

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 392**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2012 PCT/US2012/065291**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13074798**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2012 E 12795955 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2780027**

54 Título: **Apoaecuorina para reducir lesiones neuronales debidas a isquemia**

30 Prioridad:

15.11.2011 US 201161559816 P

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

22.11.2017

73 Titular/es:

**QUINCY BIOSCIENCE LLC (100.0%)
726 Heartland Trail
Madison, WI 53717, US**

72 Inventor/es:

**UNDERWOOD, MARK, Y. y
MOYER, JAMES, R.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 643 392 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

Apoaecuorina para reducir lesiones neuronales debidas a isquemia

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de Estados Unidos nº 61/559.816, presentada el 15 de noviembre de 2011.

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a composiciones para reducir lesiones neuronales debidas a isquemia. En particular, la presente divulgación se dirige a apoaecuorina y a su uso en la reducción de lesiones neuronales debidas a isquemia cerebral en un sujeto.

Antecedentes de la invención

10 De acuerdo con la American Heart Association, cada 40 segundos, alguien padece un ictus en los Estados Unidos. Actualmente, existe solo un tratamiento para el ictus homologado por la Food and Drug Administration, el activador del plasminógeno tisular recombinante (rTPA). Aunque rTPA ayuda a muchas personas, también pueden tener efectos secundarios perjudiciales, tales como hemorragias. Durante la isquemia, las neuronas experimentan un exceso de calcio intracelular. Aunque el calcio intracelular es necesario para las funciones neuronales normales, 15 demasiado calcio puede estimular cascadas de acontecimientos, que conducen a, e incluyen, la muerte celular. Algunos mecanismos permiten a las neuronas limitar o controlar los niveles de calcio citosólicos, incluyendo las proteínas de unión al calcio (CaBP). Se ha mostrado que el tratamiento con la CaBP, calbindina D-28k, reduce los efectos perjudiciales de la isquemia. Desafortunadamente, existe una carencia de terapéuticas alternativas para prevenir la muerte neuronal debida a isquemia y, de acuerdo con ello, existe una necesidad de nuevas terapéuticas 20 útiles en el tratamiento de los efectos perjudiciales de la isquemia sobre las neuronas. La invención se define en las reivindicaciones. En el presente documento, los inventores demuestran el uso de apoaecuorina para proporcionar protección isquémica a las neuronas. Por consiguiente, la divulgación abarca, en un primer aspecto, apoaecuorina para su uso en el precondicionamiento de neuronas en un sujeto, preferentemente un ser humano, para reducir las lesiones neuronales debidas a isquemia cerebral. Dicho uso incluye administrar apoaecuorina al sujeto, en el que la apoaecuorina inicia un cambio en los niveles de expresión de las citoquinas en las neuronas que dan como resultado 25 en una reducción de las lesiones neuronales debidas a isquemia cerebral.

La administración se lleva a cabo mediante inyección en el área CA1 del hipocampo dorsal 48 horas antes de que se produzca la isquemia cerebral.

30 En determinadas realizaciones, el efecto de la reducción en la lesión neuronal dura al menos 24 horas desde el momento de administración de la apoaecuorina. En otras realizaciones, el efecto de la reducción en la lesión neuronal dura al menos 48 horas desde el momento de administración de la apoaecuorina.

Se desvela además el uso de apoaecuorina en la fabricación de un medicamento para precondicionamiento de neuronas en un sujeto para reducir las lesiones neuronales debidas a isquemia cerebral.

35 La invención abarca además una composición para su uso en el precondicionamiento de neuronas en un sujeto para reducir las lesiones cerebrales debidas a la isquemia cerebral con las características de la reivindicación 7. Las composiciones preferidas se formulan como dosificaciones inyectables.

40 Se desvela además un kit para el precondicionamiento de neuronas en un sujeto para reducir lesiones neuronales debidas a isquemia cerebral. Dicho kit incluye: (a) una dosificación terapéuticamente eficaz de apoaecuorina para precondicionar neuronas en un sujeto para reducir las lesiones neuronales debidas a isquemia cerebral, y (b) un dispositivo de administración configurado para administrar la cantidad de apoaecuorina al sujeto.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes tras la revisión de la memoria descriptiva, las reivindicaciones y los dibujos.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 representa un aumento dependiente con el tiempo en el ARNm de IL-10 tras la infusión de apoaecuorina (A) como un porcentaje del vehículo control. No se observaron cambios en el ARNm de la β -actina (B). (La apoaecuorina se abrevia como "AQ").

50 La Figura 2 muestra (A) el efecto dependiente de la dosis de AQ sobre el rescate celular; (B) un 4% de AQ administrado 2 días antes de la isquemia es neuroprotector (señalar la reducción en las neuronas marcadas con azul tripán tras la administración de AQ); (C) la ventana de neuroprotección proporcionada por AQ; (D) disponibilidad de AQ tras la inyección en el hipocampo.

La Figura 3 representa gráficamente (A) la expresión del ARNm de IL-10; (B) la expresión del ARNm de la β -actina; y (C) las matrices de la PCR que expresan cambios en múltiples citoquinas y quimioquinas tras la administración de AQ.

La Figura 4 representa una gráfica que muestra cómo las citoquinas quedan significativamente alteradas con la

inyección de AQ.

La Figura 5 representa gráficamente un esquema que muestra la interacción de los genes de respuesta inmunitaria examinados por los inventores.

La Figura 6 representa gráficas que muestran (A) el cambio en los genes de respuestas inflamatorias agudas tras la inyección de AQ; (B) el cambio en los activadores de linfocitos T/B tras la inyección de AQ; (C) el cambio en los genes de la angiogénesis/proliferadores celular tras la inyección de AQ; (D) el modelo de cambio en los genes atrectores de macrófagos tras la inyección de AQ; (E) el cambio en los genes mediadores del calcio tras la inyección de AQ; y (F) los genes (agrupados por sus funciones) que cambian con la inyección de AQ.

Descripción detallada de la invención

10 I. EN GENERAL

Antes de describir los presentes materiales y procedimientos, se entiende que la presente invención no está limitada a la metodología, protocolos materiales y reactivos particulares descritos, ya que estos pueden variar. Debe entenderse también que la terminología utilizada en el presente documento tiene el fin único de describir las realizaciones concretas, y no se pretende que limite el ámbito de la presente invención, que estará limitada solo por algunas solicitudes no provisionales presentadas posteriormente.

Se debe indicar que, tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Análogamente, los términos "un" (o "uno"), "uno o más" y "al menos uno" se pueden utilizar de forma indistinta en el presente documento. Se debe indicar también que los términos "que comprende", "que incluye", y "que tiene" se pueden utilizar de manera indistinta.

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para llevar a la práctica o en el ensayo de la presente invención, se describen ahora los procedimientos y materiales preferidos. Todas las referencias citadas en esta memoria descriptiva deben tomarse como indicativas del nivel del experto en la técnica. Nada de lo indicado en el presente documento debe considerarse como una admisión de que la invención no tiene el derecho de anteceder a la descripción en virtud de la invención anterior.

II. LA INVENCION

Tal como se usa en el presente documento, "sujeto" significa mamíferos y no mamíferos. "Mamíferos" significa cualquier miembro de la clase Mammalia, incluyendo, aunque no de forma limitativa, seres humanos, primates no humanos, tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja, tales como ganado, caballos, ovejas, cabras y cerdos; animales domésticos, tales como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio, incluyendo roedores, tales como ratas, ratones y cobayas; y similares. Los ejemplos de no mamíferos incluyen, aunque no de forma limitativa, pájaros, y similares. El término "sujeto" no denota una edad o sexo concreto.

Tal como se usa en el presente documento, "administrar" o "administración" incluye cualquier medio para introducir apoaeuorina en el cuerpo, preferentemente en el cerebro del sujeto, más preferentemente en el hipocampo del sujeto. Los ejemplos de administración incluyen, aunque no de forma limitativa, la oral, nasal, ótica, oftálmica, bucal, sublingual, pulmonar, transdérmica, transmucosal, así como inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, epidural e intramuscular.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de apoaeuorina que, cuando se administra a un sujeto para tratar un trastorno, dolencia, o enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento del trastorno, o dolencia, o enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del trastorno, o dolencia, o patología que se está tratando, de la gravedad o del trastorno, o dolencia, o enfermedad tratada, de la edad y del estado de salud relativo del paciente, de la vía y forma de administración, del criterio del especialista médico o veterinario a cargo del tratamiento, y de otros factores.

Para los fines de la presente invención, "tratar" o "tratamiento" describe la gestión y el cuidado de un paciente con el fin de combatir la enfermedad, la dolencia o el trastorno. Los términos abarcan tratamientos tanto preventivos, es decir, profilácticos, como paliativos. Tratar incluye la administración de apoaeuorina para evitar el inicio de los síntomas o complicaciones, aliviar los síntomas o complicaciones, o eliminar la enfermedad, dolencia o trastorno.

El término "apoaeuorina" se refiere a la porción de apoproteína de la proteína de unión al calcio, la aeucorina. La aeucorina está compuesta por dos unidades distintas, la apoproteína respectiva, apoaeuorina, con un peso molecular promedio de 22 kDa, y el grupo prostético coelenterazina, una luciferina. La aeucorina es una fotoproteína aislada de medusas luminiscentes (tales como de especies de *Aequorea*, por ejemplo, *Aequorea victoria*) y de una variedad de otros organismos marinos. Se aisló originalmente de celentéreos por Osamu Shimomura. La apoaeuorina útil en la presente invención está disponible de su fuente natural, mediante esquemas de aislamiento y purificación previamente conocidos, o procedimientos recombinantes públicamente conocidos que utilizan sistemas

de expresión que utilizan, por ejemplo, construcciones de ADN recombinante y células hospedadoras genéticamente modificadas, útiles para la expresión heteróloga de apoaeucorina.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "citoquina" debe referirse a moléculas pequeñas de proteínas señalizadoras de células que se secretan por las células gliales del sistema nervioso y por numerosas células del sistema inmunitario y son una categoría de moléculas de señalización utilizadas ampliamente en la comunicación intercelular. Las citoquinas se pueden clasificar como proteínas, péptidos, o glicoproteínas; de acuerdo con ello, el término "citoquina" abarca una gran y diversa familia de reguladores producidos en todo el cuerpo por células de origen embriológico diverso. El término "citoquina" debe abarcar agentes inmunomoduladores, tales como interleuquinas e interferones.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "preacondicionamiento se refiere a una técnica para producir resistencia a la pérdida de suministro de sangre, y por tanto, de oxígeno, a los tejidos del cuerpo. En este caso, preacondicionamiento se refiere a producir resistencia a la pérdida del suministro de sangre a neuronas, tal como se mide, por ejemplo, mediante evaluación del porcentaje o del número de células rescatadas tras la administración de apoaeucorina en comparación con un control.

15 Los inventores han mostrado que, cuando se inyecta directamente en el hipocampo dorsal (dhpc), la CaBP apoaeucorina de 22 kD (AQ) derivada del celentéreo *Aequoria victoria* disminuye significativamente la muerte celular cuando se somete a una lesión de tipo isquémico *in vitro* (Detert y col., 2009; 2011). Esta disminución en la muerte celular fue evidente a las 24 y las 48 horas, pero no 1 hora después de la inyección de AQ. De manera interesante, la proteína AQ estaba presente en 1 hora, con niveles significativamente menores a las 24 horas, y a las 48 horas después de la inyección, apenas estaba presente. El modelo inverso entre el efecto de la AQ y su presencia hace que los inventores se pregunten si este cambio fue debido o no a una respuesta neuroinmunomoduladora. Algunas formas de preacondicionamiento isquémico, tales como pequeñas lesiones isquémicas, reducen los infartos cuando se administran antes de lesiones globales mayores (Ara y col., 2010; Jones y Bergeron, 2001). Los efectos protectores del preacondicionamiento isquémico se han asociado con la activación del sistema inmunitario (Rehni y Singh, 2012; Wei y col., 2012). Aunque no se adopta ningún mecanismo de acción en el presente documento, es posible que si AQ es activadora de citoquinas, disminuya la muerte celular por algún tipo de preacondicionamiento isquémico donde la respuesta neuroprotectora que se observa derivada de las inyecciones de aeuorina puede deberse, en parte, a una respuesta neuroinmunomoduladora.

30 Apoaeucorina se administra a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Apoaeucorina puede administrarse sola o como parte de una composición farmacéuticamente aceptable. Además, apoaeucorina o una composición puede administrarse de una vez, como por ejemplo, mediante una inyección en bolo, múltiples veces, tal como mediante una serie de comprimidos, o administrarse de forma sustancialmente uniforme durante un periodo de tiempo, como por ejemplo, utilizando la administración transdérmica. Además, la dosis del principio activo puede variarse en el tiempo. Apoaeucorina se puede administrar utilizando una formulación de liberación inmediata, una formulación de liberación controlada, o combinaciones de las mismas. El término "liberación controlada" incluye liberación sostenida, liberación retardada, y combinaciones de las mismas.

40 Una composición de la invención se puede preparar, envasarse, o comercializarse a granel, como una dosis unitaria única, o como una pluralidad de dosis unitarias únicas. Tal como se usa en el presente documento, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición que comprende una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad del principio activo es generalmente igual a la dosificación del principio activo que se administraría a un paciente o una fracción conveniente de dicha dosificación tal como, por ejemplo, una mitad o un tercio de dicha dosificación.

45 Las cantidades relativas del principio activo, el transportador farmacéuticamente aceptable, y cualesquiera ingredientes adicionales en una composición variarán, dependiendo de la identidad, el tamaño, y la dolencia del ser humano tratado y dependiendo además de la ruta por la cual se va a administrar la composición.

50 Se desvela también en el presente documento un kit que comprende una composición de la invención y un material de instrucción. El material de instrucción incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que se utiliza para comunicar la utilidad de la composición de la invención para uno de los objetivos que se definen en el presente documento en un ser humano. El material de instrucción puede describir también, por ejemplo, una dosis adecuada de la composición farmacéutica de la invención. El material de instrucción del kit puede, por ejemplo, prefijarse a un envase que contiene una composición farmacéutica de la invención o enviarse junto con un envase que contiene la composición farmacéutica. Como alternativa, el material de instrucción puede enviarse por separado del envase con la intención de que el material de instrucción y la composición farmacéutica se utilicen cooperativamente por el receptor.

55 Se desvela también en el presente documento un kit que comprende una composición de la invención y un dispositivo de administración para administrar la composición a un ser humano. A modo de ejemplo, el dispositivo de administración puede ser una jeringuilla, una aguja, o un recipiente medidor de la dosificación. El kit puede comprender además un material de instrucción, como se describe en el presente documento. El kit comprende también un recipiente para las composiciones separadas, tal como una botella dividida o un paquete de papel

dividido. Los ejemplos adicionales de recipientes incluyen jeringuillas, cajas, bolsas y similares. Normalmente, un kit comprende instrucciones para administrar los componentes separados. La forma del kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran preferentemente en formas de dosificación diferentes (por ejemplo, oral y parenteral), administrados en diferentes intervalos de dosificación, o cuando se desea la valoración de los componentes individuales de la combinación por el médico a cargo del tratamiento.

La administración parenteral de una composición farmacéutica incluye cualquier ruta de administración caracterizada por la rotura física de un tejido de un ser humano y la administración de la composición farmacéutica a través de la brecha en el tejido. La administración parenteral incluye de esta manera la administración de una composición farmacéutica mediante la inyección de la composición, mediante aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra en el tejido, y similares. En particular, la administración parenteral incluye la inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramuscular, o intraesternal e intravenosa, intraarterial, o técnicas de infusión dialítica en el riñón. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden administrarse a un sujeto mediante inyecciones en el cerebro (mediante vPAG), inyecciones intratecales, inyecciones intraperitoneales, o inyecciones de sangre.

Las composiciones adecuadas para inyección parenteral comprenden el principio activo combinado con un transportador farmacéuticamente aceptable tal como soluciones acuosas o no acuosas estériles, dispersiones, suspensiones, o emulsiones fisiológicamente aceptables, o puede comprender polvos estériles para la reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Los ejemplos de transportadores, diluyentes, disolventes, o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, suero salino isotónico, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol y similares), mezclas adecuadas de los mismos, triglicéridos, incluyendo aceites vegetales como aceite de oliva, ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez correcta se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones, y/o mediante el uso de tensioactivos. Dichas formulaciones se pueden preparar, envasarse o comercializarse en una forma adecuada para la administración en bolo o para la administración continua. Se pueden preparar formulaciones inyectables, envasarse, o comercializarse en una forma de dosificación unitaria, tal como ampollas, en recipientes multidosis que contienen un conservante o en dispositivos de un único uso para la autoinyección o la inyección por un especialista médico.

Las formulaciones para administración parenteral incluyen suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos acuosos u oleosos, pastas y formulaciones de liberación sostenida implantables o biodegradables. Dichas formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales incluyendo agentes suspensores, estabilizantes, o dispersantes. En una realización de una formulación para administración parenteral, el principio activo se proporciona en forma seca (es decir, en polvo o en forma granular) para la reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida.

Las composiciones se pueden preparar, envasarse, o comercializarse en la forma de una suspensión o solución acuosa u oleosa (emulsión) inyectable estéril. Esta suspensión o solución puede formularse de acuerdo con la técnica conocida, y puede comprender, además del principio activo, ingredientes adicionales tales como agentes dispersantes, agentes humectantes, o agentes suspensores descritos en el presente documento. Dichas formulaciones inyectables estériles se pueden preparar utilizando un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, tal como, por ejemplo, agua o 1,3-butanodiol. Otros diluyentes y disolventes aceptables incluyen solución de Ringer, solución de cloruro de sodio isotónica, y aceites fijos tales como monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Otras formulaciones administrables parenteralmente que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposómica, o como un componente de sistemas de polímeros biodegradables. Las composiciones para liberación sostenida o implante pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero escasamente soluble, o una sal escasamente soluble.

Las composiciones de la invención pueden contener también adyuvantes tales como agentes conservantes humectantes, emulsionantes, y/o dispersantes, incluyendo, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio, y similares. La absorción prolongada de composiciones farmacéuticas inyectables puede producirse mediante el uso de agentes capaces de retrasar la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y/o gelatina. En particular, liposomas, miosomas y emulsionantes se pueden usar para preparar los presentes compuestos de forma más soluble para su administración.

Las formas de dosificación pueden incluir implantes o depósitos inyectables. En realizaciones preferidas, el implante comprende una cantidad eficaz de un principio activo y un polímero biodegradable. En realizaciones preferidas, un polímero biodegradable adecuado puede seleccionarse entre el grupo que consiste en poliaspartato, poliglutamato, poli(L-láctido), un poli(D,L-láctido), un poli(láctido-co-glicólido), una poli(ϵ -caprolactona), un polianhídrido, un poli(beta-hidroxi-butilato), un poli(orto-éster) y un polifosfaceno. En otras realizaciones, el implante comprende una cantidad eficaz de un principio activo y un polímero silástico. El implante proporciona la liberación de una cantidad eficaz de

Se pueden preparar soluciones líquidas del principio activo en disolventes acuosos u oleosos de una manera sustancialmente igual que las suspensiones líquidas, siendo la diferencia principal que el principio activo se disuelve, en lugar de que se suspende en el disolvente. Las soluciones líquidas de la composición de la invención pueden comprender cada uno de los componentes descritos con respecto a las suspensiones líquidas, se entiende que los agentes suspensores no ayudarán necesariamente a la disolución del principio activo en el disolvente. Los disolventes acuosos incluyen, por ejemplo, agua y solución salina isotónica. Los disolventes oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendra, ésteres grasos, alcohol etílico, aceites vegetales como aceite de cacahuete, oliva, sésamo, o coco, aceites vegetales fraccionados, y aceites minerales tales como parafina líquida.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir además un componente de ciclodextrina a fin de, por ejemplo, mejorar la solubilidad en agua de un principio farmacéutico activo, prolongar la liberación del fármaco, y mejorar las características de empastillamiento. En general, los oligómeros de estructura cíclica de glucosa ("ciclodextrina") se obtienen de las digestiones del almidón de determinadas bacterias. Las ciclodextrinas más abundantes son la alfa, beta y gamma ciclodextrina que tienen 6, 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente. La cavidad interior de una ciclodextrina es hidrófoba y la superficie expuesta de la molécula es hidrófila. Se sabe que las ciclodextrinas potencian la estabilidad del principio activo farmacéutico, la solubilidad en medio acuoso, y reducen la volatilidad. Algunos ejemplos de ciclodextrinas comercialmente disponibles, o derivados de las mismas, son los siguientes: alfa-Ciclodextrina (n.º CAS: 10016-20-3); (2-Hidroxipropil)-alfa-ciclodextrina (n.º CAS: 128446-33-3); beta-Ciclodextrina (n.º CAS: 7585-39-9); 6-O-alfa-D-Glucosil-beta-ciclodextrina (n.º CAS: 92517-02-7); gamma-Ciclodextrina (n.º CAS: 17465-86-0); y (2-Hidroxipropil)-gamma-ciclodextrina (n.º CAS: 128446-34-4). Las ciclodextrinas particularmente útiles en la formulación de un vehículo de administración para administrar los presentes agentes activos incluyen: la sulfobutil éter beta-ciclodextrina (SBE-beta-CD) disponible de Cydex Pharmaceuticals, Inc. con el nombre comercial CAPTISOL; y la ciclodextrina e hidroxipropil betaciclodextrinas disponibles de Roquette Pharma con el nombre comercial KLEPTOSE.

Para la administración parenteral en animales no humanos, apoaeuorina puede prepararse en forma de una pasta o un aglomerado y se administra como un implante. Se pueden preparar formulaciones de pasta dispersando apoaeuorina en un aceite farmacéuticamente aceptable tal como aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de maíz o similares. Pueden prepararse gránulos que contengan una cantidad terapéuticamente eficaz premezclando con un diluyente tal como carbowax, cera de carnaúba, y similares, y un lubricante, tal como estearato de magnesio o calcio, se puede añadir para mejorar el procedimiento de granulación. Se reconoce, por supuesto, que se puede administrar más de un gránulo a un animal para conseguir el nivel de dosis deseado. Por otra parte, se ha descubierto que dichos implantes pueden administrarse también periódicamente durante el periodo de tratamiento del animal a fin de mantener el nivel de principio activo adecuado en el cuerpo del animal.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse a un paciente a niveles de dosificación comprendidos en el intervalo de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 100 mg/kg por día. Para un ser humano adulto normal, una dosificación en el intervalo de entre aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg es normalmente suficiente, con una dosificación preferida de 0,1 a 10 mg/kg por día. Sin embargo, puede requerirse alguna variabilidad en el intervalo de dosificación general dependiendo de la edad y el peso del sujeto que se está tratando, la ruta prevista de administración, el compuesto concreto que se está administrando y similares. La determinación de los intervalos de dosificación y las dosificaciones óptimas para un paciente concreto están también comprendidas en la capacidad de una persona normalmente experta en la materia que tiene las ventajas de la presente descripción. Se indica también que los compuestos de la presente invención se pueden usar en formulaciones de liberación sostenida, formulaciones de liberación controlada, y formulaciones de liberación retardada, cuyas formas son también conocidas por una persona normalmente experta en la materia.

La dosificación específica y el intervalo de dosificación que se pueden usar dependen de numerosos factores, incluyendo los requerimientos del paciente, la gravedad de la dolencia que se está tratando, y la actividad farmacológica del principio activo que se administra. La determinación de los intervalos de dosificación y las dosificaciones óptimas para un paciente concreto están también comprendidas en el conocimiento de una persona normalmente experta en la materia a la vista de esta descripción. Se entiende que los médicos, odontólogos, o veterinarios normalmente expertos determinarán y prescribirán fácilmente una cantidad eficaz de la composición para conseguir el tratamiento deseado en el sujeto. En un procedimiento de este tipo, el médico o el veterinario pueden, por ejemplo, prescribir al principio una dosis relativamente baja, aumentando posteriormente la dosis hasta que se obtenga la respuesta adecuada. Se entiende además, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier ser humano concreto dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad de la composición específica empleada, la edad, peso corporal, el estado de salud general, el sexo, y la alimentación del ser humano, el momento de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación del fármaco, y la gravedad de cualquier trastorno que se está tratando.

En determinadas realizaciones, apoaeuorina se formula en la forma de una dosificación farmacéutica inyectable, incluyendo apoaeuorina combinada con un sistema transportador inyectable. Tal como se usa en el presente documento, las formas de dosificación inyectables y en infusión (es decir, las formas de dosificación parenterales) incluyen, aunque no de forma limitativa, los inyectables liposómicos o una vesícula de bicapa lipídica que tiene fosfolípidos que encapsula una sustancia farmacológica activa. La inyección incluye una preparación estéril prevista para uso parenteral.

Existen cinco clases distintas de inyecciones como define la USP: emulsiones, lípidos, polvos, soluciones y suspensiones. La inyección de emulsión incluye una emulsión que comprende una preparación estéril, exenta de pirógenos prevista para administrarse parenteralmente. El complejo lipídico y el polvo para la inyección de solución son preparaciones estériles previstas para reconstitución para formar una solución para uso parenteral. El polvo para inyección de suspensión es una preparación estéril prevista para reconstitución para formar una suspensión para uso parenteral. El polvo liofilizado para inyección de suspensión liposómica es una preparación criodesecada estéril prevista para la reconstitución para uso parenteral que se formula de una manera que permite la incorporación de liposomas, tal como una vesícula de bicapa lipídica que tiene fosfolípidos utilizados para encapsular una sustancia farmacológica activa en una bicapa lipídica o en un espacio acuoso, por lo cual, la formulación puede formarse tras la reconstitución. El polvo liofilizado para inyección de solución es una forma de dosificación prevista para la solución preparada mediante liofilización ("criodesecación"), por lo cual, el procedimiento implica retirar el agua de los productos en un estado congelado a presiones extremadamente bajas, y por lo cual, la posterior adición de líquido crea una solución que se ajusta en todos los aspectos a los requisitos para las inyecciones. El polvo liofilizado para inyección de suspensión es una preparación líquida prevista para uso parenteral que contiene sólidos suspendidos en un medio fluido adecuado, y esto se ajusta en todos los aspectos a los requisitos para suspensiones estériles, por lo cual, los agentes medicinales previstos para la suspensión se preparan mediante liofilización. La inyección de solución implica una preparación líquida que contiene una o más sustancias farmacológicas disueltas en un disolvente adecuado o mezcla de disolventes mutuamente miscibles que es adecuado para la inyección. La inyección de concentrado de solución implica una preparación estéril para uso parenteral que, tras la adición de disolventes adecuados, da como resultado una solución que se ajusta en todos los aspectos a los requisitos para inyecciones. La inyección de suspensión implica una preparación líquida (adecuada para inyección) que contiene partículas sólidas dispersas a través de una fase líquida, por lo cual las partículas son insolubles, y por lo cual, una fase oleosa se dispersa a través de una fase acuosa o viceversa. La inyección de suspensión liposómica es una preparación líquida (adecuada para inyección) que tiene una fase oleosa dispersa en una fase acuosa de tal manera que se forman liposomas (una vesícula de una bicapa lipídica que contiene normalmente fosfolípidos utilizados para encapsular una sustancia farmacológica activa tanto en una bicapa lipídica como en un espacio acuoso). La inyección de suspensión sonicada es una preparación líquida (adecuada para inyección) que contiene partículas sólidas dispersas a través de una fase líquida, por lo cual, las partículas son insolubles. Además, el producto que puede sonicarse a medida que un gas se hace burbujear a través de la suspensión, dando como resultado la formación de microesferas mediante partículas sólidas.

El sistema de transportador parenteral incluye uno o más excipientes farmacéuticamente adecuados, tales como disolventes y cosolventes, agentes solubilizantes, agentes humectantes, agentes suspensores, agentes espesantes, agentes emulsionantes, agentes quelantes, tampones, ajustadores del pH, antioxidantes, agentes reductores, conservantes antimicrobianos, agentes de carga, protectores, ajustadores de la tonicidad, y aditivos especiales.

Diversas realizaciones ilustrativas de composiciones de acuerdo con la presente invención y los procedimientos desvelados en el presente documento se describen ahora en los siguientes ejemplos. Los siguientes ejemplos se ofrecen solo a fines ilustrativos y no se pretende que limiten en ningún modo el ámbito de la presente invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de aquellas que se muestran y describen en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la anterior descripción y los siguientes ejemplos y se encuentran comprendidos en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

III. Ejemplos

Ejemplo 1: Curso temporal y eficacia de apoaeuorina en la alteración de los niveles de expresión de IL-10.

En este ejemplo, los inventores demuestran la eficacia de apoaeuorina aumentando la expresión del ARNm de la citoquina IL-10 antiinflamatoria. El preconditionamiento es un fenómeno en el que un episodio isquémico breve, no letal atenúa el daño producido por una lesión isquémica más grave posterior. El preconditionamiento reduce la expresión de los mediadores inflamatorios (por ejemplo, IL-1 β e IL-6) en comparación con lo que se observa en respuesta a la lesión cerebral. IL-10 es una citoquina antiinflamatoria y se ha mostrado que aumenta tras la administración de un bloqueante del canal de Ca²⁺. El preconditionamiento aumenta la producción de IL-10 e IL-10 se asocia con la neuroprotección. Un modo de esto puede ser neuroprotector reduciendo indirectamente IL-6 a través de la reducción de la producción de TNF- α .

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Animales. Se utilizaron 50 ratas adultas F344 macho (edad promedio = 3,4 \pm 0,2 me.). Se mantuvieron las s en un ciclo de día noche de 14/10 h con acceso libre a alimento y agua.

Cirugía. Se anestesiaron las ratas y se les montó un aparato estereotáxico. En condiciones asépticas, se hizo una incisión en la piel de la cabeza y se retrajo a un lateral, y se niveló la cabeza entre bregma y lambda. Se preparó cada rata con una cánula guiada de acero inoxidable bilateral destinada al hipocampo dorsal (dhpc) utilizando coordenadas estereotáxicas (3,5 mm posterior, \pm 2,6 mm lateral, 3,0 mm ventral) con respecto a bregma. Las cánulas se aseguraron a los cráneos con tornillos de acero inoxidable y epoxi. Un tapón de acero inoxidable permaneció en su lugar cuando las ratas no estaban recibiendo inyecciones para evitar que las cánulas guiadas

quedaran ocluidas.

Fármacos. Apoaeuorina (AQ; 0, 0,4, 1, y 4%, Quincy Bioscience) se prepararon en cero Ca^{2+} -aCSF (fluido cerebroespinal artificial) al que se había añadido DMSO al 6% para facilitar la captación neuronal. Se administró a las ratas una infusión de AQ en un hemisferio y vehículo en el otro hemisferio, 1 h, 1 día, 2 días, 3 días, o 5 días antes de la decapitación. Se administraron infusiones bilaterales (0,5 μ l/lado) durante 60 s y las cánulas de inyecciones permanecieron en su lugar durante 2 min más para asegurar la difusión. Las cánulas de infusión se cortaron para extenderse 0,5 mm más allá de las cánulas guiadas.

Privación de oxígeno-glucosa. Se prepararon cortes coronales (400 μm) utilizando procedimientos convencionales. Tras 1 hora de recuperación del corte en aCSF, se indujo la isquemia *in vitro* transfiriendo cortes a fructosa-CSF (glucosa sustituida con fructosa y a la que se había burbujado 95% N_2 - 5% CO_2 en vez de 95% O_2 - 5% CO_2) durante 5 min. Los cortes devolvieron después al aCSF oxigenado que contenía 0,2% de azul tripán durante 30 min de reperusión. El azul tripán penetra fácilmente en las células muertas y las tiñe de azul pero dejando las células vivas sin teñir. Los cortes se enjuagaron en aCSF oxigenado a temperatura ambiente dos veces, a continuación se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% durante la noche en el refrigerador. A continuación los cortes se crioprotegieron, se cortaron en un criostato (40 μm), y se montaron sobre portas recubiertos con gelatina.

Recuentos de células. Los cortes se examinaron con un microscopio Olympus (equipado con una cámara digital) con un aumento de 10X y se tomaron fotografías. Las neuronas teñidas con azul tripán en CA1 (una sección de aproximadamente 800 μm) se contaron por un experimentados enmascarado para las condiciones experimentales. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos utilizando Statview (v 5.0; SAS Institute, Inc., Cary, NC). Se utilizó un ANOVA para evaluar el efecto farmacológico. El asterisco indica $p < 0,05$.

Transferencias Western. Se administró a las ratas una inyección bilateral de AQ al 4% y se extrajeron los cerebros en uno de los siguientes puntos temporales: 1 hora, 1 día, 2 días, o 3 días. Los cerebros se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80°C . El dhpc y el hipocampo ventral (vhpc) se diseccionaron y se homogeneizaron por separado. Se centrifugaron las muestras y se retiró y midió el sobrenadante utilizando un kit de ensayo de proteínas Bradford (Bio-Rad). Las muestras de proteínas se normalizaron y se cargaron para SDS-PAGE (10%). Se transfirieron las proteínas sobre membranas de PVDF utilizando un aparato de transferencia semiseco (Bio-Rad). A continuación se incubaron las membranas en tampón de bloqueo (2 horas), anticuerpo primario (durante la noche a 4°C : 1:5000 de anticuerpo de ratón [Chemicon] o 1:1000 de anticuerpo de conejo dirigido contra β -actina [Cell Signaling Technology]) y anticuerpo secundario (90 min: 1:5000 anticuerpo de cabra dirigido contra anticuerpo de ratón [Santa Cruz Biotechnology] o 1:5000 de anticuerpo de cabra dirigido contra anticuerpos de conejo [Millipore]). A continuación se lavaron las membranas, se introdujeron en una solución quimioluminiscente (Santa Cruz Biotechnology), y se expusieron a una película de autorradiografía (Hyperfilm MP). Se tomaron imágenes y se llevó a cabo la densitometría utilizando el software NIH Image J. Se consideró positiva una banda si el valor de la densidad óptica de la banda (menos el fondo para cada banda) era mayor de 2 desviaciones estándar por encima del promedio de las bandas de vhpc.

PCR. Para la RT-PCR, se administró a las ratas una infusión de AQ al 4% en un hemisferio y vehículo en el otro hemisferio. Una hora, 1 día o 2 días después de la infusión, se retiraron los hipocampos y se colocaron inmediatamente en Trizol. Se homogeneizó el tejido utilizando una aguja y una jeringuilla de calibre 25, y se congelaron las muestras y se almacenaron a -80°C hasta el aislamiento del ARN. Se aisló el ARN utilizando el protocolo del mini kit Qiagen RNeasy. El ARN aislado se disolvió en 50 μl de ARNasa exenta de H_2O . Se calculó la pureza del ARN basándose en la relación de absorbancia a 260 y 280 nm, y una lectura de absorbancia entre 1,8 y 2,1 se consideró ARN puro. Se llevó a cabo la transcripción inversa para producir ADNc utilizando el Kit RT2 HT First Stand de Qiagen. Los cebadores de IL-10 y la actina β se adquirieron de Qiagen y se utilizaron de acuerdo con el Ensayo del cebador de la RT2 qPCR de Qiagen. Se midió la amplificación del ADNc mediante la fluorescencia de SYBR verde (tinción no específica del ADN). Las muestras se analizaron por triplicado en placas de 96 pocillos utilizando el sistema y el software de la PCR StepOne en tiempo real. La expresión génica de la proteína β -actina constitutiva sirvió como valor inicial de cuantificación para la expresión de la citoquina. Se analizaron los cambios en la expresión génica utilizando el procedimiento de Pfaffl. Se calculó la eficacia del cebador basándose en dos muestras seleccionadas aleatoriamente para cada una de la β -actina e IL-10.

Sumario

Tal como se muestra en la Figura 1, las citoquinas antiinflamatorias aumentaron tras la infusión de apoaeuorina. En particular, el ARNm de IL-10 se elevó tan pronto como 1 hora después de la infusión. No se detectaron cambios entre grupos en la expresión de la β -actina. A la vista de la relación bien conocida entre el nivel creciente de citoquinas antiinflamatorias y reducción de la inflamación, se puede concluir que apoaeuorina es un agente útil para reducir la inflamación en un sistema de modelo animal médicamente relevante, uno que es relevante e inmediatamente aplicable al escenario humano.

Ejemplo 2: Apoaeuorina protege a las neuronas de la isquemia y altera los niveles del ARNm de citoquinas en el hipocampo de rata.

En referencia a la Fig. 2A, los inventores demostraron que una inyección intrahipocámpica de apoaeuorina (AQ, el componente CaBP de aeucorina) protege significativamente las neuronas del hipocampo de la muerte celular isquémica. Se observaron en primer lugar los efectos neuroprotectores de AQ a las 24 horas y aguantaron hasta 48 horas (Fig. 2B y 2C). De manera interesante, el análisis de la transferencia western sugirió que los niveles de proteína AQ disminuyeron drásticamente durante este periodo de tiempo (Fig. 2D). Aunque los efectos neuroprotectores de AQ fueron más fuertes a las 48 horas, el nivel relativamente bajo de la proteína AQ presente en este momento sugiere que otros factores pueden jugar un papel en la capacidad de AQ de proteger neuronas de la muerte celular isquémica.

Una posibilidad es que la administración de AQ conduzca a un cambio de los niveles de las citoquinas antiinflamatorias. La interleuquina-10 (IL-10), una citoquina antiinflamatoria, ha demostrado anteriormente la capacidad de proteger neuronas de la hipoxia *in vitro*. Para ensayar la hipótesis de que la expresión de la citoquina puede jugar un papel en los efectos neuroprotectores de AQ, se midieron los niveles del ARNm de la citoquina en diferentes puntos temporales tras una única administración intrahipocámpica de AQ. Doce ratas F344 machos se sometieron a canulación bilateralmente en el hipocampo dorsal. Tras la recuperación, se inyectó AQ al 4% unilateralmente (vehículo en el otro lado, compensado) y después de 1, 24 o 48 h, se extrajeron los cerebros y se diseccionaron los hipocampos, se colocaron en hielo seco, y se homogeneizaron. Se aisló el ARN utilizando el del mini kit RNeasy de Qiagen. Se llevó a cabo la transcripción inversa utilizando el Kit-96 RT2 HT First Strand de Qiagen y se utilizó la qPCR para cuantificar IL-10 y la β -actina. Como se muestra en la Fig. 3A, la IL-10 aumentó significativamente en las hemisferas tratadas con AQ a 1 hora ($t(14) = 5,30, p < 0,05$), pero no a las 24 o 48 horas ($p > 0,05$) después de la inyección. El tratamiento con AQ no afecta a los niveles del ARNm de la β -actina (Fig. 3B).

Se realizaron análisis adicionales de la matriz PCR con matrices RT2 Profiler de Qiagen para citoquinas y quimioquinas en un intento de evaluar si se activaban otras citoquinas y quimioquinas en estos puntos temporales (Fig. 3C). En la Fig. 4 se representan gráficamente los resultados ilustrativos que sugieren que múltiples niveles del ARNm de citoquinas y quimioquinas antiinflamatorias cambian de una manera dependiente del tiempo tras la administración de AQ.

La Fig. 5 representa gráficamente un esquema que muestra la interacción de los genes de respuestas inmunitarias examinados por los inventores. Por consiguiente, los inventores analizaron los genes evaluados por su función, y la Figura 6 representa gráficas que muestran (A) el cambio en los genes de respuestas inflamatorias agudas tras la inyección de AQ; (B) el cambio en los activadores de linfocitos T/B tras la inyección de AQ; (C) el cambio en los genes de la angiogénesis/proliferadores celular tras la inyección de AQ; (D) el modelo de cambio en los genes atractores de macrófagos tras la inyección de AQ; (E) el cambio en los genes mediadores del calcio tras la inyección de AQ; y (F) los genes agrupados por el cambio de función con la inyección de AQ. La Tabla 1 presenta estos datos en forma tabular. En su conjunto, estos resultados sugieren que AQ es neuroprotectora y que esta neuroprotección implica un mecanismo neuroinmunomodulador.

Sumario

Los datos presentados en este ejemplo demuestran que los efectos neuroprotectores de apoaeuorina son dependientes del tiempo. Una inyección de AQ en el área CA1 del hipocampo dorsal disminuye significativamente la muerte celular cuando se administra 24 y 48, pero no 1 hora antes de la lesión isquémica. De manera interesante, AQ muestra una relación inversa entre la disponibilidad y la eficacia.

Los datos presentes demuestran además que los efectos neuroprotectores de apoaeuorina pueden implicar un mecanismo neuroinmunomodulador. La activación de IL-10 posterior a la inyección sugiere que el sistema inmunitario juega un papel en su efecto protector. La activación dependiente del tiempo de otras citoquinas y quimioquinas apoya esta hipótesis.

Tabla 1

ID del gen	ID del gen completo	% de cambio en 1 h	% de cambio en 24 h	% de cambio en 48 h	Función del gen
C3	Componente 3 del complemento	206,56	393,22	1011,11	Implicado en la inmunidad innata, la activación de C3 es necesaria para la activación del sistema del complemento
Ccl3	Ligando 3 de la quimioquina (motivo C - C)	2006,69	885,31	115,28	Implicado en la respuesta inflamatoria aguda; alistamiento de leucocitos polimorfonucleares

(continuación)

ID del gen	ID del gen completo	% de cambio en 1 h	% de cambio en 24 h	% de cambio en 48 h	Función del gen
Ccl4	Ligando 4 de la quimioquina (motivo C - C)	3388,75	619,76	168,29	Quimioattractor de linfocitos NK y monocitos
Cxcl1	Ligando 1 de la quimioquina (motivo C- X-C)	1936,23	177,36	55,18	Atractor de neutrófilos; implicado en la angiogénesis, inflamación, cicatrización de la herida; posible
Cxcl10	Ligando 10 de la quimioquina (motivo C- X-C)	959,44	627,21	845,14	Secretado en respuesta a IFNG; quimioattractor para monocitos macrófagos, Adhesión de linfocitos T, células NK, células dendríticas, angiogénesis, actividad antitumoral
Cxcl11	Ligando 11 de la quimioquina (motivo C- X-C)	446,86	1521,84	384,18	Interactúa con CXCL3 y CXCL9 como quimioattractor de linfocitos T
Cxcl9	Ligando 9 de la quimioquina (motivo C- X-C)	126,58	2645,95	1346,84	Quimioattractor de linfocitos T
Cxcr3	Receptor 3 de la quimioquina (motivo C- X-C)	117,13	3551,38	1165,82	Regula el tráfico de leucocitos; activa la integrina. Cambios citoesqueléticos, migración quimiotáctica; la unión de CXCL9.10, y 11 a CXCR3 activa el aumento en el calcio intracelular
Ifng	Interferón gamma amino	232,35	372,74	386,50	Activación, crecimiento, y diferenciación de linfocitos T y B, macrófagos, y linfocitos NK; regula en exceso la expresión de MHC, Diferenciación de Th1
Illa	Interleuquina 1 alfa	3662,58	123,42	124,76	Producción de fiebre, septicemia e inflamación
Il1b	Interleuquina 1 beta	3245,62	893,77	142,61	Producción de proliferación, diferenciación, y apoptosis celular
Il1f5	Familia de la interleuquina 1, miembro 5 (delta)	137,88	318,11	425,69	Inhibe específicamente NF-kB; forma un "clúster de genes de la citoquina" en el cromosoma 2
Il2rb	Receptor de la interleuquina 2, beta	173,50	1191,53	670,27	Estimula el crecimiento y la diferenciación de linfocitos T, linfocitos B, y linfocitos NK
Tnf	Factor de necrosis tumoral	2315,29	463,93	77,50	Mediador de la respuesta inflamatoria e inmunitaria; regula el crecimiento y la diferenciación de células; promueve la angiogénesis; imprime el metabolismo lipogénico

(continuación)

ID del gen	ID del gen completo	% de cambio en 1 h	% de cambio en 24 h	% de cambio en 48 h	Función del gen
Cd40lg	Ligando de CD40	161,81	1791,23	714,76	Expresado en linfocitos T; miembro de la superfamilia TNF: activa las células presentadoras de antígenos
Xcr1	Receptor 1 de la quimioquina (motivo C)	48,96	319,40	881,35	Aumenta el calcio intracelular

Otras realizaciones y usos de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica desde la consideración de la memoria descriptiva y la práctica de la invención desvelada en el presente documento. Todas las referencias citadas en el presente documento por cualquier motivo, incluyendo todas las citas de revistas y patentes y solicitudes de patentes de Estados Unidos y extranjeras, se incorporan de forma específica y completa en el presente documento por referencia. Se entiende que la presente invención no está limitada a los reactivos, formulaciones, condiciones de reacción específicos, etc., ilustrados y descritos en el presente documento, sino que abarca dichas formas modificadas de los mismos como se encuentran en el ámbito de las siguientes reivindicaciones.

REFERENCIAS

1. Ara, J., Fekete, S., Frank, M., Golden, J. A., Pleasure, D., Valencia, I. (2011). Hypoxic-preconditioning induces neuroprotection against hypoxia-ischemia in newborn piglet brain. *Neurobiology of Disease*, 43, 473-485.

2. Baimbridge, K. G., Celio, M. R., & Rogers, J. H. (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends in Neuroscience*, 15(8), 303-308

3. Bano, D., Young, K. W., Guerin, C. J., Lefevre, R., Rothwell, N. J., Naldini, L., y col. (2005). Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell*, 120(2), 275-285.

4. Chard, P. S., Bleakman, D., Christakos, S., Fullmer, C. S., & Miller, R. J. (1993). Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurons. *Journal of Physiology*, 472, 341-357.

5. Choi, D. W. (1992). Excitotoxic cell death. *Journal of Neurobiology*, 23(9), 1261-1276.

6. Detert, J. A., Hochstetter, E. L., Lescher, J. L., Van Langendon, T. M., & Moyer, J. R., Jr. (2011) Time course and effectiveness of aqoequorin as a neuroprotectant in the brain, *Society for Neuroscience Abstracts*, Program No. 781.04.

7. Detert, J. A., Heisler, J. D., Hochstetter, E. L., Van Langendon, T. M., & Moyer, J. R., Jr. (2009). Neuroprotection of hippocampal CA1 neurons from ischemic cell death using the calcium binding protein aequorin, *Society for Neuroscience Abstracts*, 35, Program No. 52.24.

8. Fan, Y., Shi, L., Gu, Y., Zhao, Y., Xie, J., Qiao, J., y col. (2007). Pretreatment with PTD-calbindin D 28k alleviates rat brain injury induced by ischemia and reperfusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(4), 719-728.

9. Gary, D. S., Sooy, K., Chan, S. L., Christakos, S., & Mattson, M. P. (2000). Concentration- and cell type-specific effects of calbindin D28k on vulnerability of hippocampal neurons to seizure-induced injury. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 75(1), 89-95.

10. Hochstetter, E. L., Detert, J. A., Lescher, J. D., and Moyer, J. R., Jr. (2012). Apoaequorin protects neurons from ischemia and alters cytokine mRNA levels in rat hippocampus. *Society for Neuroscience Abstracts*, 38, Program No. 860.03.

11. Jones, N. M., & Bergeron, M. (2001). Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(9), 1105-1114.

12. Kristian, T., & Siesjo, B. K. (1998). Calcium in ischemic cell death. *Stroke*, 29(3), 705-718.

13. Lee, J. M., Zipfel, G. J., & Choi, D. W. (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*, 399(6738 Suppl), A7-14.

14. Rehni, A. K., & Singh, T. G. (2012). Involvement of CCR-2 chemokine receptor activation in ischemic preconditioning and postconditioning of brain in mice. *Cytokine*, 60, 83-89.

15. Roger, V. L., Go, A. S., Lloyd-Jones, D. M., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., Bravata, D. M Turner, M. B. (2012). Heart disease and stroke statistics-2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 125:e2-e220. doi: 10.1161/CIR.0b013e31823ac046.

16. Wei, D., Ren, C., Chen, X., Zhao, H. (2012). The chronic protective effects of limb remote preconditioning and the underlying mechanisms involved in inflammatory factors in rat stroke. *PLoS ONE*, 7(2): e30892. doi: 10.1371/journal.pone.003892.

17. Yenari, M. A., Minami, M., Sun, G. H., Meier, T. J., Kunis, D. M., McLaughlin, J. R., y col. (2001). Calbindin d28k overexpression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. *Stroke*, 32(4), 1028-1035.

REIVINDICACIONES

1. Apoaeuorina para su uso en el precondicionamiento de neuronas para reducir lesiones neuronales debidas a isquemia cerebral en un sujeto, administrando la apoaeuorina al sujeto mediante inyección en el área CA1 del hipocampo dorsal 48 horas antes de que se produzca la isquemia cerebral.
- 5 2. Apoaeuorina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la apoaeuorina se administra mediante inyección.
3. Apoaeuorina para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la inyección es una inyección intrahipocámpica.
4. Apoaeuorina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sujeto es un ser humano.
- 10 5. Apoaeuorina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la reducción de las lesiones neuronales dura al menos 48 horas desde el momento de la administración de la apoaeuorina.
6. Una composición para su uso en el precondicionamiento de neuronas en un sujeto para reducir las lesiones neuronales debidas a isquemia cerebral, administrando la composición al sujeto mediante inyección en el área CA1 del hipocampo dorsal 48 horas antes de que se produzca la isquemia cerebral, que comprende:
- 15 (a) una dosificación terapéuticamente eficaz de apoaeuorina para precondicionar neuronas en un sujeto para reducir las lesiones neuronales debidas a isquemia cerebral, y
(b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la composición se formula como una dosificación inyectable.

20

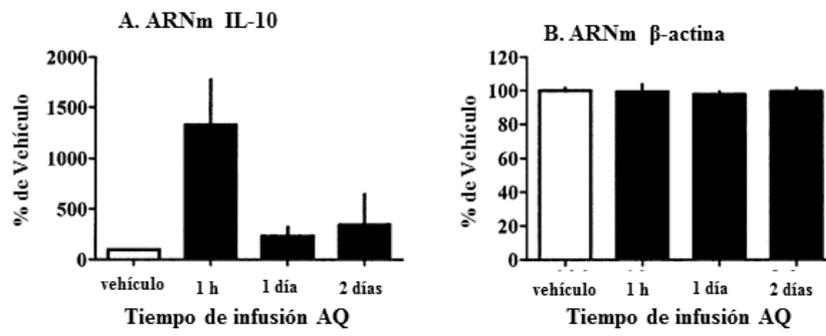
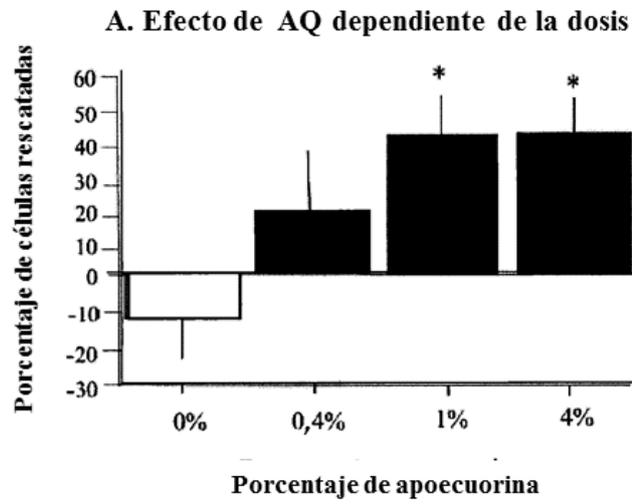
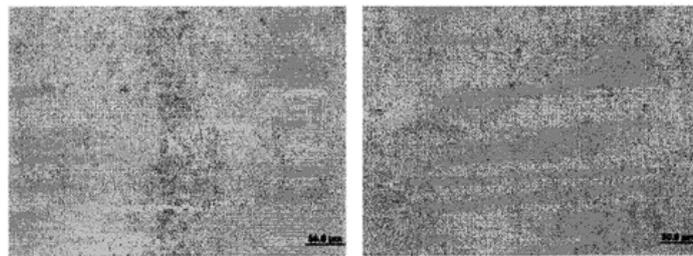


Fig. 1

Fig. 2



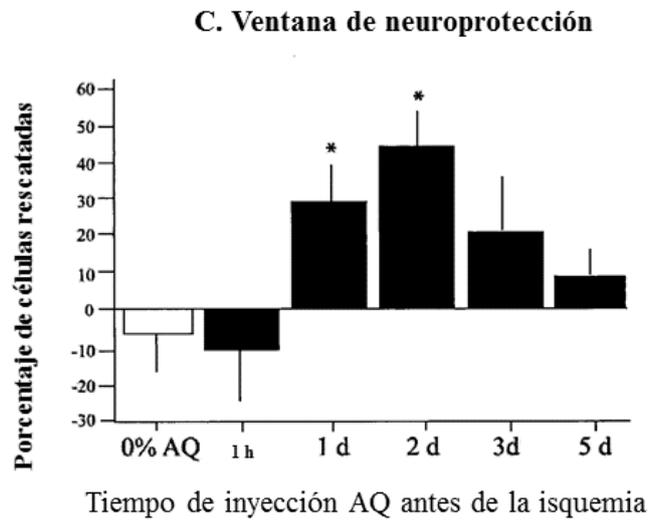
B. 4% AQ 2d antes de la isquemia es neuroprotector



Isquemia

Isquemia + 4% AQ

Fig. 2



D. Disponibilidad AQ después de la inyección

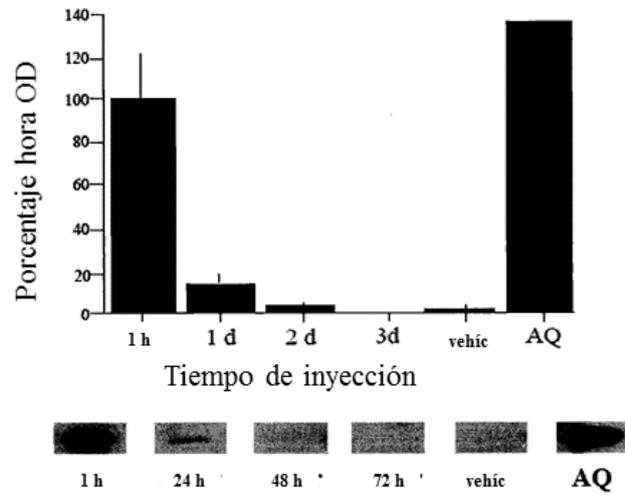
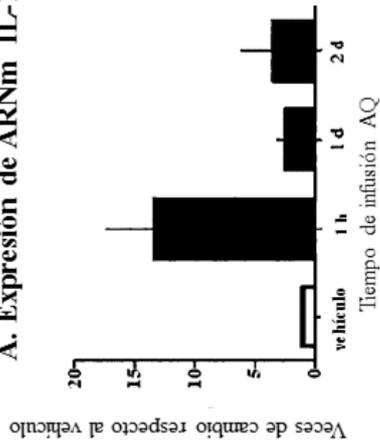
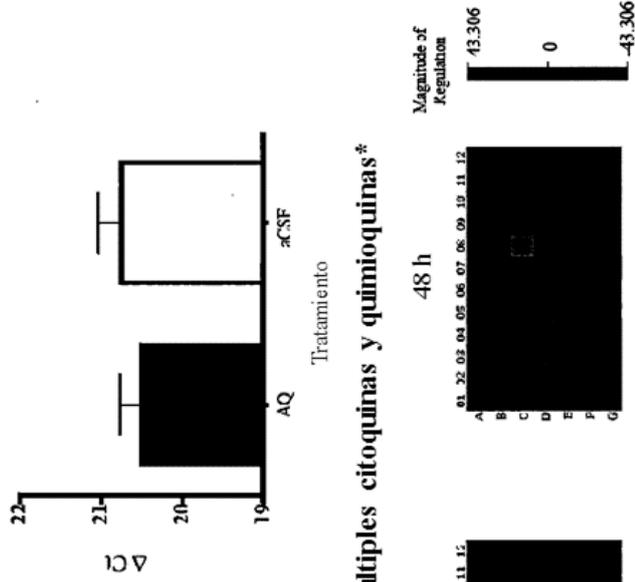


Fig. 3

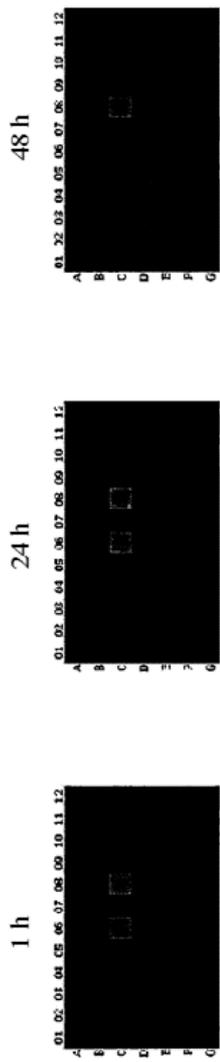
A. Expresión de ARNm IL-10



B. Expresión de ARNm β -actina



C. Matrices de PCR revelan cambios en múltiples citoquinas y quimioquinas*



Mapas térmicos significativos de placas de matriz de PCR de 96 pocillos y cómo los genes cambian en respuesta a la inyección de AQ (cada cuadrado representa un gen diferente)

Fig. 4

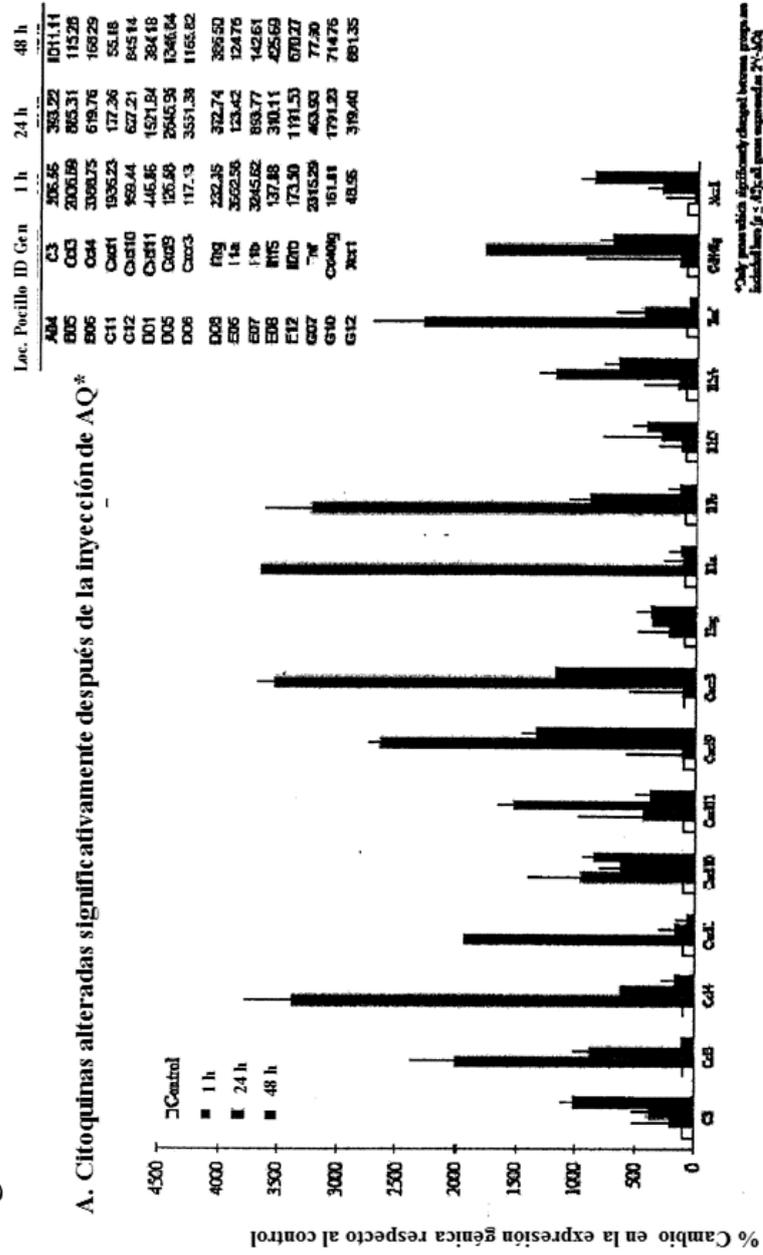


Fig. 5

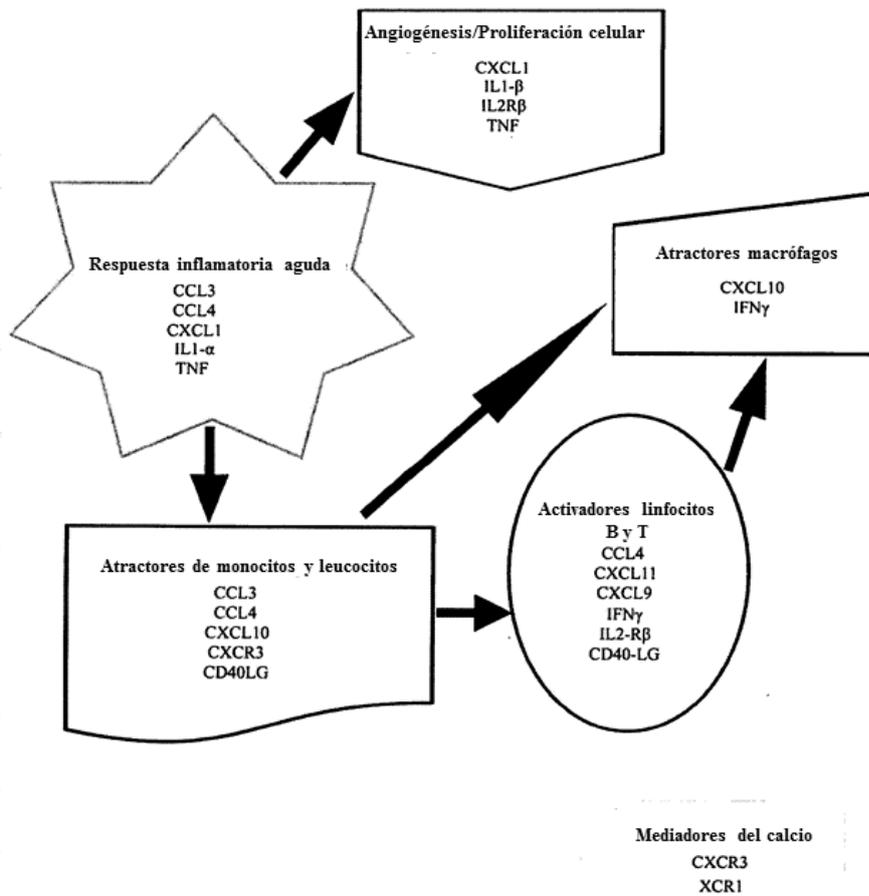


Fig. 6

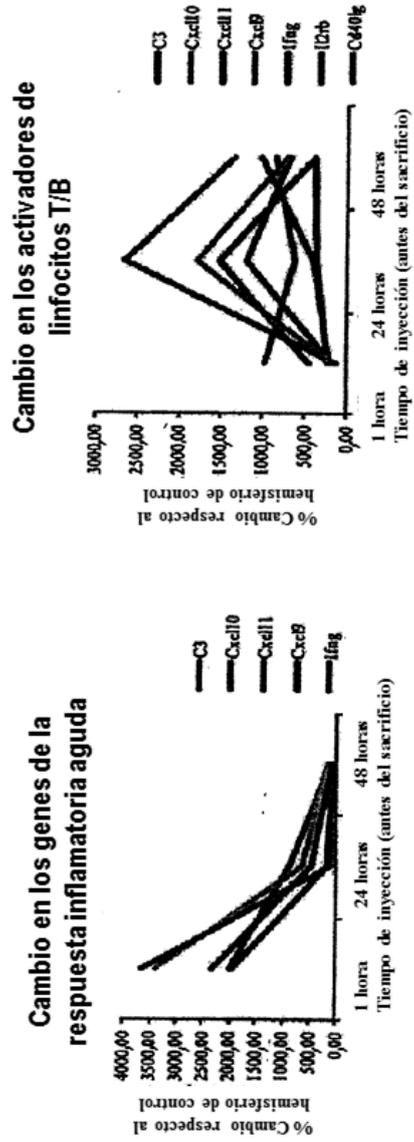


Fig. 6 cont.

