome de Klippel Feil, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Kugelberg-Welander, kuru, enfermedad de lafora, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Landau-Kleffner, síndrome lateral medular (Wallenberg), dificultades de aprendizaje, enfermedad de Leigh, síndrome de Lennox-Gastaut, síndrome de Lesch-Nyhan, leucodistrofia, demencia con cuerpos de Lewy, lisencefalia, síndrome de enclaustramiento, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad del disco lumbar, secuelas neurológicas de la enfermedad de Lyme, enfermedad de Machado-Joseph (ataxia espinocerebelosa de tipo 3), macroencefalia, megalencefalia, síndrome de Melkersson-Rosenthal, enfermedad de Ménière, meningitis, enfermedad de Menkes, leucodistrofia metacromática, microcefalia, migraña, síndrome de Miller Fisher, mini-ictus, miopatías mitocondriales, síndrome de Moebius, amiotrofia monomélica, enfermedad de las neuronas motoras, enfermedad de las capacidades motoras, enfermedad de moyamoya, mucopolisacaridosis, demencia multiinfarto, neuropatía motora multifocal, esclerosis múltiple, atrofia de múltiples sistemas con hipotensión postural, distrofia muscular, encefalomiелitis miálgica, miastenia gravis, esclerosis difusa mielínoclastica, encefalopatía mioclónica de lactantes, mioclonía, miopatía, miopatía miotubular, miotonía congénita, narcolepsia, neurofibromatosis, síndrome neuroléptico maligno, manifestaciones neurológicas del SIDA, secuelas neurológicas del lupus, neuromiotonía, lipofuscinosis ceroidal neuronal, trastornos de la migración neuronal, enfermedad de Niemann-Pick, síndrome del despertar, sin sueño de 24 horas, trastorno del aprendizaje no verbal, síndrome de O'sullivan-Mcleod, neuralgia occipital, secuencia de disrafia espinal oculta, síndrome de Ohtahara, atrofia olivopontocerebelosa, síndrome de mioclonos opsoclonos, neuritis óptica, hipotensión ortostática, síndrome de sobreuso, palinopsia, parestesia, enfermedad de Parkinson, paramiotonía congénita, enfermedades paraneoplásicas, ataques paroxísmicos, síndrome de Parry-Romberg (también conocido como síndrome de romberg), enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, parálisis periódica, neuropatía periférica, estado vegetativo persistente, trastornos generalizados del desarrollo, reflejos estornudos fóticos, enfermedad de almacenamiento de ácido fitánico, enfermedad de Pick, nervios pinzados, tumores pituitarios, pmg, polio, polimicrogria, polimiositis, porencefalia, síndrome pospolio, neuralgia postherpética ("NPH"), encefalomiелitis postinfecciosa, hipotensión postural, síndrome de Prader-willi, esclerosis lateral primaria, enfermedades priónicas, atrofia hemifacial progresiva (también conocido como síndrome de Romberg), leucoencefalopatía multifocal progresiva, poliodistrofia esclerosante progresiva, parálisis supranuclear progresiva, pseudotumor cerebral, síndrome de caza de Ramsay (tipo I y tipo II), encefalitis de Rasmussen, síndrome de distrofia simpática refleja, enfermedad de Refsum, trastornos del movimiento repetitivo, lesión por esfuerzo repetitivo, síndrome de las piernas inquietas, mielopatía asociada con retrovirus, síndrome de Rett, síndrome de Reye, síndrome de Romberg, rabia, baile de San Vito, enfermedad de Sandhoff, esquizofrenia, enfermedad de Schilder, esquizencefalia, disfunción de la integración sensorial, displasia septo-óptica, síndrome del niño sacudido, culebrillas, síndrome de Shy-dragar, síndrome de Sjögren, apnea del sueño, enfermedad del sueño, estornudos incontrolados, síndrome de Sotos, espasticidad, espina bífida, lesión de la médula espinal, tumores de la médula espinal, atrofia muscular espinal, estenosis espinal, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, véase parálisis supranuclear progresiva, ataxia espinocerebelosa, síndrome del hombre rígido, ictus, síndrome de Sturge-weber, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalopatía arteriosclerótica subcortical, siderosis superficial, corea de Sydenham, síncope, sinestesia, siringomielia, discinesia tardía, enfermedad de Tay-Sachs, arteritis temporal, tétanos, síndrome de la médula espinal atada, enfermedad de Thomsen, síndrome de salida torácica, tic doloroso, parálisis de Todd, síndrome de Tourette, ataque isquémico transitorio, encefalopatías espongiiformes transmisibles, mielitis transversa, lesión cerebral traumática, temblor, neuralgia del trigémino, paraparesia espástica tropical, tripanosomiasis, esclerosis tuberosa, vasculitis incluyendo arteritis temporal, enfermedad de Von Hippel-lindau (VHL), encefalomiелitis de Viliuisk (VE), síndrome de Wallenberg, enfermedad de Werdnig-Hoffman, síndrome de West, latigazo cervical, síndrome de Williams, enfermedad de Wilson y síndrome de Zellweger. Por tanto, se puede apreciar que todos los estados y trastornos relacionados con el SNC pueden tratarse a través de la vía de la BHE de liberación del fármaco.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía oral, por vía parenteralmente, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, mediante instilación intranasal o mediante aplicación a las membranas mucosas, tales como de la nariz, la garganta y los tubos bronquiales. Pueden administrarse solos o con vehículos farmacéuticos adecuados y pueden estar en forma sólida o líquida, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones.

Los compuestos activos de la presente invención se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable o se pueden encerrar en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, o comprimirse en comprimidos o se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta. Para el fin de la administración terapéutica oral, estos compuestos activos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos 0,1 % de compuesto activo. El porcentaje del compuesto en estas composiciones puede, por supuesto, variarse y puede estar, de forma conveniente, entre aproximadamente 2 % a aproximadamente 60 % del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que

se obtendrá una dosificación adecuada. Las composiciones preferidas de acuerdo con la presente invención se preparan de modo que una unidad de dosificación oral contenga entre aproximadamente 1 y 250 mg de compuesto activo.

Los comprimidos, cápsulas y similares también pueden contener un aglutinante tal como goma de tragacanto, goma arábica, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso.

Puede haber presentes otros diversos materiales como revestimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos pueden estar recubiertos con goma shellac, azúcar o ambos. Un jarabe puede contener, además del ingrediente activo, sacarosa como agente edulcorante, metilo y propilparabenos como conservantes, un colorante y un aromatizante, tal como sabor a cereza o a naranja.

Estos compuestos activos también pueden administrarse por vía parenteral. Las soluciones o suspensiones de estos compuestos activos se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas en aceites. Aceites ilustrativos son los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite mineral. En general, son vehículos líquidos preferidos, en particular para soluciones inyectables, agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, y glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida de modo que se pueda introducir con facilidad en las jeringuillas. Debe ser estable en las condiciones de la fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar directamente en las vías respiratorias en forma de un aerosol. Para su uso como aerosoles, los compuestos de la presente invención en solución o suspensión pueden envasarse en un recipiente de aerosol presurizado junto con propelentes adecuados, por ejemplo propelentes de hidrocarburos como propano, butano o isobutano con adyuvantes convencionales. Los materiales de la presente invención también se pueden administrar en una forma no presurizada, tal como en un nebulizador o atomizador.

También se proporciona un método para disminuir la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto. Este método implica seleccionar un sujeto que se beneficiará de la permeabilidad disminuida de la barrera hematoencefálica y someter al sujeto seleccionado a un tratamiento. Este tratamiento disminuye el nivel y/o la biodisponibilidad de adenosina, modula los receptores de adenosina y/o disminuye el nivel y/o la actividad de CD73 en condiciones eficaces para disminuir la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el sujeto.

La invención proporciona un antagonista de receptor A2A de adenosina para su uso en la disminución de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto, en la que el sujeto es aquel que se beneficiaría de una permeabilidad disminuida de la barrera hematoencefálica.

Este aspecto de la presente invención puede llevarse a cabo utilizando las formulaciones farmacéuticas y los métodos de administración descritos anteriormente.

Como se ha descrito con detalle anteriormente, la permeabilidad de la BHE está controlada por los niveles locales de adenosina, CD73 y la actividad del receptor de adenosina. La alteración de la actividad de los receptores de adenosina se puede conseguir proporcionando antagonistas y/o agonistas de los receptores de adenosina, que son bien conocidos en la técnica (Press et al., "Therapeutic Potential of Adenosine Receptor Antagonists and Agonists," *Expert Opin. Ther. Patents* 17(8):1-16(2007)).

La alteración de la actividad del receptor de adenosina en un sujeto para disminuir la permeabilidad de la barrera sanguínea puede lograrse mediante, aunque sin limitaciones, la administración al sujeto un antagonista del receptor A2A de adenosina y/o un agonista del receptor A1 de adenosina.

Un número de antagonistas del receptor A2A de la adenosina son conocidos por los expertos en la técnica y pueden usarse individualmente o conjuntamente en los métodos descritos en el presente documento. Tales antagonistas incluyen, pero sin limitaciones, (-)-R,S)-mefloquina el enantiómero activo de la mezcla racémica comercializada como Mefloquine™), 3,7-dimetil-1-propargilxantina (DMPX), 3-(3-hidroxipropil)-7-metil-8-(m-metoxistiril)-1-propargilxantina (MX2), sal disódica de fosfato de 3-(3-hidroxipropil)-8-(3-metoxistiril)-7-metil-1-propargilxantina

(MSX-3, un profármaco de fosfato de MSX-2), derivados de 7-metil-8-stirilxantina, SCH 58261, KW-6002, aminofuriltriazolo-tri-azinilaminoetilfenol (ZM 241385) y 8-clorostiril cafeína, KF17837, VR2006, istradefillina, los fármacos VERNALIS, tales como VER 6489, VER 6623, VER 6947, VER 7130, VER 7146, VER 7448, VER 7835, VER 8177, VER 8177, pirazolo [4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinas y 5-amino-imidazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina, y similares (publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006/0128708 de Li et al.), pirazolo[4,3-e]-[1,2,4]-triazolo[1,5-c]pirimidinas (véase, por ejemplo, el documento WO 01/92264 de Kase et al.), 2,7-disustituido-5-amino-[1,2,4]triazolo[1,5-c]pirimidinas (véase, por ejemplo, el documento WO 03/048163 to Kase et al.), 2,5-disustituido-7-amino-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazinas (véase, por ejemplo, Vu et al., "Piperazine Derivatives of [1,2,4]Triazolo[1,5-a][1,3,5]triazine as Potent and Selective Adenosine A2a Receptor Antagonists," J. Med. Chem. 47(17):4291-4299 (2004)), 9-sustituido-2-(sustituido-etin-1-yl)-adeninas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.217.702 de Beauglehole et al.), derivados de 7-metil-8-stirilxantina, pirazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinas y 5-amino-imidazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinas (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006/0128708 to Li et al.). Estos antagonistas del receptor A2A de adenosina pretenden ser ilustrativos y no limitantes.

Los agonistas de receptores A1 de adenosina adecuados, divulgados pero no reivindicados, incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005/0054605 A1 de Zablocki et al.

Al disminuir la permeabilidad de la BHE, el sujeto seleccionado puede tener una enfermedad inflamatoria. Tales enfermedades inflamatorias incluyen aquellas en las que los mediadores de la inflamación atraviesan la barrera hematoencefálica. Tales enfermedades inflamatorias incluyen, pero no se limitan a, la inflamación causada por infección bacteriana, infección vírica o enfermedad autoinmune. Más específicamente, tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a las mismas, meningitis, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, encefalitis por el virus de la inmunodeficiencia humana ("VIH") 1, encefalitis por el virus del herpes simple (VHS), encefalitis por Toxoplasma gondii y leucoencefalopatía multifocal progresiva.

Cuando la permeabilidad de la BHE disminuye, el sujeto seleccionado también puede tener una afección mediada por la entrada de linfocitos en el cerebro. Otras afecciones que se pueden tratar de esta manera incluyen encefalitis del cerebro, enfermedad de Parkinson, epilepsia, manifestaciones neurológicas del VIH-SIDA, secuelas neurológicas del lupus y enfermedad de Huntington, meningitis, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, encefalitis por el VHS y leucoencefalopatía multifocal progresiva.

También se divulga un método de tratamiento de un sujeto por un trastorno o afección del sistema nervioso central. Este método implica seleccionar un sujeto con el trastorno o afección del sistema nervioso central y proporcionar una terapéutica eficaz para tratar el trastorno o afección del sistema nervioso central. Se proporciona un agente permeabilizante de la barrera hematoencefálica, en el que el agente aumenta el nivel y/o la biodisponibilidad de adenosina, modula los receptores de adenosina y/o aumenta el nivel y/o la actividad de CD73. La sustancia terapéutica y el agente permeabilizante de la barrera hematoencefálica se administran al sujeto seleccionado en condiciones eficaces para que la sustancia terapéutica pase a través de la barrera hematoencefálica y trate el trastorno o afección.

Este método puede llevarse a cabo utilizando los agentes farmacéuticos y los métodos de administración descritos anteriormente.

Un agente terapéutico puede incluir cualquier agente terapéutico útil en el tratamiento de una enfermedad o afección del SNC. Tales otros compuestos pueden ser de cualquier clase de fármaco o agente farmacéutico, incluyendo, pero sin limitaciones, antibióticos, agentes antiparasitarios, agentes antifúngicos, agentes antivirales y agentes antitumorales. Cuando se administran con agentes antiparasitarios, antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, antivirales y similares, los compuestos del permeabilizantes de la barrera hematoencefálica pueden administrarse por cualquier método y vía de administración adecuados para el tratamiento de la enfermedad, normalmente como composiciones farmacéuticas.

Los agentes terapéuticos pueden administrarse como agente terapéutico o profiláctico (por ejemplo, inhibiendo o previniendo el inicio de enfermedades neurodegenerativas). Una terapéutica causa la erradicación o mejora de la enfermedad subyacente que está siendo tratada. Un profiláctico se administra a un paciente en riesgo de desarrollar una enfermedad o a un paciente que comunica uno o más de los síntomas fisiológicos de tal enfermedad, incluso aunque no se haya podido establecer todavía un diagnóstico. Como alternativa, se puede aplicar la administración profiláctica para evitar el inicio de los síntomas fisiológicos del trastorno subyacente, particularmente si el síntoma se manifiesta cíclicamente. En esta última divulgación, la terapia es profiláctica con respecto a los síntomas fisiológicos asociados en lugar de la indicación subyacente. La cantidad efectiva real para una aplicación particular dependerá, entre otras cosas, de la afección que se esté tratando y de la vía de administración.

Los agentes terapéuticos pueden ser inmunosupresores, antiinflamatorios, antiproliferativos, agentes antimigratorios, agentes antifibróticos, proapoptóticos, bloqueantes de los canales de calcio, antineoplásicos, anticuerpos, agentes antitrombóticos, agentes antiplaquetarios, agentes de Ilbllla, agentes antivirales, agentes anticancerosos, agentes

quimioterapéuticos, trombolíticos, vasodilatadores, antimicrobianos o antibióticos, antimetabólicos, antagonistas del factor de crecimiento, secuestrantes de los radicales libres, agentes biológicos, agentes radioterapéuticos, agentes radiopacos, agentes radiomarcados, anticoagulantes (por ejemplo, heparina y sus derivados), fármacos antiangiogénesis (por ejemplo, talidomida), fármacos angiangiogénicos, inhibidores del PDGF-B y/o EGF, antiinflamatorios (por ejemplo, fármacos para la psoriasis), riboflavina, tiazofurina, zafurina, agentes antiagregantes plaquetarios (por ejemplo, inhibidores de la ciclooxigenasa (por ejemplo, ácido acetilsalicílico), inhibidores del ADP (tales como clopidogrel y ticlopidina), inhibidores de la fosfodiesterasa III (tales como cilostazol), agentes de la lico proteína II/IIIa (tales como abciximab), eptifibatida e inhibidores de la recaptación de adenosina (tales como dipiridamoles, agentes curativos y/o promotores (por ejemplo, antioxidantes y donantes de óxido de nitrógeno), antieméticos, antináuseas, tripiterolida, diterpenos, triterpenos, epóxidos diterpénicos, epóxido diterpenoide, triepóxidos o tripterygium wifordii hook F (TWHF), SDZ-RAD, RAD, RAD666 o 40-0-(2-hidroxi)etil-rapamicina, derivados, sales farmacéuticas y combinaciones de los mismos.

En una divulgación, el agente capaz terapéutico es una proteína o péptido bioactivo. Ejemplos de dicha proteína o péptidos bioactivos incluyen un péptido modulador de células, un péptido quimiotáctico, un péptido anticoagulante, un péptido antitrombótico, un péptido antitumoral, un péptido antiinfeccioso, un péptido potenciador del crecimiento y un péptido antiinflamatorio. Ejemplos de proteínas incluyen anticuerpos, enzimas, esteroides, hormona del crecimiento y hormona liberadora de la hormona del crecimiento, hormona liberadora de gonadotropina y sus análogos agonistas y antagonistas, somatostatina y sus análogos, gonadotropinas, péptido T, tirocicotonina, hormona paratiroidea, glucagón, vasopresina, oxitocina, angiotensina I y II, bradiquinina, kalidina, hormona adrenocorticotropa, hormona estimulante tiroidea, insulina, glucagón y los numerosos análogos y congéneres de las moléculas anteriores. En algunos aspectos de la invención, la permeabilidad de la BHE se modula mediante uno o más de los agentes reivindicados para administrar un antibiótico o un agente capaz terapéutico anti-infeccioso. Tales agentes antiinfecciosos reducen la actividad de un microorganismo o lo destruyen.

En ciertas divulgaciones, el agente permeabilizante terapéutico y el agente permeabilizante de la barrera hematoencefálica se formulan como una única formulación de "compuesto". Esto puede conseguirse mediante cualquiera de una serie de métodos conocidos. Por ejemplo, el agente terapéutico y permeabilizante de la barrera hematoencefálica puede combinarse en un solo excipiente farmacéuticamente aceptable. En otro enfoque, el agente terapéutico y permeabilizante de la barrera hematoencefálica puede formularse en excipientes separados que se microencapsulan y luego se combinan, o que forman láminas separadas en una sola pastilla, y así sucesivamente.

En una divulgación, el agente terapéutico y permeabilizante de la barrera hematoencefálica están unidos. En ciertas divulgaciones, el agente terapéutico y permeabilizante de la barrera hematoencefálica están unidos directamente entre sí o se unen entre sí mediante un "conector" o "enlazador" para formar un compuesto único. Sin estar ligado a una teoría alguna en particular, se cree que tales compuestos unidos proporcionan una especificidad/selectividad mejorada.

Los expertos en la técnica conocen bien una serie de químicas para unir moléculas directamente o a través de un enlazador/conector. La química específica empleada para unir el agente o agentes terapéuticos y el agente permeabilizante de la barrera hematoencefálica para formar un compuesto bifuncional depende de la naturaleza química del agente o agentes terapéuticos y la separación "entre ligandos" deseada. Diversos agentes terapéuticos y agentes permeabilizantes de la barrera hematoencefálica normalmente contienen diversos grupos funcionales (por ejemplo, ácido carboxílico (COOH), amina libre (-NEE), y similares), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en un enlazador o en el componente opuesto (es decir, el agente terapéutico o permeabilizante de la barrera hematoencefálica) para unir los componentes juntos.

Como alternativa, los componentes pueden derivarse para exponer o fijar grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de una serie de moléculas enlazadoras, tales como las disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

Un "enlazador" o "conector", tal como se usa en el presente documento, es una molécula que se usa para unir dos o más ligandos (Por ejemplo, agente o agentes terapéuticos o agente permeabilizante de la barrera hematoencefálica) para formar un compuesto bifuncional o polifuncional. El enlazador se elige normalmente de modo que sea capaz de formar enlaces covalentes con todos los demás componentes que comprenden el resto bifuncional o polifuncional. Los enlazadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a los mismos, enlazadores de carbono de cadena lineal o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos, aminoácidos, ácidos nucleicos, dendrímeros, polímeros sintéticos, enlazadores peptídicos, análogos de péptidos de ácidos nucleicos, carbohidratos, polietilenglicol y similares. Cuando uno o más de los componentes son polipéptidos, el enlazador puede unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro a cisteína) o a través de los grupos amino o carboxilo del carbono alfa de los aminoácidos terminales.

En ciertas divulgaciones se puede usar un enlazador bifuncional que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo en el primer grupo terapéutico y otro grupo reactivo con un grupo funcional en el agente permeabilizante de la barrera hematoencefálica para formar un compuesto bifuncional. Como alternativa, la derivatización puede implicar

tratamiento químico del componente o componentes (por ejemplo, escisión de glicol del resto de azúcar de una glicoproteína, un carbohidrato o un ácido nucleico, etc.) con peryodato para generar grupos aldehído libres. Los grupos aldehído libres pueden hacerse reaccionar con grupos amina o hidrazina libres en un enlazador para unir el enlazador al compuesto (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.671.958 de Rodwell et al.). También se conocen procedimientos para la generación de grupos sulfhidrilo libres en el polipéptido, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (véase la Patente de Estados Unidos N.º 4.659.839 de Nicolotti et al.)

Donde el agente terapéutico y permeabilizante de la barrera hematoencefálica son ambos péptidos, un compuesto bifuncional puede sintetizarse químicamente o expresarse de forma recombinante como una proteína de fusión que comprende ambos componentes unidos directamente entre sí o unidos a través de un enlazador peptídico.

En ciertas divulgaciones se usan enlazadores basados en lisina, ácido glutámico y polietilenglicol (PEG) de longitud diferente para acoplar los componentes. Los expertos en la técnica conocen bien la química para la conjugación de moléculas a PEG (véase, por ejemplo, Veronese, "Peptide and Protein PEGylation: a Review of Problems and Solutions," *Biomaterials* 22: 405–417 (2001); Zalipsky et al., "Attachment of Drugs to Polyethylene Glycols," *Eur. Polym. J.* 19(12):1177–1183 (1983); Olson et al., "Preparation and Characterization of Poly(ethylene glycol)ylated Human Growth Hormone Antagonist," *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications* 170–181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, DC (1997); Delgado et al., "The Uses and Properties of PEG–Linked Proteins," *Grit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys.* 9: 249–304(1992); Pedley et al., "The Potential for Enhanced Tumour Localisation by Poly(ethylene glycol) Modification of anti–CEA Antibody," *Brit. J. Cancer* 70:1126–1130 (1994); Eyre & Farver, *Textbook of Clinical Oncology* 377–390 (Holleb et al. eds. 1991); Lee et al., "Prolonged Circulating Lives of Single–chain of Fv Proteins Conjugated with Polyethylene Glycol: a Comparison of Conjugation Chemistries and Compounds," *Bioconjug. Chem.* 10: 973–981(1999); Nucci et al., "The Therapeutic Value of Poly(Ethylene Glycol)–Modified Proteins," *Adv. Drug Deliv. Rev.* 6: 133–151(1991); Francis et al., "Polyethylene Glycol Modification: Relevance of Improved Methodology to Tumour Targeting," *J. Drug Targeting* 3: 321–340(1996)).

En ciertas divulgaciones, la conjugación del agente terapéutico y permeabilizante de la barrera hematoencefálica puede lograrse mediante el uso de reactivos de unión tales como glutaraldehído, EDCI, cloruro de tereftaloilo, bromuro de cianógeno y similares, o por aminación reductora. En ciertas divulgaciones, los componentes pueden estar unidos a través de un enlazador de hidroxácido del tipo divulgado en el documento WO-A-9317713. Los enlazadores de PEG también pueden usarse para la preparación de diversos fármacos unidos a PEG (véase, por ejemplo, Lee et al., "Reduction of Azides to Primary Amines in Substrates Bearing Labile Ester Functionality: Synthesis of a PEG–Solubilized, "Y"–Shaped Iminodiacetic Acid Reagent for Preparation of Folate–Tethered Drugs," *Organic Lett.*, 1: 179–181(1999)).

También se proporciona un método de selección de compuestos eficaces para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Este método implica proporcionar a un animal modificado con niveles de expresión de CD73 reducidos, niveles de expresión de adenosina reducidos y/o actividad modulada del receptor de adenosina en comparación con un animal no modificado. También se proporcionan uno o más compuestos candidatos y se administran los uno o más compuestos candidatos al animal modificado. A continuación se evalúa si el uno o más compuestos candidatos aumentan el nivel y/o la biodisponibilidad de adenosina, modula los receptores de adenosina y/o aumenta el nivel y/o la actividad de CD73. A continuación se identifican los compuestos candidatos que aumentan el nivel o la biodisponibilidad de adenosina, modulan los receptores de adenosina y/o aumentan el nivel y/o la actividad de CD73 en el animal modificado como potencialmente eficaces para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

En ciertas divulgaciones, el método objeto también se puede poner en práctica con el uso de un animal transgénico. Los animales transgénicos pueden clasificarse ampliamente en dos tipos: "con inserciones inactivadoras" y "con inserciones activadoras". Un transgénico "con inserciones inactivadoras" tiene una alteración en el gen diana producida al introducirse secuencias transgénicas que dan lugar a una disminución de la función del gen diana, preferentemente de modo que la expresión del gen diana sea insignificante o indetectable. Un animal transgénico "con inserciones activadoras" tiene una alteración en el genoma de la célula huésped que da lugar a una expresión aumentada de un gen diana, por ejemplo mediante la introducción de una copia adicional del gen diana o mediante la inserción operativa de una secuencia reguladora que proporciona expresión aumentada de una copia endógena del gen diana. Los animales transgénicos con inserciones activadoras o inserciones inactivadoras pueden ser heterocigóticos u homocigóticos con respecto a los genes diana. Los animales transgénicos de esta divulgación se pueden clasificar ampliamente como con inserciones inactivadoras o con inserciones activadoras, que pueden sobreexpresar o subexpresar CD73, adenosina y/o receptores de adenosina

En ciertas divulgaciones, los animales transgénicos están diseñados para proporcionar un sistema modelo para determinar, identificar y/o cuantificar la modulación de la permeabilidad de la BHE. Tales determinaciones pueden producirse en cualquier momento durante la vida del animal, incluyendo antes o después de la alteración o modificación de la permeabilidad de la BHE. El sistema del modelo transgénico puede usarse también para el desarrollo de agentes biológicamente activos que promueven o aumentan la permeabilidad de la BHE. Además, el sistema modelo puede utilizarse para analizar si un agente de ensayo restablece la barrera o disminuye la permeabilidad (por ejemplo, después de la "apertura" de la BHE (es decir, aumenta la permeabilidad), tal como, la

apertura de la BHE causada por un traumatismo o enfermedad). Además, las células se pueden aislar de los animales transgénicos para su posterior estudio o ensayos llevados a cabo en el contexto de cultivo a base de células o cultivo celular, incluyendo técnicas *ex vivo*.

En ciertas divulgaciones, los modelos animales abarcan cualquier vertebrado no humano que sea susceptible a procedimientos que producen una afección de permeabilidad modificada de la BHE en el sistema nervioso del animal. Los organismos modelo preferidos incluyen, pero no se limitan a los mismos, mamíferos, primates no humanos y roedores. Ejemplos no limitantes de los modelos preferidos son ratas, ratones, cobayas, gatos, perros, conejos, cerdos, chimpancés y monos. Los animales de ensayo pueden ser de tipo salvaje o transgénicos.

Los avances en las tecnologías para la micromanipulación de embriones permiten ahora la introducción de ADN heterólogo también en óvulos de mamífero fertilizados. Por ejemplo, se pueden transformar células madre totipotenciales o pluripotenciales mediante microinyección, precipitación mediada por fosfato de calcio, fusión de liposomas, infección retroviral u otros medios. A continuación, las células transformadas se introducen entonces en el embrión y, después, el embrión se convertirá en un animal transgénico. En una divulgación, los embriones en desarrollo se infectan con un vector viral que contiene un transgén deseado de manera que los animales transgénicos que expresan el transgén se pueden producir a partir del embrión infectado. En otra divulgación, se coinyecta un transgén deseado en el pronúcleo o citoplasma del embrión, preferiblemente en la etapa de una sola célula y se deja que el embrión se desarrolle en un animal transgénico maduro. Estos y otros métodos variantes para generar animales transgénicos están bien establecidos en la técnica y, por lo tanto, no se detallan en el presente documento. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.175.385 y 5.175.384.

La permeabilidad de la BHE se puede probar utilizando diversos indicadores conocidos en la técnica. Por ejemplo, se impide el paso de colorantes, indicadores o marcadores de un peso molecular mayor que 180 Da a través de una BHE intacta. El ensayo puede realizarse en animales de experimentación, incluyendo, sin limitaciones, ratones, ratas, perros, cerdos o monos. Entre los indicadores adecuados se incluyen cualquier colorante, marcador o indicador conocido en la técnica que se utiliza para determinar, visualizar, medir, identificar o cuantificar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Entre los ejemplos no limitantes se incluyen, Evans Blue y fluoresceína sódica.

Otra divulgación adicional se refiere a un agente farmacéutico. Este agente farmacéutico tiene un efecto terapéutico eficaz para tratar el trastorno o afección del sistema nervioso central y un agente permeabilizante de la barrera hematoencefálica, en el que el agente aumenta el nivel y/o la biodisponibilidad de adenosina, modula los receptores de adenosina y/o aumenta el nivel y/o la actividad de CD73.

El producto farmacéutico puede formularse y administrarse sustancialmente de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Ratones

Los ratones CD73^{-/-} se han descrito anteriormente (Thompson et al., "Crucial Role for Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) in Vascular Leakage During Hypoxia," J. Exp. Med. 200:1395-1405 (2004)) y se han retrocruzado con C57BL/6 para 14 generaciones. Los ratones Cd73^{-/-} no tienen una susceptibilidad manifiesta a la infección y parecen normales basándose en el tamaño y la composición celular de sus órganos linfoides y sus respuestas de células T y B en ensayos *in vivo* e *in vitro* (Thompson et al., "Crucial Role for Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) in Vascular Leakage During Hypoxia," J. Exp. Med. 200:1395-1405 (2004)). Los ratones C57BL/6 y *tcra*^{-/-} en el fondo C57BL/6 se adquirieron de The Jackson Laboratories. Los ratones se criaron y alojaron en condiciones específicas libres de patógenos en la Universidad de Cornell o la Universidad de Turku. Para los experimentos de bloqueo de receptores de adenosina, se proporcionó a los ratones agua de bebida suplementada con 0,6 g/l de cafeína (Sigma) o 2 mg/kg de SCH58261 (1 mg/kg s.c. y 1 mg/kg i.p.) en DMSO (45 % en volumen en PBS) o DMSO al 45 % solo, comenzando 1 día antes de la inducción de EAE y continuando durante todo el experimento. Todos los procedimientos realizados en ratones fueron aprobados por el comité de revisión de animales correspondiente.

Ejemplo 2 – Inducción y puntuación de EAE

La EAE se indujo sometiendo a ratones al régimen de inducción de EAE por la glicoproteína de los oligodendrocitos de mielina (MOG) como se describe en Swanborg, "Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rodents as a Model for Human Demyelinating Disease," Clin. Immunol. Immunopathol. 77:4-13 (1995) y Bynoe et al., "Epicutaneous Immunization with Autoantigenic Peptides Induces T Suppressor Cells that Prevent Experimental Allergic Encephalomyelitis," Immunity 19:317-328 (2003). En pocas palabras, se inyectó, por vía subcutánea (50 µl) una emulsión 1:1 del péptido MOG₃₅₋₅₅ (3 mg/ml en PBS) (Invitrogen) y adyuvante completo de Freund (CFA, Sigma) en cada flanco. La toxina pertussis (PTX, 20 ng) (Biological Laboratories Inc.) se administró por vía intravenosa (200 µl en PBS) en el momento de la inmunización y, de nuevo, 2 días después. Se puntuó a los ratones diariamente para la EAE basándose en la gravedad de los síntomas de la enfermedad; 0 = ausencia de enfermedad,

0,5 - 1 = cola débil/flácida, 2 = cola flácida y parálisis parcial de las patas traseras, 3 = parálisis total de las patas traseras, 4 = parálisis de las patas delanteras y traseras, 5 = muerte. Se sacrificó a los ratones con una puntuación de 4.

5 Ejemplo 3 – Preparaciones de células T y transferencia adoptiva

Se sensibilizó a los ratones con el péptido MOG₃₅₋₅₅ en CFA sin PTX. Después de una semana, se recogieron los linfocitos del bazo y de los ganglios linfáticos y se incubaron con tampón ACK (NH₄Cl, 0,15 M, KHCO₃, 1 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,3) para lisar los glóbulos rojos. Las células se incubaron con anticuerpos frente a CD8 (TIB-105), IA^{b,d,v,p,q,r} (212.A1), FcR (2,4-G2), B220 (TIB-164), NK1,1 (HB191) y, después, IgG antiratón de cabra BioMag, IgM e IgG anti-rata de cabra (Qiagen). Después del enriquecimiento magnético negativo, las células CD4⁺ se usaron directamente o se clasificaron en subpoblaciones específicas. Para la clasificación, las células se tiñeron con anticuerpos contra CD4 (RM4-5) y CD73 (TY/23) y, en algunos experimentos, CD25 (PC61), y, después, se aislaron utilizando un FACS Aria (BD Biosciences). La pureza tras la clasificación fue, de forma rutinaria, >99 %. Para la transferencia adoptiva, las células T CD4⁺ totales o clasificadas se lavaron y resuspendieron en PBS estéril. Los ratones receptores recibieron $\leq 2,5 \times 10^6$ células i.v. en 200 μ l de PBS estéril.

Ejemplo 4 - Citometría de flujo

Las suspensiones celulares se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorocromo para CD4 (RM4-5), CD73 (TY/23), o FoxP3 (FJK-16s). La tinción de FoxP3 intracelular se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (eBioscience). Las células teñidas se adquirieron en un FACSCalibur (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star).

25 Ejemplo 5 – Ensayo de citocinas de células T

Se cultivaron células T clasificadas de ratones inmunizados con MOG en presencia de esplenocitos C57BL/6 irradiados con péptido MOG 0 o 10 μ M. Los sobrenadantes se recogieron a las 18 horas y se analizaron utilizando el ensayo de citocina Bio-plex (Biorad) para IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IL-1 β y TNF α .

30 Ejemplo 6 – Inmunohistoquímica ("IHC")

Los ratones anestesiados fueron perfundidos con PBS, y los cerebros, bazo y médulas espinales se aislaron y ultracongelaron en medio tisular Tek-OCT. Secciones cinco μ M (cerebros en una orientación sagital) a los portaobjetos Suprefrost/Plus (Fisher) se fijaron en portaobjetos Suprefrost/Plus (Fisher), se fijaron en acetona y se almacenaron a -80 °C. Para la inmunotinción, los portaobjetos se descongelaron y se trataron con 0,03 % de H₂O₂ en PBS para bloquear la peroxidasa endógena, se bloquearon con caseína (Vector) en suero de cabra normal (Zymed), y luego se incubaron con anti-CD45 (YW62,3), anti-CD4 (RM4-5) o anti-ICAM-1 (3E2). Los portaobjetos se incubaron con Ig de cabra anti-rata biotinilada (Jackson ImmunoResearch) y estreptavidina-HRP (Zymed) y se desarrollaron con un kit de sustrato AEC (Red) (Zymed) y una contratinción de hematoxilina. Los cubreobjetos se montaron con Fluoromount-G y se fotografiaron bajo luz (Zeiss).

Ejemplo 7 - PCR-c en tiempo real

Usando Trizol (Invitrogen), se aisló el ARN de la línea celular del plexo coroideo Z310 (Zheng et al., "Establishment and Characterization of an Immortalized Z310 Choroidal Epithelial Cell Line from Murine Choroid Plexus," Brain Res. 958:371-380 (2002)). El ADNc se sintetizó usando un kit Reverse-iT (ABGene). Se utilizaron cebadores (disponibles a petición) específicos para los AR para determinar los niveles de expresión génica y se estandarizaron a los niveles de genes constitutivos de GAPDH usando un kit de verde SYBR (ABGene) ejecutado en un sistema de PCR en tiempo real ABI 7500. Se realizaron análisis de la curva de fusión para medir la especificidad de cada producto de PCR.

Ejemplo 8 - Evaluación del papel de CD73 en la EAE

Debido a las propiedades inmunomoduladoras e inmunosupresoras de la adenosina, se evaluó el papel de CD73 en EAE. Basándose en un informe de EAE exacerbada en ratones con deficiencia del receptor A1 de adenosina (AR) (Tsutsui et al., "A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis," J. Neurosci. 24:1521-1529 (2004)), se espera que los ratones *cd73*^{-/-} que son incapaces de catalizar la producción de adenosina extracelular experimenten EAE grave. Sorprendentemente, los ratones *cd73*^{-/-} eran altamente resistentes a la inducción de EAE. Sin embargo, las células T CD4⁺ de ratones *cd73*^{-/-} poseen la capacidad para generar una respuesta inmune frente a antígenos del SNC y causan EAE severa cuando se transfiere de forma adoptiva a ratones deficientes en células T *cd73*^{+/+}. Las células T CD73⁺CD4⁺ de ratones de tipo salvaje también causaron enfermedad cuando se transfirieron a receptores *cd73*^{-/-}, lo que sugiere que la expresión de CD73, ya sea en linfocitos o en el SNC, es necesaria para la entrada de los linfocitos en el cerebro durante la EAE. Dado que los ratones *cd73*^{+/+} estaban protegidos contra la inducción de EAE por el antagonista de AR de espectro amplio cafeína y el antagonista A_{2a}específico de AR SCH58261, estos datos

sugieren que la adenosina extracelular generada por CD73, y no por el propio CD73, regula la entrada de linfocitos en el SNC durante la EAE. Estos resultados son los primeros en demostrar un papel de CD73 y la adenosina en la regulación del desarrollo de EAE.

5 Ejemplo 9 - Los ratones *Cd73*^{-/-} son resistentes a la inducción de EAE

Para determinar si CD73 desempeña un papel en el control de la inflamación durante la progresión de la EAE, los ratones *cd73*^{-/-} y de tipo salvaje (*cd73*^{+/+}) fueron sometidos al régimen de inducción de EAE por la glicoproteína de los oligodendrocitos de mielina (MOG) como se describe en Swanborg, "Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rodents as a Model for Human Demyelinating Disease," Clin. Immunol. Immunopathol. 77:4-13 (1995) y Bynoe et al., "Epicutaneous Immunization with Autoantigenic Peptides Induces T Suppressor Cells that Prevent Experimental Allergic Encephalomyelitis," Immunity 19:317-328 (2003)). El control diario del desarrollo de la EAE reveló que los ratones *cd73*^{-/-} mostraban consistentemente una gravedad de la enfermedad drásticamente reducida en comparación con sus homólogos de tipo salvaje (Figura 1). A las tres semanas de la inducción de la enfermedad, los ratones *cd73*^{-/-} tenían una puntuación promedio de EAE de sólo 0,5 (cola débil) comparada con 2,0 (cola flácida y parálisis parcial de las patas traseras) para ratones de tipo salvaje (Figura 1).

Ejemplo 10 - Células T CD4⁺ de ratones *cd73*^{-/-} responden a la inmunización de MOG

A continuación se preguntó si la resistencia de los ratones *cd73*^{-/-} a la inducción de EAE podría explicarse por una mayor capacidad de los linfocitos *cd73*^{-/-} para suprimir una respuesta inmune o una incapacidad de estos linfocitos para responder a la estimulación MOG. Las células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ de origen natural, o Tregs, pueden regular la EAE inducida de forma activa (Kohm et al., "Cutting Edge: CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," J. Immunol. 169:4712-4716 (2002)). Dado que recientemente se ha demostrado que las Treg expresan CD73 y algunos informes sugieren que la actividad enzimática de CD73 es necesaria para la función de las Treg (Kobie et al., "T Regulatory and Primed Uncommitted CD4 T Cells Express CD73, Which Suppresses Effector CD4 T Cells by Converting 5'-Adenosine Monophosphate to Adenosine," J. Immunol. 177:6780-6786; Deaglio et al., "Adenosine Generation Catalyzed by CD39 and CD73 Expressed on Regulatory T Cells Mediates Immune Suppression," J. Exp. Med. 204:1257-1265 (2007)), se preguntó si el número y la actividad supresora de Treg eran normales en los ratones *cd73*^{-/-}. Como se muestra en la Fig. 2A, no hubo diferencias significativas en las frecuencias de Tregs CD4⁺FoxP3⁺ en ratones de tipo salvaje y *cd73*^{-/-}, antes o después de la inducción de EAE. De manera similar, el porcentaje de células T CD4⁺ que expresaban CD73 solo cambió modestamente después de la inducción de EAE en ratones de tipo salvaje (Figura 2B). Además, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de supresión de las Treg de tipo salvaje y *cd73*^{-/-} para inhibir la proliferación de células T efectoras CD4⁺ específicas de antígeno MOG. Para determinar si las células T *cd73*^{-/-} pueden responder cuando se estimulan con el péptido MOG, se evaluó la capacidad de estas células para proliferar y producir citocinas. Las células T CD4⁺ de ratones *cd73*^{-/-} inmunizados con MOG y de tipo salvaje mostraron grados similares de proliferación *in vitro* en respuesta a concentraciones variables del péptido MOG. Sin embargo, las células T CD4⁺ de ratones *cd73*^{-/-} inmunizados con MOG secretaron niveles más altos de IL-17 e IL-1β después de la estimulación *in vitro* de MOG, en comparación con las de células T salvajes CD73⁺CD4⁺ o CD73⁻CD4⁺ (Figura 2C). Los niveles elevados de IL-17 están asociados con EM (Matusevicius et al., "Interleukin-17 mRNA Expression in Blood and CSF Mononuclear Cells is Augmented in Multiple Sclerosis," Mult. Scler. 5:101-104 (1999)) y desarrollo de EAE (Komiyama et al., "IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," J. Immunol. 177:566-573 (2006)), mientras que los niveles altos de la citocina proinflamatoria IL-1β son un factor de riesgo de EM (de Jong et al., "Production of IL-1β and IL-1Ra as Risk Factors for Susceptibility and Progression of Relapse-Onset Multiple Sclerosis," J. Neuroimmunol. 126:172-179 (2002)) y un potenciador de la producción de IL-17 (Sutton et al., "A Crucial Role for Interleukin (IL)-1 in the Induction of IL-17-Producing T Cells That Mediate Autoimmune Encephalomyelitis," J. Exp. Med. 203:1685-1691 (2006)). No se observaron diferencias en la secreción de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, INF-γ y TNF-α entre las células T de tipo salvaje y *cd73*^{-/-} tras la estimulación con MOG (Figura 2C). En general, los resultados de estos ensayos sugieren que las células T *cd73*^{-/-} pueden responder bien a la inmunización con MOG.

A continuación, se determinó si las células T de ratones *cd73*^{-/-} poseen la capacidad de causar EAE. Para probar esto, las células T CD4⁺ del bazo y los ganglios linfáticos de ratones *cd73*^{-/-} inmunizados con MOG se evaluaron para determinar su capacidad para inducir EAE después de la transferencia a ratones receptores *tcra*^{-/-} (*cd73*^{+/+}). Los ratones *Tcra*^{-/-} carecen de células T endógenas y no pueden desarrollar EAE por sí mismos (Elliott et al., "Mice Lacking Alpha Beta + T Cells are Resistant to the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," J. Neuroimmunol. 70:139-144 (1996)). Los ratones receptores *Cd73*^{+/+}*tcra*^{-/-} que recibieron linfocitos T CD4⁺ de donantes *cd73*^{-/-} desarrollaron una enfermedad marcadamente más grave en comparación con los que recibieron células T CD4⁺ de tipo salvaje (Figura 2D). Las células T CD4⁺ donantes de tipo salvaje y *cd73*^{-/-} presentaron iguales grados de expansión tras la transferencia a ratones receptores *cd73*^{+/+}*tcra*^{-/-}. Por lo tanto, las células T CD4⁺ de ratones *cd73*^{-/-} no solo son capaces de inducir EAE, sino que causan EAE más severa que las derivadas de ratones de tipo salvaje cuando se transfieren a ratones *cd73*^{+/+}*tcra*^{-/-}. Estos resultados son consistentes con los ensayos *in vitro* en los que las células T *cd73*^{-/-} CD4⁺ secretaban niveles elevados de IL-17 e IL-1β (que se sabe que exacerban la EAE) en respuesta a la estimulación con MOG (Figura 2C) y sugieren que los ratones *cd73*^{-/-} son

resistentes a la EAE inducida por MOG debido a una falta de expresión de CD73 en células no hematopoyéticas (muy probablemente la falta de expresión en el SNC).

Ejemplo 11 – Los ratones *Cd73*^{-/-} exhiben poca/ninguna infiltración de linfocitos en el SNC tras la inducción de EAE

La EAE es, principalmente, una enfermedad mediada por células T CD4⁺ (Montero et al., "Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by CD4⁺, CD25⁺ and CD8⁺ T Cells: Analysis Using Depleting Antibodies," J. Autoimmun. 23:1–7 (2004)) y durante la progresión de la EAE, los linfocitos deben primero tener acceso al SNC para montar su respuesta inflamatoria frente a los antígenos del SNC, dando como resultado desmielinización axonal y parálisis (Brown et al., "Time Course and Distribution of Inflammatory and Neurodegenerative Events Suggest Structural Bases for the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," J. Comp. Neurol. 502:236–260 (2007)). Para determinar si la infiltración de linfocitos del SNC se observa después de la inducción de EAE en ratones *cd73*^{-/-}, se examinaron secciones de cerebro y de la médula espinal para determinar la presencia de células T CD4⁺ y células CD45⁺ mediante inmunohistoquímica. Los ratones *CD73*^{-/-} mostraron una frecuencia dramáticamente inferior de linfocitos CD4⁺ (Figuras 3D–G) y linfocitos CD45⁺ (Fig. 4) el cerebro y la médula espinal en comparación con los ratones de tipo salvaje (Figuras 3A–C, G) a los 13 de la inmunización con MOG. Además, en los experimentos de rastreo de linfocitos en los que células T específicas de MOG de ratones transgénicos TCR 2d2 (Bettelli et al., "Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-Specific T Cell Receptor Transgenic Mice Develop Spontaneous Autoimmune Optic Neuritis," J. Exp. Med. 197:1073–1081 (2003)) se transfirieron a ratones de tipo salvaje o *cd73*^{-/-} con inducción concomitante de EAE, el porcentaje de células 2d2 en el SNC aumentó varias veces con el tiempo en ratones receptores de tipo salvaje, pero no en todos los receptores *cd73*^{-/-} (Figura 5). En general, estos resultados sugieren que la protección observada frente a la inducción de EAE en ratones *cd73*^{-/-} se asocia con una infiltración de linfocitos del SNC considerablemente reducida. Sin embargo, las células T CD4⁺ de ratones *cd73*^{-/-} inmunizados con MOG tuvieron la capacidad de acceder al SNC cuando se transfirieron a ratones *cd73*^{+/-}*tcrα*^{-/-} que se indujeron de forma concomitante para desarrollar EAE (Figuras 3K y 3L). De hecho, se observó una infiltración más temprana y más extensa de linfocitos CD4⁺ en el SNC en ratones *ccd73*^{+/-}*tcrα*^{-/-} que recibieron células T *cd73*^{-/-} CD4⁺ (Figuras 3K,L) que en los que recibieron células T CD4⁺ de tipo salvaje (Figuras 3H–J). Por lo tanto, estos resultados demuestran que las células T donantes de ratones *cd73*^{-/-} tienen la capacidad de infiltrar el SNC de ratones receptores *cd73*^{+/-}.

Ejemplo 12 - CD73 debe expresarse bien en linfocitos o en el SNC para un desarrollo eficiente de EAE.

A continuación, se preguntó si la expresión de CD73 en células T CD4⁺ puede compensar la falta de expresión de CD73 en el SNC y permitir el desarrollo de EAE. Por lo tanto, las células T CD4⁺ se transfirieron de forma adoptiva de ratones de tipo salvaje inmunizados con MOG a receptores *cd73*^{-/-}, indujeron de forma concomitante EAE y compararon la actividad de la enfermedad con la de receptores de tipo salvaje tratados de un modo similar (Figura 6A). Mientras que los receptores de tipo salvaje desarrollaron enfermedad después de la inducción de EAE, como se esperaba, los receptores *cd73*^{-/-} también desarrollaron EAE prominente con una puntuación promedio de enfermedad de 1,5 a las tres semanas de la inducción de la enfermedad. Esto fue mucho más alto que la puntuación promedio 0,5 que los ratones *cd73*^{-/-} normalmente mostraron en este mismo punto de tiempo (Figura 1). Para definir adicionalmente la asociación de la expresión de CD73 en las células T CD4⁺ con susceptibilidad a EAE, células T CD73⁺CD4⁺ y CD73⁻CD4⁺ clasificadas de ratones de tipo salvaje inmunizados o células T CD4⁺ (CD73⁻) de ratones *cd73*^{-/-} inmunizados, se transfirieron a receptores *cd73*^{-/-} con inducción de EAE concomitante (Figura 6B). Los ratones *cd73*^{-/-} que recibieron células T CD73⁺CD4⁺ de ratones de tipo salvaje desarrollaron EAE con una puntuación promedio de aproximadamente 1,5 a las tres semanas de la inducción. Por el contrario, los ratones *cd73*^{-/-} que recibieron células T CD73⁻CD4⁺ derivadas de tipo salvaje no desarrollaron EAE significativa. Además, las células CD4⁺ ratones donantes *cd73*^{-/-}, que tienen la capacidad de causar EAE grave en ratones *tcrα*^{-/-} que expresan CD73 (Figura 2D), eran también incapaces de potenciar la EAE en ratones receptores *cd73*^{-/-} (Figura 6B). Por lo tanto, aunque la expresión de CD73 en células T puede compensar parcialmente la falta de expresión de CD73 en células no hematopoyéticas, la EAE se induce más eficazmente cuando se expresa CD73 en ambos compartimentos.

La identidad de las células no hematopoyéticas que expresan CD73 que promueven el desarrollo de EAE no se conoce. Las células endoteliales vasculares en la BHE se consideraron candidatos probables, ya que muchos tipos de células endoteliales expresan CD73 (Yamashita et al., "CD73 Expression and Fyn-Dependent Signaling on Murine Lymphocytes," Eur. J. Immunol. 28:2981–2990 (1998)). Sin embargo, la inmunohistoquímica reveló que las células endoteliales del cerebro del ratón son CD73⁻. Durante estos experimentos, se observó que el CD73 está, sin embargo, altamente expresado en el cerebro en el plexo coroideo (Figura 6C), que es un punto de entrada al SNC para los linfocitos durante la progresión de la EAE ((Brown et al., "Time Course and Distribution of Inflammatory and Neurodegenerative Events Suggest Structural Bases for the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," J. Comp. Neurol. 502:236–260 (2007)). La Figura 4D muestra linfocitos infiltrantes en asociación con el plexo coroideo de ratones de tipo salvaje 12 días después de la inducción de EAE. También se observó una tinción mínima de CD73 en las regiones submeningéas de la médula espinal. En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de CD73, ya sea en células T o en el SNC (quizás en el plexo coroideo), es necesaria para un desarrollo eficaz de la EAE.

Ejemplo 13 – Los antagonistas de los receptores de adenosina protegen a los ratones contra la inducción de EAE.

Dado que CD73 cataliza la degradación del AMP en adenosina y AR se expresan en el SNC (Tsutsui et al., "A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis," J. Neurosci. 24:1521–1529 (2004)); Rosi et al., "The Influence of Brain Inflammation Upon Neuronal Adenosine A2B Receptors," J. Neurochem. 86:220–227 (2003)), a continuación se determinó si la señalización de AR es importante durante la progresión de EAE. Los ratones de tipo salvaje y *cd73*^{-/-} se trataron con el antagonista de AR de amplio espectro cafeína (Dall'Igna et al., "Caffeine as a Neuroprotective Adenosine Receptor Antagonist," Ann. Pharmacother. 38:717–718 (2004)) a 0,6 g/l en su agua de bebida, que corresponde a una dosis aproximada de 4,0 mg/ratón de cafeína al día (Johansson et al., "A1 and A2A Adenosine Receptors and A1 mRNA in Mouse Brain: Effect of Long-Term Caffeine Treatment," Brain Res. 762:153–164 (1997)), 1 día antes y durante la duración del experimento de EAE (Figura 7A). Los ratones de tipo salvaje que recibieron cafeína estaban protegidos dramáticamente contra el desarrollo de EAE (Figura 7A), comparable a los resultados publicados anteriormente (Tsutsui et al., "A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis," J. Neurosci. 24:1521–1529 (2004)). Como era de esperar, los ratones *cd73*^{-/-} que recibieron cafeína no desarrollaron EAE (Figura 7A). Debido a que CD73 se expresa considerablemente en el plexo coroideo (Figura 6C), se determinó a continuación si los AR también se expresaban en el plexo coroideo. Usando la línea celular del plexo coroideo murino Z310 (Zheng et al., "Establishment and Characterization of an Immortalized Z310 Choroidal Epithelial Cell Line from Murine Choroid Plexus," Brain Res. 958:371–380 (2002)), solo el ARNm para los subtipos de receptores de adenosina A₁ and A_{2a} se detectó mediante PCRc (Figura 7B). Como se ha demostrado anteriormente que los ratones *A₁AK*^{-/-} desarrollan EAE grave después de la inducción de la enfermedad (Tsutsui et al., "A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis," J. Neurosci. 24:1521–1529 (2004)), se preguntó si el tratamiento de ratones de tipo salvaje con SCH58261 (Melani et al., "The Selective A2A Receptor Antagonist SCH 58261 Protects From Neurological Deficit, Brain Damage and Activation of p38 MAPK in Rat Focal Cerebral Ischemia," Brain Res. 1073–1074:470–480 (2006)), un antagonista de AR específico del subtipo A_{2a} podría proteger contra el desarrollo de EAE. Se administró a los ratones de tipo salvaje 1 mg/kg de SCH58261 en DMSO o DMSO solo tanto i.p. como s.c. (para un total de 2 mg/kg) 1 día antes de la inducción de EAE y diariamente durante 30 días a lo largo del curso del experimento (Figura 7C). Los ratones de tipo salvaje que recibieron SCH58261 fueron protegidos dramáticamente contra el desarrollo de EAE en comparación con los ratones de tipo salvaje que recibieron DMSO solo (Figura 7C). Además, los ratones de tipo salvaje que recibieron SCH58261 mostraron una frecuencia significativamente menor de los linfocitos CD4⁺ en el cerebro y la médula espinal en comparación con los ratones de tipo salvaje tratados con DMSO al día 15 después de la inducción de EAE (Figura 7D). Como los estudios han demostrado que las moléculas de adhesión (tales como ICAM-1, VCAM-1 y MadCAM-1) en el plexo coroideo desempeñan un papel en la patogenia de la EAE (Engelhardt et al., "Involvement of the Choroid Plexus in Central Nervous System Inflammation," Microsc. Res. Tech. 52:112–129 (2001)), se determinó si el tratamiento con SCH58261 afectaba a la expresión de la molécula de adhesión en el plexo coroideo después de la inducción de EAE. La comparación del plexo coroideo de los ratones de tipo salvaje tratados con DMSO and SCH58261 muestra que el bloqueo de los AR A_{2a} impedían la regulación por aumento de ICAM-1 que normalmente se produce durante la progresión de EAE (Figura 8).

Basado en estos resultados, se concluyó que la incapacidad de los ratones *cd73*^{-/-} para catalizar la generación de adenosina extracelular explica su fracaso para desarrollar eficientemente EAE después de la inmunización con MOG y que la expresión de CD73 y la señalización de los AR A_{2a} en el plexo coroideo son requisitos para la progresión de EAE.

El objetivo de este estudio fue evaluar el papel de CD73 en la EAE, un modelo animal de EM. Dado que CD73 cataliza la formación de adenosina extracelular que habitualmente es inmunosupresora (Bours et al., "Adenosine 5'-Triphosphate and Adenosine as Endogenous Signaling Molecules in Immunity and Inflammation," Pharmacol. Ther. 112:358–404 (2006)) y los ratones *A₁AR*^{-/-} exhiben EAE grave (Tsutsui et al., "A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis," J. Neurosci. 24:1521–1529 (2004)), los solicitantes predijeron que los ratones *cd73*^{-/-} también desarrollarían EAE grave. Sin embargo, los ratones *cd73*^{-/-} fueron muy resistentes a la inducción de EAE, un hallazgo sorprendente considerando la plétora de estudios que demuestran que los ratones *cd73*^{-/-} son más propensos a la inflamación. Por ejemplo, los ratones *cd73*^{-/-} son más susceptibles a la lesión pulmonar inducida por bleomicina (Volmer et al., "Ecto-5'-Nucleotidase (CD73)-Mediated Adenosine Production is Tissue Protective in a Model of Bleomycin-Induced Lung Injury," J. Immunol. 176:4449–4458 (2006)) y son más propensos a la inflamación vascular ya la formación de la neointima (Zernecke et al., "CD73/ecto-5'-Nucleotidase Protects Against Vascular Inflammation and Neointima Formation," Circulation 113:2120–2127 (2006)). En consonancia con estos informes, los solicitantes mostraron que las células T *cd73*^{-/-} produjeron mayores niveles de citocinas proinflamatorias IL-1β e IL-17 asociadas con la EAE después de la estimulación con MOG. Además, la transferencia adoptiva de las células T *cd73*^{-/-} a ratones *tcrα*^{-/-}, que carecen de células T pero expresan CD73 en toda su periferia, da como resultado una inflamación grave del SNC después de la inmunización con MOG, consistente con un papel de la adenosina como mediador antiinflamatorio. Es interesante observar que se ha demostrado que el tratamiento con IFN-β, una de las terapias más eficaces para la EM, regula por aumento la expresión de CD73 en células endoteliales tanto *in vitro* como *in*

vivo Airas et al., "Mechanism of Action of IFN- β in the Treatment of Multiple Sclerosis: A Special Reference to CD73 and Adenosine," Ann. N. Y. Acad. Sci. 1110:641-648 (2007)). Por lo tanto, aunque el mecanismo mediante el cual el IFN- β beneficia a los pacientes con EM no se entiende completamente, el aumento de la producción de adenosina acompañado de sus conocidos efectos antiinflamatorios y neuroprotectores podría ser un factor.

Conforme a su resistencia a la inducción de EAE, los ratones *cd73*^{-/-} tenían una menor frecuencia de células que infiltran el SNC durante la EAE en comparación con ratones de tipo salvaje. Esto también fue un hallazgo inesperado, ya que previamente se ha demostrado que la adenosina generada por CD73 restringe la migración de neutrófilos a través del endotelio vascular durante la hipoxia y de los linfocitos a través de vénulas endoteliales altas de los ganglios linfáticos drenantes (Thompson et al., "Crucial Role for Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) in Vascular Leakage During Hypoxia," J. Exp. Med. 200:1395-1405 (2004)). Los datos de los solicitantes, en contraste, sugieren que CD73 y la adenosina extracelular generada por CD73, son necesarios para el paso eficiente de células T patógenas en el SNC. Por lo tanto, el papel que CD73 y la adenosina desempeñan en la infiltración de linfocitos del SNC durante la EAE es más profundo que su papel en la modulación de la neuroinflamación.

Es importante saber dónde debe expresarse CD73 para la migración de células T en el SNC. CD73 se encuentra en subpoblaciones de células T (Yamashita et al., "CD73 Expression and Fyn-Dependent Signaling on Murine Lymphocytes," Eur. J. Immunol. 28:2981-2990 (1998)), así como en algunas células epiteliales (Strohmeier et al., "Surface Expression, Polarization, and Functional Significance of CD73 in Human Intestinal Epithelia," J. Clin. Invest. 99:2588-2601 (1997) y endoteliales (Yamashita et al., "CD73 Expression and Fyn-Dependent Signaling on Murine Lymphocytes," Eur. J. Immunol. 28:2981-2990 (1998)). Los datos presentados aquí demuestran claramente que aunque las células T *cd73*^{-/-} responden bien a la inmunización por MOG, no pueden entrar en el SNC a menos que CD73 se exprese en tejidos no hematopoyéticos (es decir, ratones *cd73*^{+/-}*tcr α* ^{-/-} que desarrollan EAE después de la transferencia adoptiva de células T CD4⁺ de ratones *cd73*^{-/-}). Una falta de CD73 en células no hematopoyéticas también puede compensarse, en parte, por la expresión de CD73 en células T (es decir, los ratones *cd73*^{-/-} se vuelven susceptibles a la EAE cuando se transfieren adoptivamente células T CD73⁺, pero no CD73⁻, CD4⁺). Mientras que se consideraron las células endoteliales de la BHE como una fuente relevante de CD73 en el SNC, porque CD73 se expresa en las células endoteliales del cerebro humano (Airas et al., "Mechanism of Action of IFN- β in the Treatment of Multiple Sclerosis: A Special Reference to CD73 and Adenosine," Ann. N. Y. Acad. Sci. 1110:641-648 (2007)), la inmunohistoquímica reveló que las células endoteliales de cerebro de ratón son CD73⁻. Sin embargo, se encontró que CD73 se expresaba altamente en las células epiteliales del plexo coroideo, que forman la barrera entre la sangre y el líquido cefalorraquídeo (LCR) y tienen un papel en la regulación de la inmunovigilancia de los linfocitos en el SNC (Steffen et al., "CAM-1, VCAM-1, and MADCAM-1 are Expressed on Choroid Plexus Epithelium but Not Endothelium and Mediate Binding of Lymphocytes In Vitro," Am. J. Pathol. 148:1819-1838 (1996)). También se ha sugerido que el plexo coroideo es el punto de entrada de las células T durante el inicio de la progresión de la EAE (Brown et al., "Time Course and Distribution of Inflammatory and Neurodegenerative Events Suggest Structural Bases for the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," J. Comp. Neurol. 502:236-260 (2007)). Mientras que el papel de las interacciones de células endoteliales cerebrales-linfocitos a través de la unión VLA-4/VCAM-1 tanto en EAE como en EM está bien documentado (Rice et al., "Anti- α 4 Integrin Therapy for Multiple Sclerosis: Mechanisms and Rationale," Neurology 64:1336-1342 (2005)), tal vez el tráfico de linfocitos a través de la BHE endotelial es más importante para el mantenimiento y la progresión de la enfermedad que para la iniciación de la enfermedad, al menos en la EAE.

La siguiente cuestión es cómo CD73 facilita la migración de células T al SNC. Trabajos anteriores mostraron que el CD73 de los linfocitos puede estimular la unión de linfocitos humanos a células endoteliales de una forma dependiente de LFA-1 (Airas et al., "CD73 Engagement Promotes Lymphocyte Binding to Endothelial Cells Via a Lymphocyte Function-Associated Antigen-1-dependent Mechanism," J. Immunol. 165:5411-5417 (2000)). Sin embargo, esto no parece ser función de CD73 en la EAE, debido a que las células T deficientes en CD73 pueden entrar en el SNC y causar enfermedad grave en ratones *cd73*^{+/-}*tcr α* ^{-/-} (Figura 2D). Como alternativa, CD73 puede funcionar como una enzima para producir adenosina extracelular, un ligando para los AR de superficie celular. Es esta última función que es relevante para el trabajo actual dado que el bloqueo AR con cafeína o SCH58261 puede proteger a los ratones de la EAE. Mientras que el antagonista de AR de amplio espectro cafeína también inhibe ciertas fosfodiesterasas (Choi et al., "Caffeine and Theophylline Analogues: Correlation of Behavioral Effects With Activity as Adenosine Receptor Antagonists and as Phosphodiesterase Inhibitors," Life Sci. 43:387-398 (1988)), su modulación de la progresión de la EAE es más probable a través de su efecto sobre la señalización de AR (Tsutsui et al., "A1 Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis," J. Neurosci. 24:1521-1529 (2004)). Esta idea está respaldada por el hecho de que SCH58261 también previene la progresión de EAE inhibiendo específicamente la señalización de AR A_{2a}. Dado que CD73 y los subtipos de AR, A₁ y A_{2a}, se expresan en el plexo coroideo, la adenosina extracelular producida por CD73 en el plexo coroideo puede señalar de forma autocrina.

Puesto que los AR A₁ y A_{2a} son funcionalmente antagonistas entre sí y tienen diferentes afinidades para la adenosina (Quarta et al., "Opposite Modulatory Roles for Adenosine A1 and A2A Receptors on Glutamate and Dopamine Release in the Shell of the Nucleus Accumbens. Effects of Chronic Caffeine Exposure," J. Neurochem. 88:1151-1158 (2004)), la concentración extracelular de adenosina determina cómo responderá una célula que expresa los receptores A₁ y A_{2a}; creando de este modo un interruptor mecánico por el cual las concentraciones bajas

de adenosina activan el subtipo A₁ y concentraciones más altas estimulan el subtipo A_{2a} (Ciruela et al., "Presynaptic Control of Striatal Glutamatergic Neurotransmission by Adenosine A₁-A_{2A} Receptor Heteromers," J. Neurosci. 26:2080–2087 (2006)). En el SNC, hay evidencias que sugieren que esta interacción A₁/A_{2a} es importante para mediar la neuroinflamación, donde la señalización de A₁ es protectora mientras que la señalización de A_{2a} promueve la inflamación. Por ejemplo, los ratones que carecen del receptor de adenosina A₁ desarrollan EAE grave después de la inducción de la enfermedad (Tsutsui et al., "A₁ Adenosine Receptor Upregulation and Activation Attenuates Neuroinflammation and Demyelination in a Model of Multiple Sclerosis," J. Neurosci. 24:1521–1529 (2004)), mientras que los ratones que reciben un antagonista de A_{2a} están completamente protegidos contra la EAE (Figura 5C). Además, los ratones que carecen del receptor A_{2a} están protegidos de lesiones cerebrales inducidas por isquemia focal transitoria (Chen et al., "A_{2A} Adenosine Receptor Deficiency Attenuates Brain Injury Induced by Transient Focal Ischemia in Mice," J. Neurosci. 19:9192–9200 (1999)). Por lo tanto, la señalización de adenosina generada por CD73 en el plexo coroideo parece desempeñar un papel muy importante en la modulación de la inflamación en el SNC.

Esta señalización de adenosina regula muy probablemente la expresión de las moléculas de adhesión en el plexo coroideo. Los estudios han demostrado que la regulación por aumento de las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y MadCAM-1 en el plexo coroideo está asociada con la progresión de la EAE (Engelhardt et al., "Involvement of the Choroid Plexus in Central Nervous System Inflammation," Microsc. Res. Tech. 52:112–129 (2001)). Como los ratones tratados con el antagonista de AR A_{2a} SCH58261 no experimentan una expresión aumentada de ICAM-1 en el plexo coroideo (Figura 8), como normalmente se produce después de la inducción de EAE (Engelhardt et al., "Involvement of the Choroid Plexus in Central Nervous System Inflammation," Microsc. Res. Tech. 52:112–129 (2001)), los presentes resultados sugieren que la señalización del AR A_{2a} AR aumenta la ICAM-1 durante la progresión de EAE.

En resumen, estos datos demuestran que CD73 desempeña un papel crítico en la progresión de la EAE. Los ratones que carecen de CD73 están protegidos de los síntomas degenerativos y la inflamación del SNC que se asocian con la inducción de EAE. Este es el primer estudio que demuestra un requisito de la expresión CD73 y la señalización de AR para la entrada eficiente de linfocitos en el SNC durante la EAE. Los datos presentados aquí pueden marcar las primeras etapas de un viaje que conducirá a nuevas terapias para la EM y otras enfermedades neuroinflamatorias.

Ejemplo 14 - La BHE puede modularse a través de la activación de los receptores de adenosina

El objetivo de este experimento fue determinar si la barrera hematoencefálica podía modularse mediante la activación de los receptores de adenosina. NECA es un agonista del receptor de adenosina no selectivo, con afinidades similares por los receptores de adenosina A₁, A_{2a} y A₃, y una afinidad baja por el receptor de adenosina A_{2b}. Con el fin de determinar si la activación de los receptores de adenosina inducirían extravasación del colorante Evans Blue a través de la barrera hematoencefálica (BHE), los ratones se trataron con: NECA, un agonista no selectivo del receptor de adenosina (n = 5, 100 µl, 0,01 nM); SCH58261, un antagonista específico del receptor A_{2a} de adenosina (n = 5, 1 mg/kg); toxina pertussis, un agente que se sabe que induce la filtración de la BHE y como tal se usa como control positivo (n = 7, 200 µl); y PBS como control del vehículo (n = 5, 100 µl). Los ratones CD73^{-/-} que carecen de la capacidad para producir adenosina extracelular, también fueron tratados con NECA (n = 4, 100 µl 0,01 nM). Los tratamientos se administraron como una sola inyección i.v. una hora antes de la inyección i.v. de 200 µl de colorante Evans Blue al 1 % (2 µg de colorante total inyectado). Cuatro horas después de la administración de Evans Blue, se anestesió a los ratones con una mezcla de ketamina/xilazina y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con PBS enfriado con hielo. Los cerebros se cosecharon y se homogeneizaron en N, N-dimetilformamida (DMF) a 5 µl/mg (v: p). El tejido se incubó durante 72 horas a temperatura ambiente en DMF para extraer el colorante. Después de la extracción, la mezcla de tejido/disolvente se centrifugó a 500 xg durante 30 minutos y se leyeron 100 µl de sobrenadante en un espectrofotómetro BioTex a 620 nm. Los datos se expresan como µg de Evans Blue/ml de DMF.

El tratamiento de los ratones con el agonista general de receptores de adenosina NECA puede inducir la migración del colorante a través de la barrera hematoencefálica. Esto sugiere que esta barrera puede modularse a través de la activación de los receptores de adenosina. En la Figura 9A, los ratones CD73^{-/-}, que carecen de adenosina extracelular y, por banyo, pueden señalar adecuadamente a través de los receptores de adenosina, se trataron con NECA, dando lugar a un aumento de casi cinco veces de la migración del colorante frente al PBS control. Se usó SCH58261 como control negativo, ya que los solicitantes han demostrado que el bloqueo del receptor de adenosina A_{2a} usando este antagonista puede impedir la entrada de linfocitos en el cerebro (Mills et al., "CD73 is Required for Efficient Entry of Lymphocytes into the Central Nervous System During Experimental Autoimmune Encephalomyelitis," Proc. Natl. Acad. Sci. 105(27):9325–9330 (2008)). En la figura 9B, los ratones SV tratados con NECA también muestran un aumento con respecto a los ratones control. Se usa Pertussis como control positivo, ya que se sabe que induce permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el modelo de EAE de ratón.

Ejemplo 15 - Los receptores de adenosina A_{2a} y A_{2b} se expresan en la línea celular endotelial humana hCMEC/D3

Con el fin de establecer una barrera hematoencefálica *in vitro* (BHE), se obtuvo la línea celular endotelial de cerebro

humano hCMEC (Weksler et al., "Blood-brain Barrier-specific Properties of a Human Adult Brain Endothelial Cell Line," J. Neurochem. 19(13):1872-4 (2005); Poller et al., "The Human Brain Endothelial Cell Line hCMEC/D3 as a Human Blood-brain Barrier Model for Drug Transport Studies," J. Neurochem. 107(5):1358-1368 (2008)), que previamente se ha descrito que tienen propiedades de BHE. Aquí, se estableció el patrón de expresión de los receptores de adenosina en estas células

Las células hCMEC/D3 se hicieron crecer hasta confluencia, se cosecharon y se extrajo el ARN utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó usando un kit de ADNc Verso (Thermo Scientific, Waltham, MA), y se realizó PCR en tiempo real usando Power SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Como se muestra en la Figura 10, se descubrió que los receptores de adenosina A2a y A2b se expresaban en la línea de células endoteliales humanas hCMEC/D3.

Ejemplo 16 – La estimulación del receptor de adenosina de células endoteliales cerebrales promueve la migración de linfocitos a través de la BHE

La barrera hematoencefálica (BHE) está compuesta por células endoteliales. Durante las etapas tardías de la EAE, se sabe que los linfocitos atraviesan la BHE. Con el fin de determinar si la estimulación del receptor de adenosina de las células endoteliales cerebrales podría promover la migración de linfocitos a través de la BHE, se estableció una BHE *in vitro*. La línea celular endotelial de cerebro humano hCMEC/D3 (Weksler et al., "Blood-brain Barrier-specific Properties of a Human Adult Brain Endothelial Cell Line," J. Neurochem. 19(13):1872-4 (2005); Poller et al., "The Human Brain Endothelial Cell Line hCMEC/D3 as a Human Blood-brain Barrier Model for Drug Transport Studies," J. Neurochem. 107(5):1358-1368 (2008)), se obtuvo, que previamente se ha descrito que tienen propiedades de BHE.

Las células hCMEC/D3 se sembraron en Transwell y se dejaron crecer hasta confluencia. Se añadieron 2×10^6 células Jurkat a la cámara superior con o sin NECA (agonista general del receptor de adenosina [AR]), CCPA (agonista de A1AR), CGS 21680 (agonista de A2AAR) o vehículo DMSO. Después de 24 horas, se contaron las células migradas en la cámara inferior. Los valores son relativos al número de células que migran a través de transwells no sembrados con HCMECD3.

Como se muestra en la Figura 11, NECA, un agonista del receptor de adenosina de amplio espectro, indujo una cierta migración. CGS, el agonista del receptor A2a de adenosina promovió la migración de linfocitos a través de la BHE *in vitro* cuando se usó a una concentración menor. La CCPA, el agonista de A1, indujo la migración de linfocitos a niveles altos posiblemente debido a la activación del receptor de adenosina A2a, que tiene una afinidad más baja para CCPA y, por lo tanto, solo se activa a niveles más altos de CCPA.

Ejemplo 17 – La activación del receptor de adenosina A2a promueve la migración de linfocitos a través de CP

El plexo coroideo ("CP") controla la migración de linfocitos hacia el SNC. El CP expresa los receptores de adenosina A1 y A2a. La EAE se evita en ratones cuando la actividad del receptor de adenosina A2a se bloquea. La EAE se potencia cuando falta el receptor de adenosina A1. Se planteó la hipótesis de que la activación del receptor de adenosina A2a promueve la migración de linfocitos a través del CP. Las células Z310 son una línea celular de plexo coroideo murino.

Para probar la hipótesis, las membranas de Transwell se sembraron con células Z310 y se dejaron crecer hasta confluencia. Se añadieron 2×10^6 células Jurkat a la cámara superior con o sin NECA ($n = 1$, agonista general de AR), CCPA (agonista de A1AR), CGS 21680 ($n = 1$, agonista de A2AAR) o vehículo DMSO ($n = 1$). Después de 24 horas, se contaron las células migradas en la cámara inferior. Los valores son relativos al número de células que migran a través de transwells sin sembrar con Z310 y los resultados se muestran en la Figura 12.

Como se muestra en la Figura 12, NECA, un agonista del receptor de adenosina de amplio espectro, indujo migración. CGS, el agonista del receptor A2a de adenosina, indujo la migración de linfocitos a través del CP. CCPA, el agonista de A1 indujo la migración de los linfocitos a niveles altos posiblemente debido a la activación del receptor A2a de adenosina, que tiene una afinidad más baja para CCPA y, como tal, solo se activa a altos niveles de CCPA.

Ejemplo 18 – Las células endoteliales de cerebro humano son sensibles a la regulación del AMPc inducida por receptores de adenosina

La activación del receptor de adenosina regula los niveles de AMPc en las células. Con el fin de determinar la sensibilidad de las células endoteliales del cerebro humano a la regulación de AMPc inducida por el receptor de adenosina, se cultivaron células endoteliales de cerebro humano con agonistas del receptor de adenosina a diversas concentraciones, seguido del análisis de los niveles de AMPc, como se muestra en la Figura 13.

Las células HCMECD3 se cultivaron hasta confluencia en placas de 24 pocillos. Puesto que se sabe que la estimulación del receptor de adenosina (AR) influye sobre niveles de AMPc, las células se trataron con o sin diversas concentraciones de NECA (agonista general de AR), CCPA (agonista A1AR), CGS 21680 (agonista A2AAR), vehículo DMSO o forskolina (induce AMPc). Después de 15 minutos, se añadió tampón de lisis y las células se congelaron a -80 °C para detener la reacción. Se utilizaron muestras duplicadas para cada afección. Los niveles de AMPc se ensayaron usando un kit de detección de AMPc (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Como se muestra en la Figura 13, el agonista del receptor de adenosina de amplio espectro NECA aumentó los niveles de AMPc, de modo que se verificó que estas células pueden responder a la señalización del receptor de adenosina. Los niveles altos de CCPA, el agonista A1 del receptor de adenosina, aumentaron los niveles de AMPc, quizá debido a la activación del receptor A2a de adenosina, que tiene una afinidad más baja por CCPA y, como tal, solo se activa a niveles altos de CCPA. CGS, el agonista A2a del receptor de adenosina, aumentó ligeramente los niveles de AMPc en la línea de células endoteliales de cerebro humano.

Ejemplo 19 - Los ratones hembra con inserciones inactivadoras del receptor A1 de adenosina desarrollan EAE más severos que los de tipo salvaje

Los receptores de adenosina A1 and A2a se expresan en el plexo coroideo. Los antagonistas de los receptores A2a de adenosina protegen a los ratones de la EAE. ¿Son los ratones que carecen del receptor A1 de adenosina son propensos al desarrollo de EAE más grave que los controles de tipo salvaje? Para responder a esta pregunta, se compararon los perfiles de la enfermedad de ratones de tipo salvaje y ratones defectivos para el receptor A1 de adenosina.

Se inmunizó a ratones hembra defectivos en el receptor A1 de adenosina (A1ARKO, n = 5) y de tipo salvaje (SV, n = 5) con CFA/MOG₃₅₋₅₅ + PTX el 12/02/08 y se puntuaron diariamente durante 41 días. Como muestran los resultados en la Figura 14, los ratones A1ARKO desarrollan EAE más grave que los SV y también desarrollan la enfermedad con mayor velocidad que los SV.

Ejemplo 20 - Cerebros procedentes de ratones de tipo salvaje alimentados con un antagonista de los receptores de adenosina tienen niveles más altos de FITC-Dextrano que los cerebros de ratones CD73^{-/-} alimentados con un antagonista de los receptores de adenosina

Para examinar los efectos de la cafeína, un antagonista general de los receptores de adenosina, sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, se alimentó a los ratones con cafeína durante varios días y después se les inyectó dextrano-FITC, usado habitualmente para evaluar la permeabilidad endotelial.

Más particularmente, se alimentó a los ratones con 0,6 g/l de cafeína (Sigma, St. Louis, MO) en agua o agua normal a demanda durante cinco días. Se inyectó a los ratones i.p. dextrano-FITC (PM 10.000, Molecular Probes, Eugene, OR) y, después de 30 minutos se prefundió a los ratones PBS enfriado con hielo a través del ventrículo izquierdo. Se extirparon los cerebros y se ultracongelaron en OCT (Tissue Tek, Torrance, CA) y se almacenaron a -80 °C hasta seccionar. Las secciones de tejido (5 µm) se tiñeron con hematoxilina para microscopia óptica y con DAPI para una contratinción fluorescente. Los resultados se muestran en la figura 15.

Como se muestra en la Figura 15A, la visualización de secciones cerebrales de ratones CD73^{-/-} alimentados con cafeína mostró un color verde mucho menos intenso que los ratones de tipo salvaje, lo que indica menos extravasación de dextrano-FITC a través de la barrera hematoencefálica. Las secciones cerebrales de ratones de tipo salvaje mostraron un fondo intensamente verde (Figura 15B), que es indicativo de más extravasación de dextrano-FITC a través de la barrera hematoencefálica. La Figura 16 muestra los resultados para ratones de tipo salvaje de forma gráfica.

Ejemplo 21 El agonista de los receptores de adenosina NECA aumenta la extravasación del colorante Evans Blue a través de la barrera hematoencefálica

El objetivo de este experimento fue determinar si la barrera hematoencefálica podía modularse mediante la activación de los receptores de adenosina. NECA es un agonista del receptor de adenosina no selectivo, con afinidades similares por los receptores de adenosina A1, A2a y A3, y una afinidad baja por el receptor de adenosina A2b.

Para determinar si la activación de los receptores de adenosina induciría extravasación del colorante Evans Blue a través de la barrera hematoencefálica (BHE), se trató a los ratones primero el primer uno con NECA, un agonista no selectivo del receptor de adenosina (n = 2, 100 µl, 0,01 nM); y PBS como control del vehículo (n = 2, 100 µl). El día 2, los ratones se inmunizaron con CFA-MOG₃₅₋₅₅ y pertussis para inducir EAE. A continuación, se administró NECA o PBS cada dos días en los días 3, 5, 7 y 9. El día 10, se inyectó a los ratones por vía intravenosa 200 µl de colorante Evans Blue al 1 % (2 µg de colorante en total inyectado). Seis horas después de la administración de Evans Blue, se anestesió a los ratones con una mezcla de ketamina/xilazina y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con PBS enfriado con hielo. Los cerebros se cosecharon y se homogeneizaron en N, N-dimetilformamida

(DMF) a 5 µl/mg (v: p). El tejido se incubó durante 72 horas a temperatura ambiente en DMF para extraer el colorante. Después de la extracción, la mezcla de tejido/disolvente se centrifugó a 500 xg durante 30 minutos y se leyeron 100 µl de sobrenadante en un espectrofotómetro BioTex a 620 nm. Los datos se expresan como pg de Evans Blue/ml de DMF y se muestran en la Figura 17.

- 5 Este experimento demuestra que el tratamiento de ratones con el agonista general de los receptores de adenosina NECA induce la migración de colorante Evans Blue al SNC en ratones inmunizados para EAE. Esto sugiere que la barrera hematoencefálica en el modelo de EAE puede modularse a través de la activación de los receptores de adenosina. Los ratones SV con EAE tratados con NECA muestran un aumento de la permeabilidad de la BHE sobre
- 10 los ratones de EAE control con PBS.

REIVINDICACIONES

1. Un agonista del receptor A2A de adenosina y/o a un antagonista del receptor A1 de adenosina para su uso en el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto, en donde el sujeto es aquel que se beneficiaría de un incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y en donde el sujeto no está sometido a un tratamiento que aumente el nivel de adenosina.
5
2. El agente de la reivindicación 1, en donde el agente es un agonista del receptor A2A de adenosina.
- 10 3. El agente de la reivindicación 1, en donde el agente es un antagonista del receptor A1 de adenosina.
4. Un antagonista del receptor A2A de adenosina para su uso en la disminución de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto, en donde el sujeto es aquel que se beneficiaría de una permeabilidad disminuida de la barrera hematoencefálica.
15
5. El agente de la reivindicación 4, en donde el sujeto tiene una enfermedad inflamatoria o en donde el sujeto tiene una afección mediada por la entrada de linfocitos en el cerebro.
- 20 6. El agente de la reivindicación 4, en donde el sujeto tiene la afección de esclerosis múltiple.
7. Uso de un agonista del receptor A2A de adenosina y/o de un antagonista del receptor A1 de adenosina en la fabricación de un medicamento para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto, en donde el sujeto es aquel que se beneficiaría de un incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y en donde el sujeto no está sometido a un tratamiento que aumente el nivel de adenosina.
25
8. Uso de un antagonista del receptor A2A de adenosina en la fabricación de un medicamento para disminuir la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un sujeto, en donde el sujeto es aquel que se beneficiaría de una permeabilidad disminuida de la barrera hematoencefálica.

FIG. 1

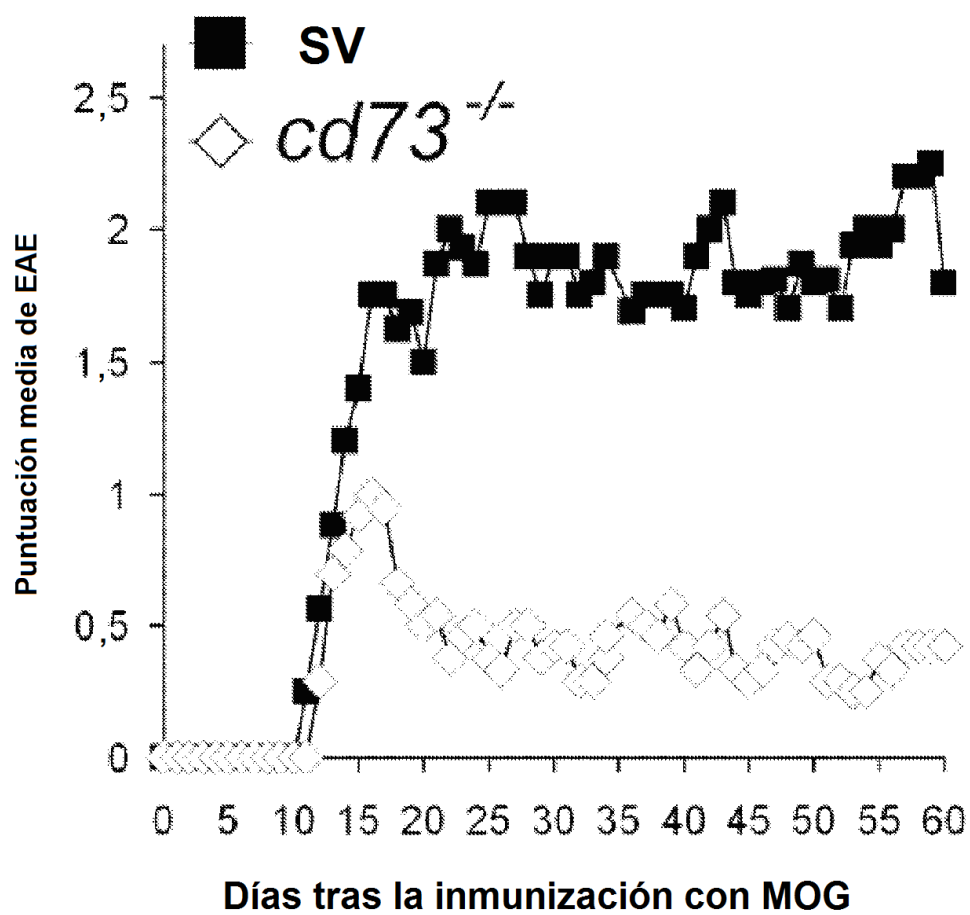


FIG. 2

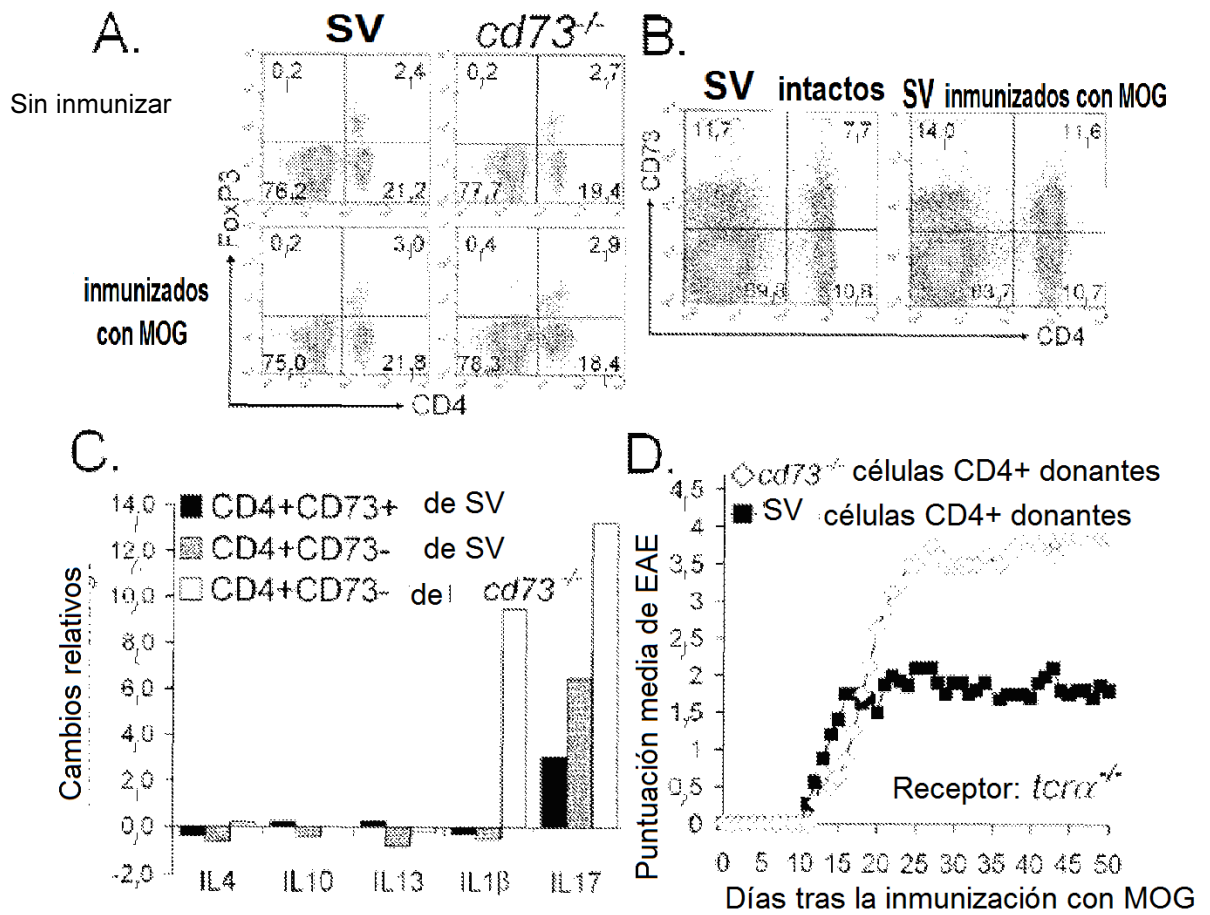


FIG. 3

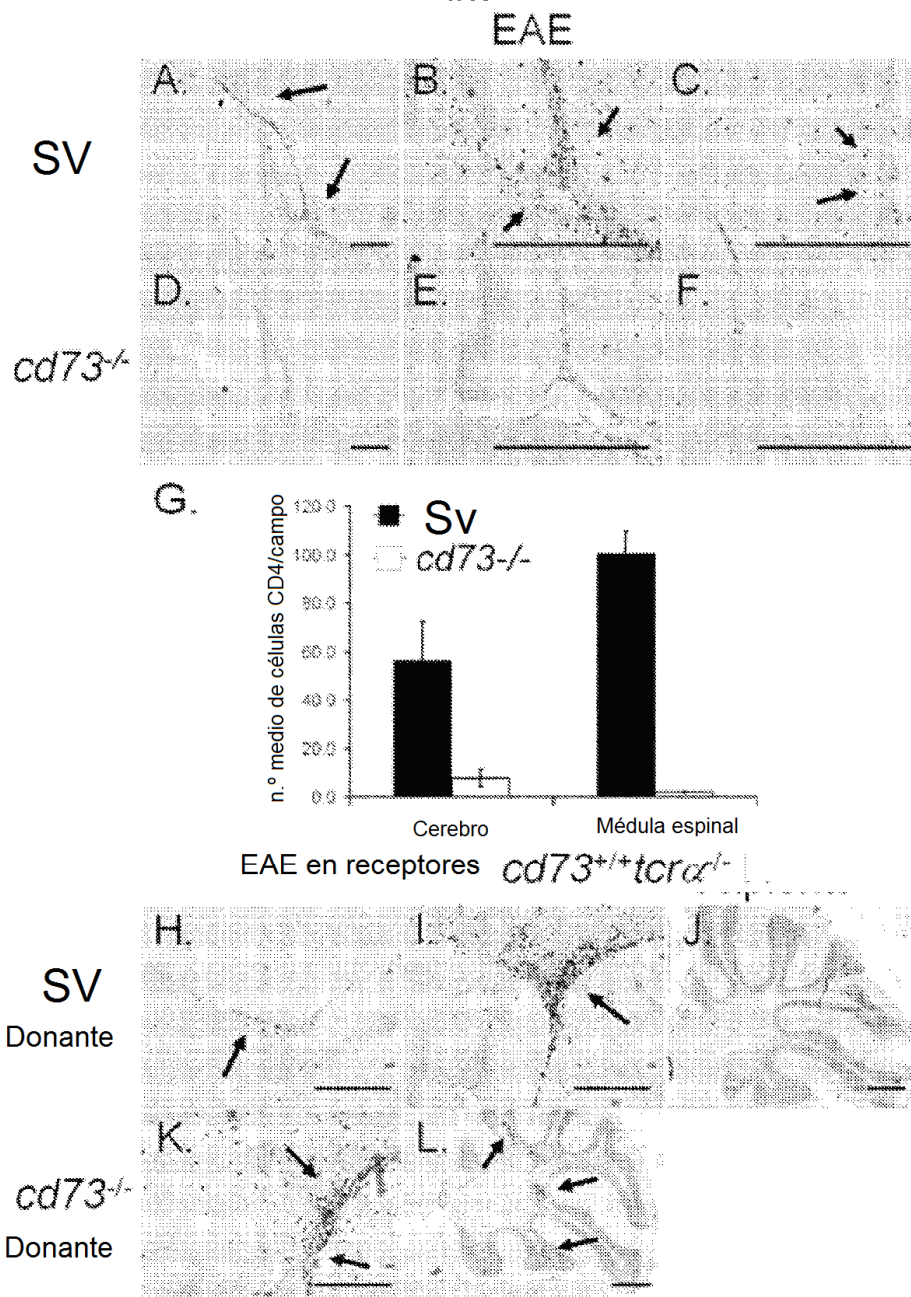


FIG. 4

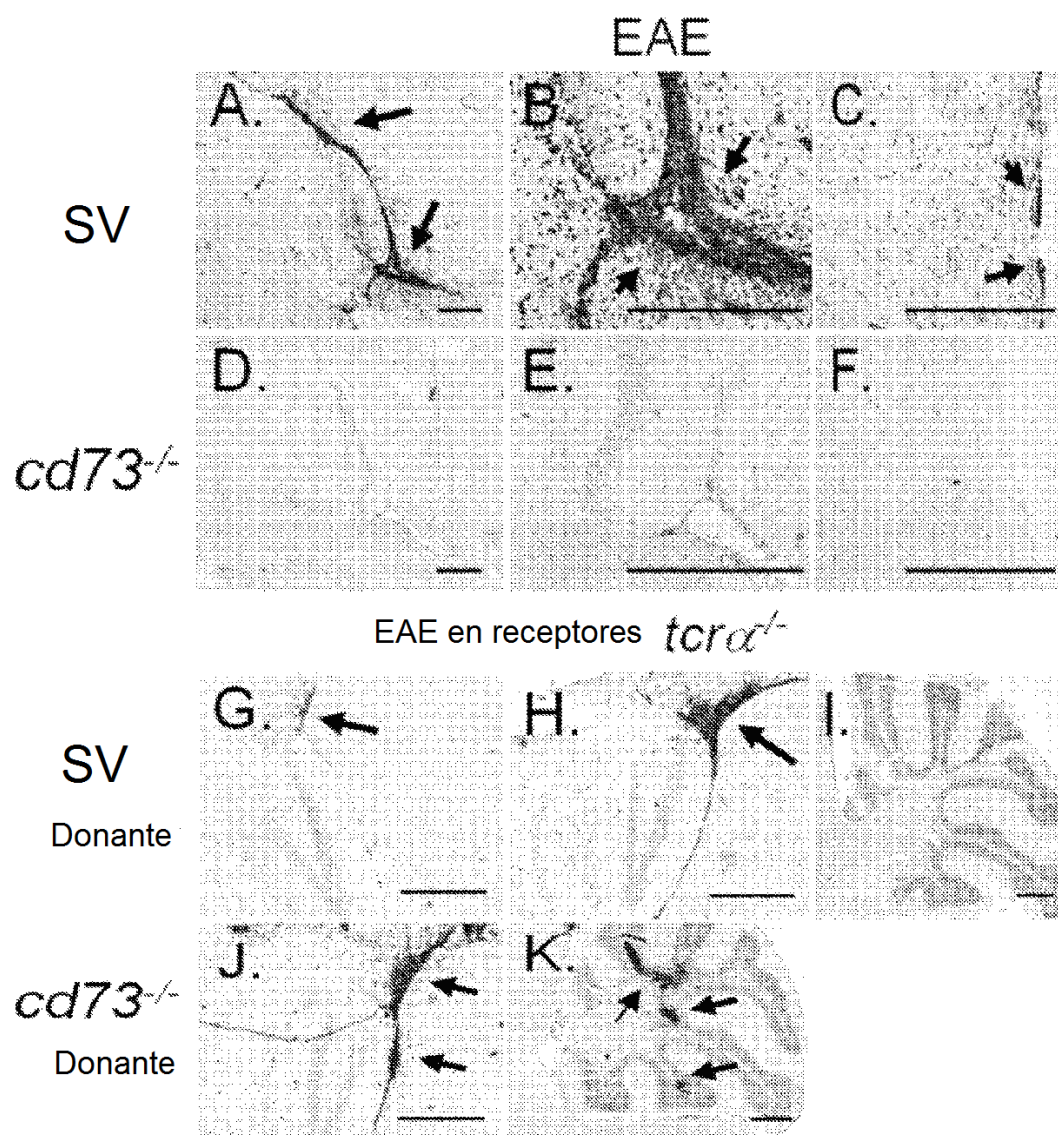


FIG. 5

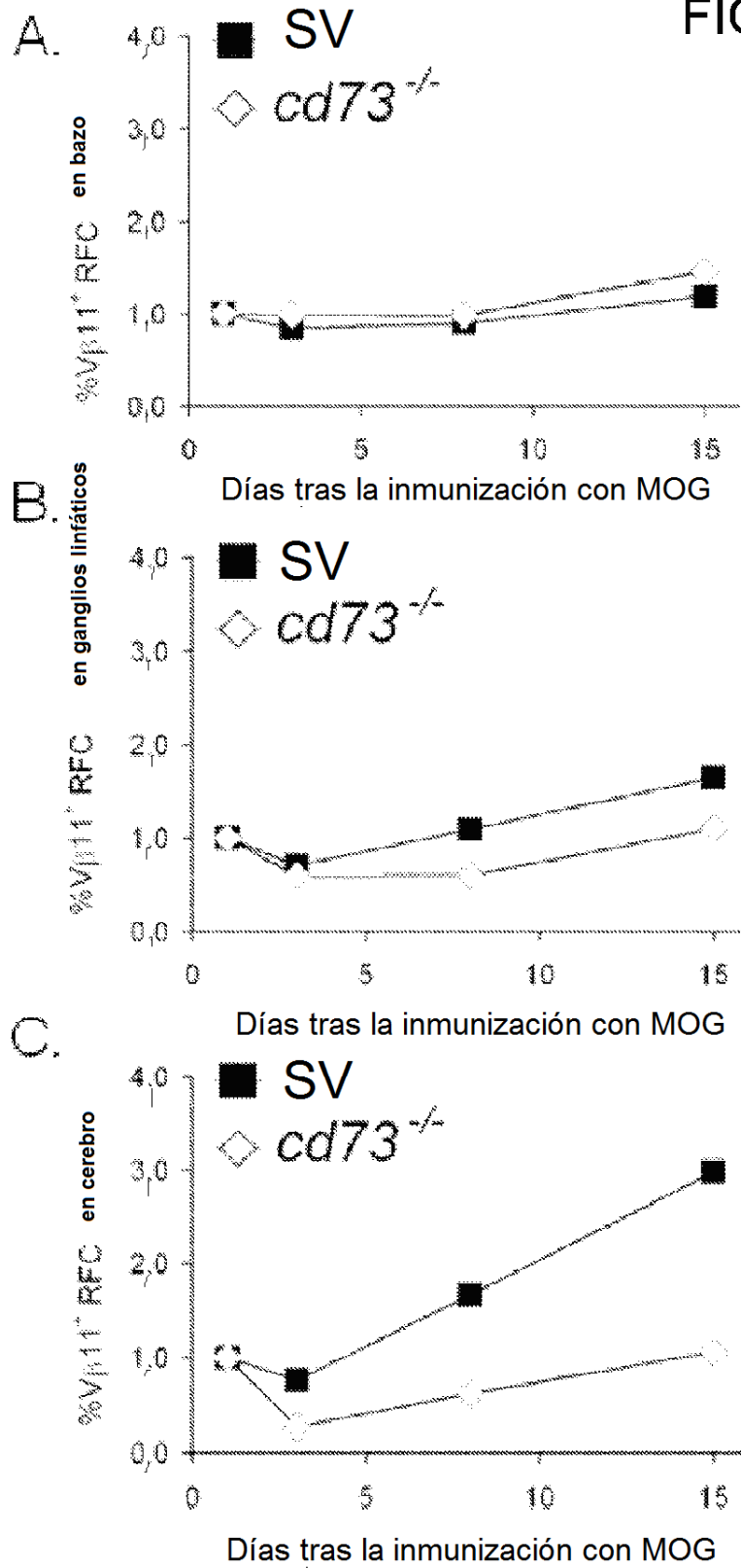


FIG. 6

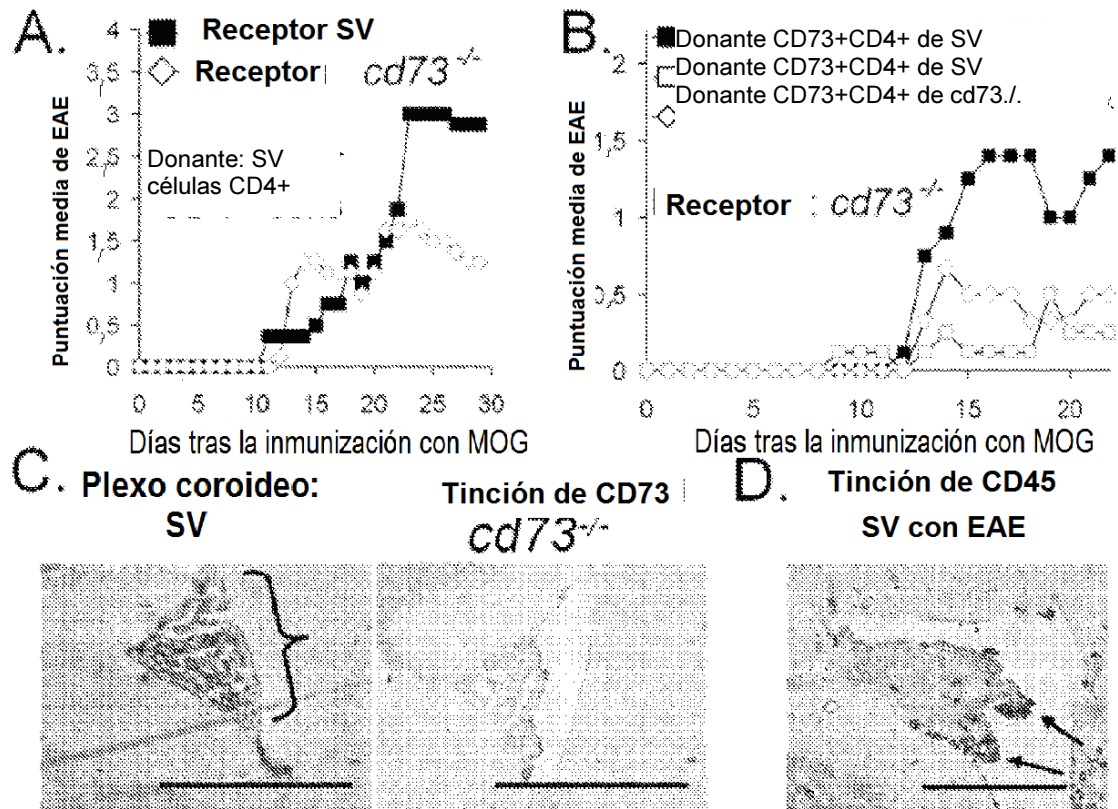


FIG. 7

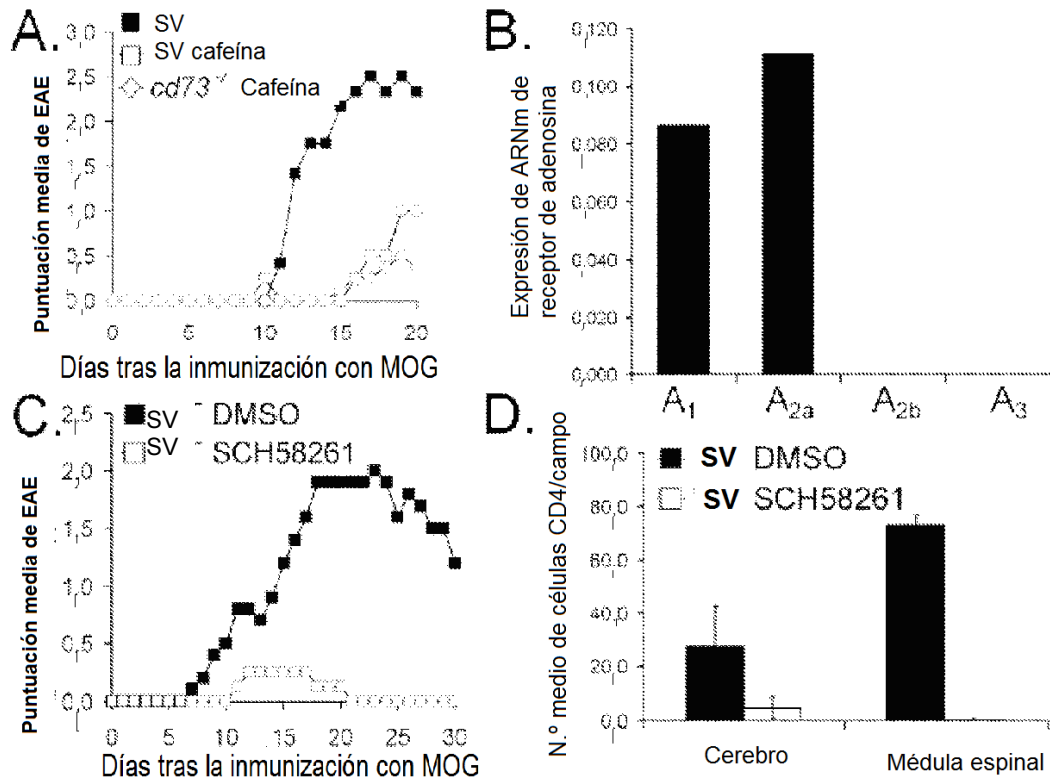


FIG. 8

Tinción de ICAM-1 de plexo coroideo

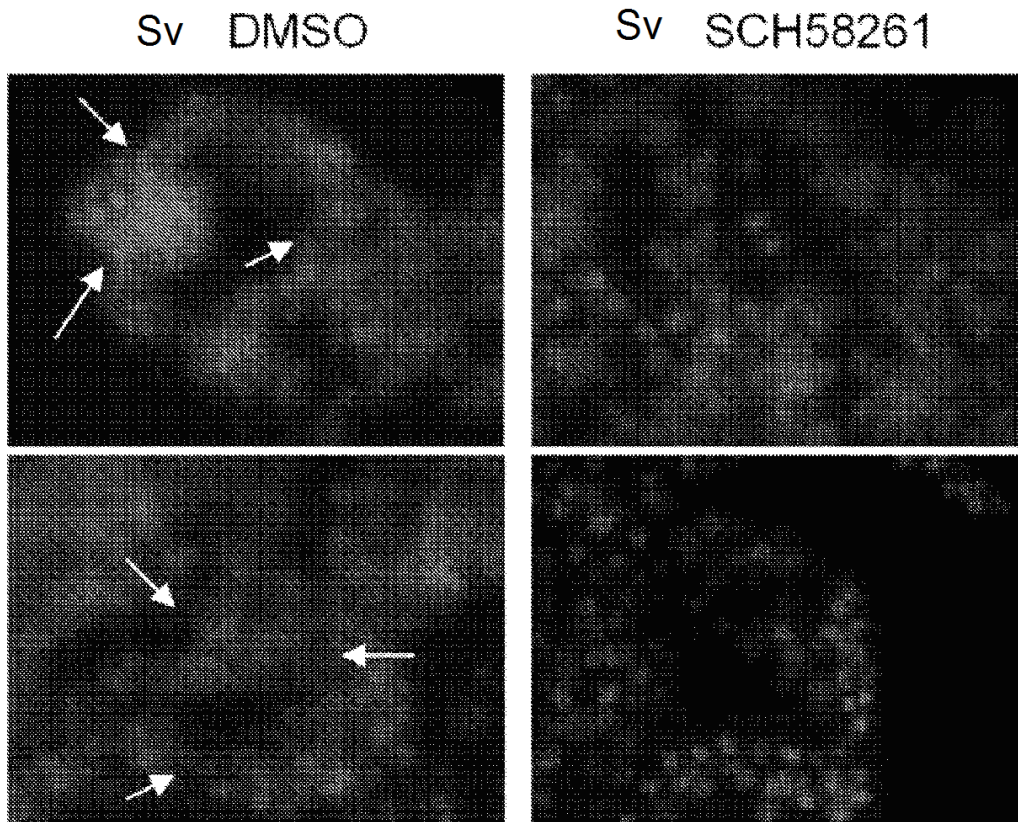


FIG. 9

FIG. 9A

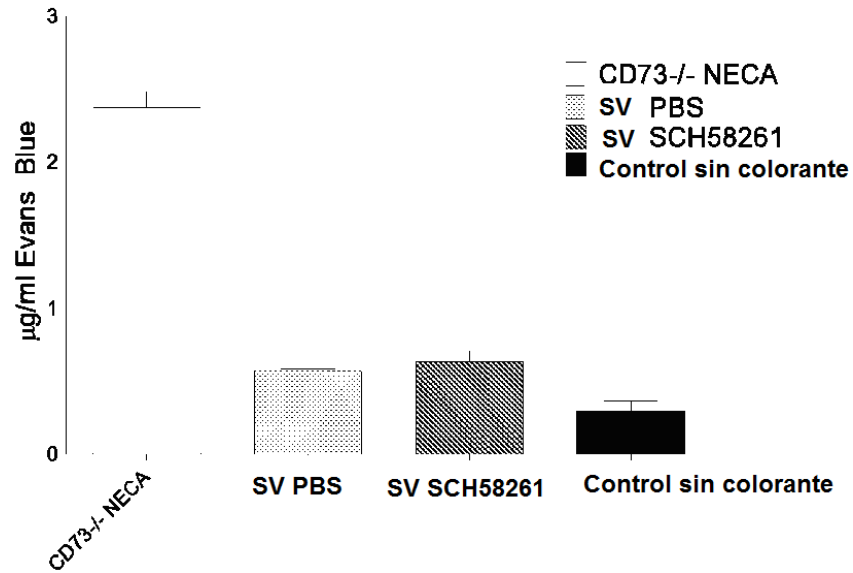


FIG. 9B

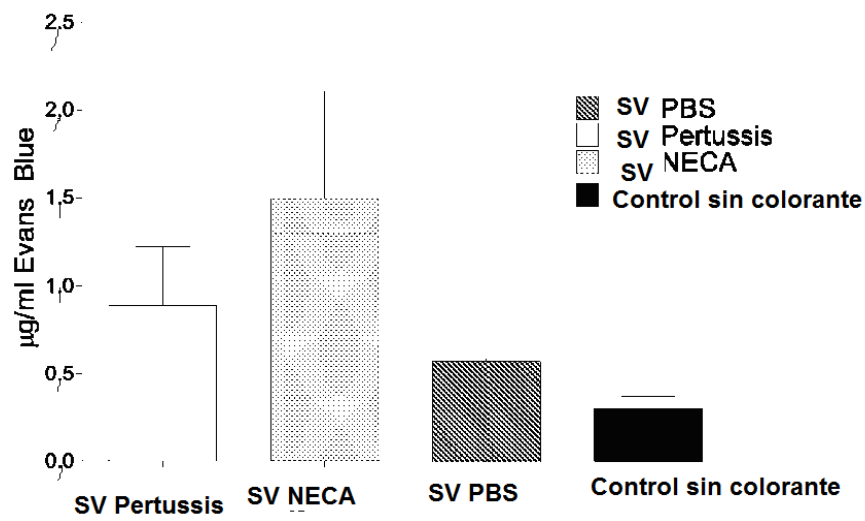


FIG. 10

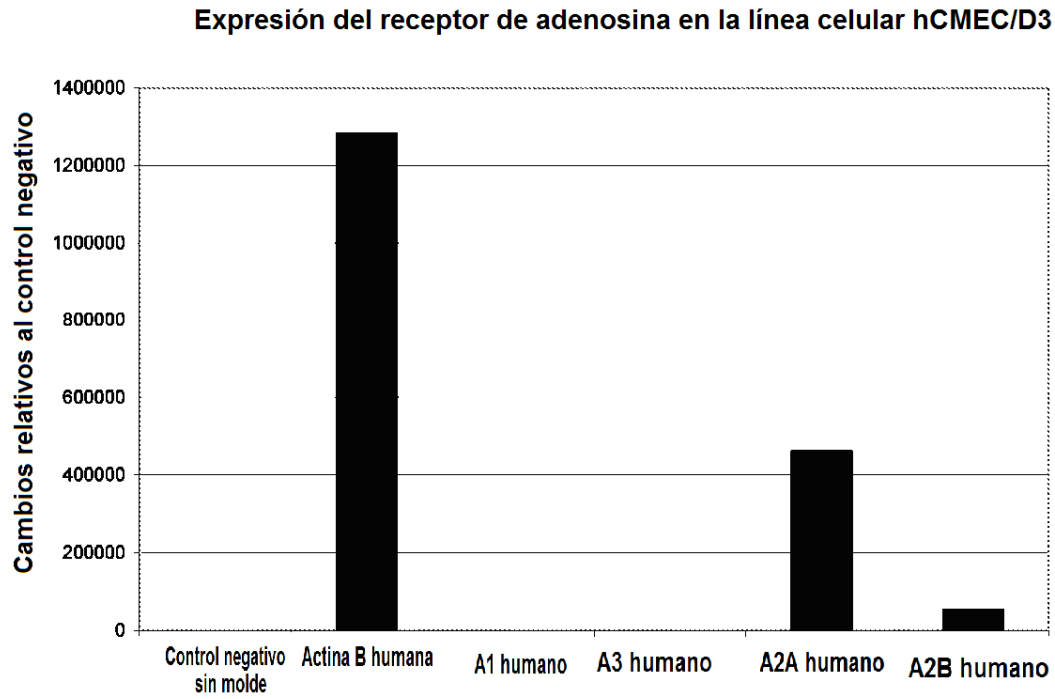


FIG. 11

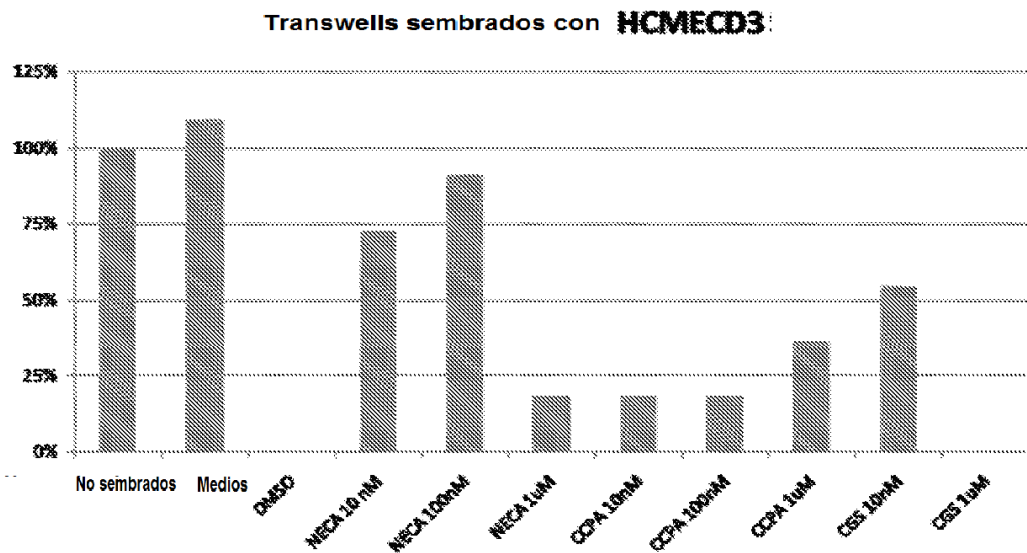


FIG. 12

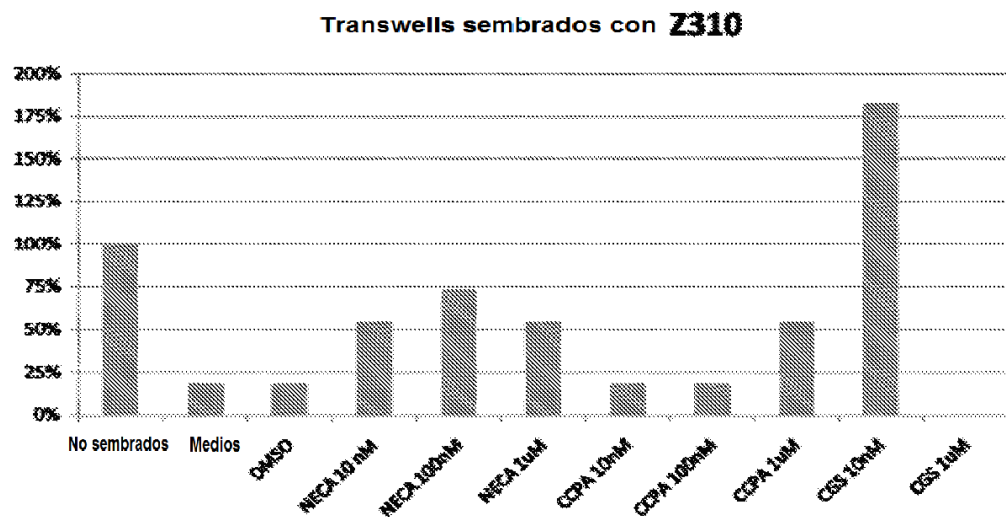


FIG. 13

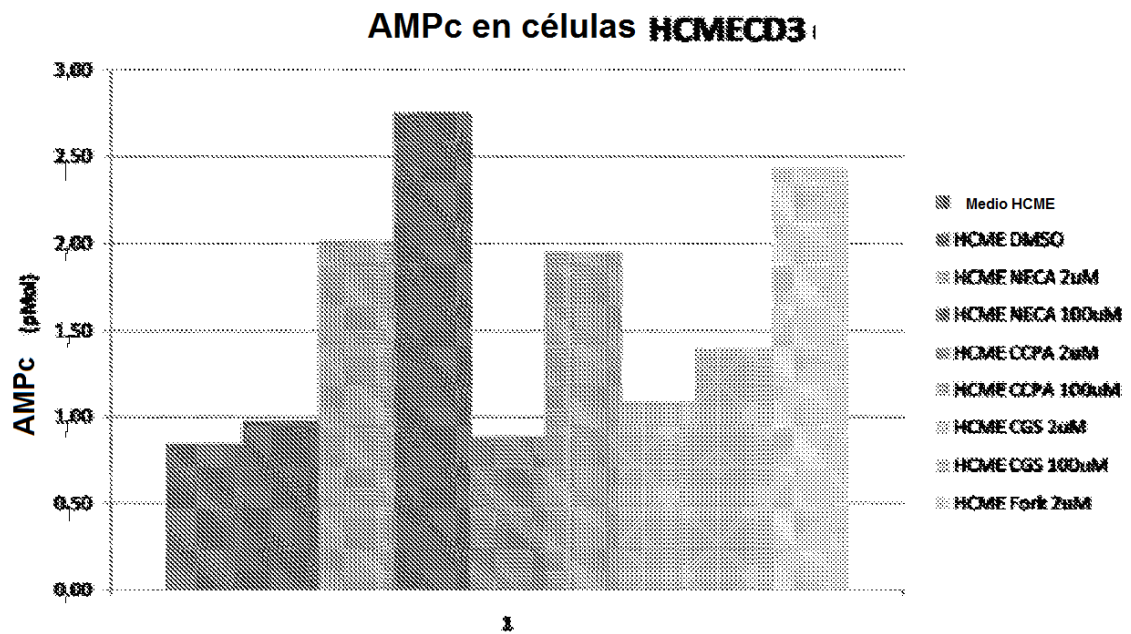


FIG. 14

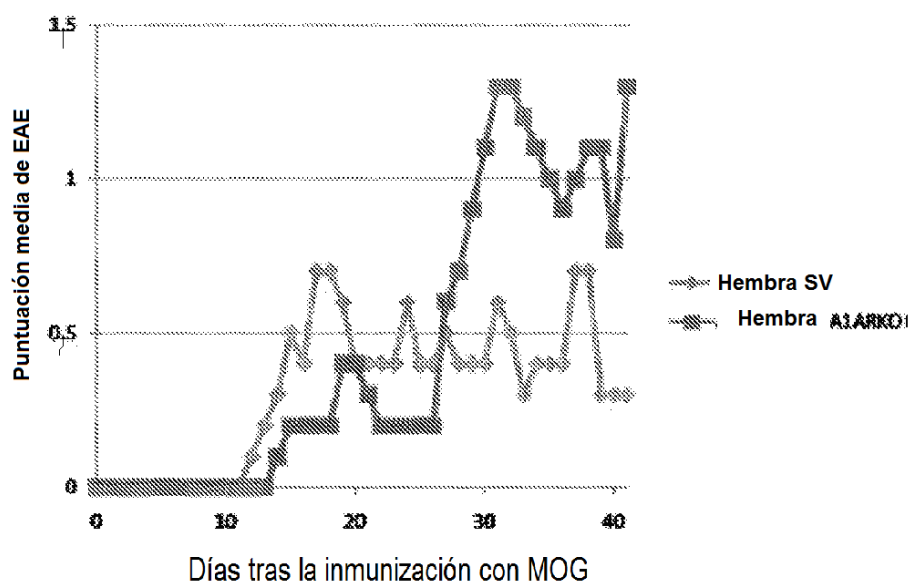


FIG. 15

FIG. 15A Ratón CD73 ^{-/-} tratado con cafeína (dextrano-FITC PM 10.000 30 minutos)

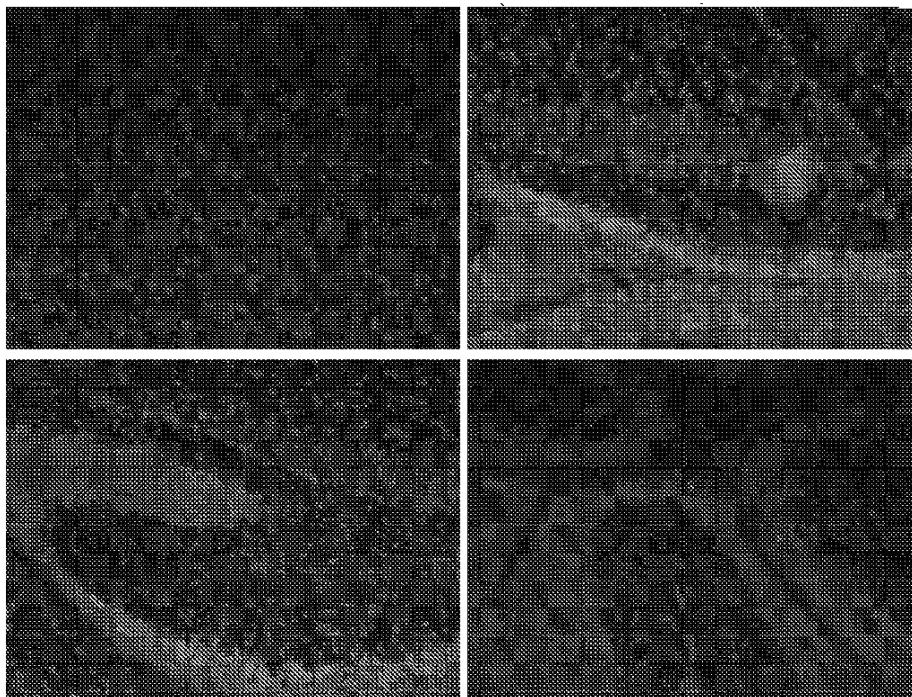


FIG. 15B Ratón SV tratado con cafeína (dextrano-FITC PM 10.000 30 minutos)

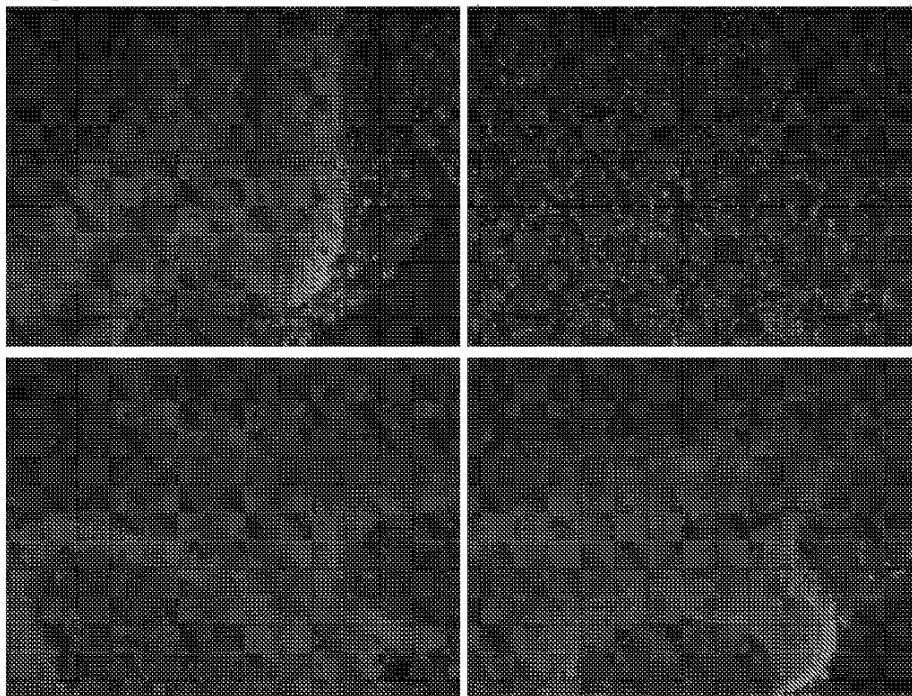


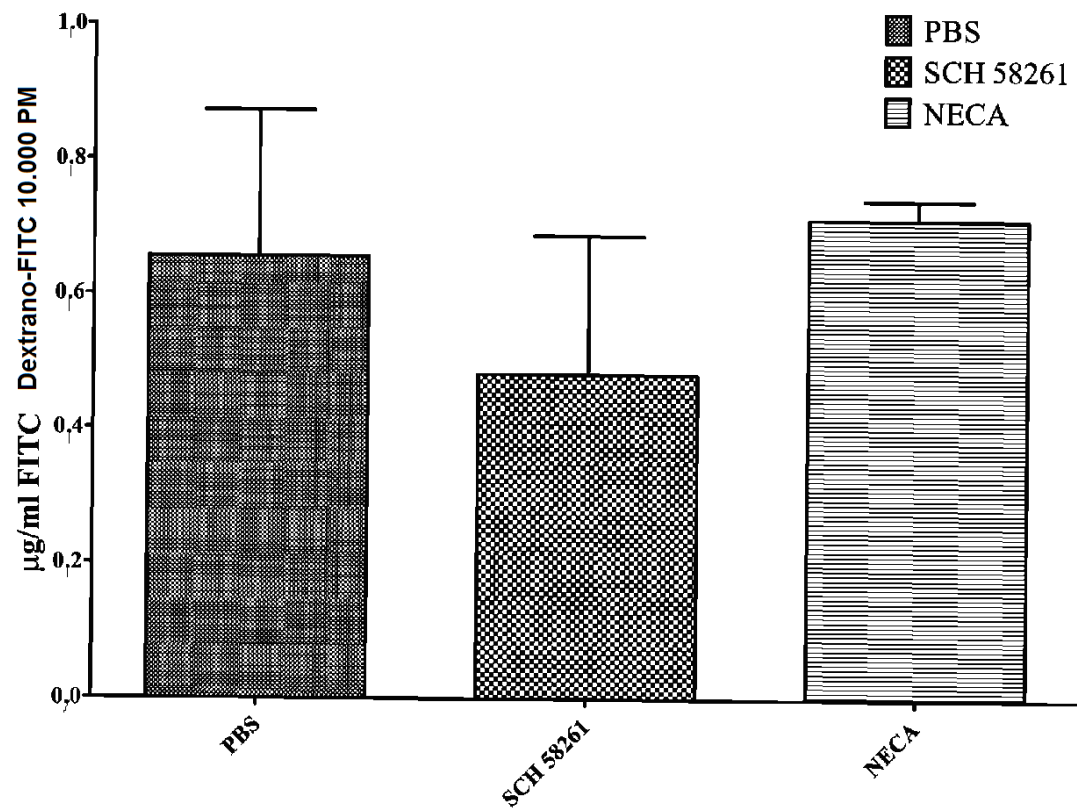
FIG. 16

FIG. 17

