

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 726**

51 Int. Cl.:

A61K 31/137 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61M 5/142 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2015 PCT/EP2015/060511**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15173258**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2015 E 15721270 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3142651**

54 Título: **Solución farmacéutica que comprende dopamina para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson**

30 Prioridad:

13.05.2014 FR 1454254
09.03.2015 EP 15305352

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

29.05.2019

73 Titular/es:

**CENTRE HOSPITALIER RÉGIONAL ET
UNIVERSITAIRE DE LILLE (33.3%)
2 Avenue Oscar Lambret
59000 Lille, FR;
UNIVERSITÉ DE LILLE (33.3%) y
UNIVERSITE DU LITTORAL COTE D'OPALE
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**DEVOS, DAVID;
MOREAU, CAROLINE;
LALOUX, CHARLOTTE y
DEVEDJIAN, JEAN-CHRISTOPHE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 714 726 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

Solución farmacéutica que comprende dopamina para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a una solución farmacéutica que comprende dopamina para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en el que dicha solución farmacéutica se mantiene en condiciones anaeróbicas desde su formulación hasta su administración.

10

Estado de la técnica

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta al sistema nervioso, en particular, al sistema nigroestriado, que comprende neuronas dopaminérgicas. La pérdida de dopamina en el cuerpo estriado, como resultado de la degeneración neuronal progresiva en la *pars compacta* de la sustancia negra (SNpc), es responsable de los síntomas motores.

15

El tratamiento farmacológico de la enfermedad de Parkinson se puede dividir en terapia neuroprotectora y sintomática. La terapia neuroprotectora de la enfermedad de Parkinson se basa en la protección de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra humana y del cuerpo estriado del proceso degenerativo complejo que causa la muerte celular prematura y el agotamiento de la dopamina. En la práctica, sin embargo, casi todos los tratamientos disponibles son de naturaleza sintomática, y no parecen retardar ni revertir el curso natural de la enfermedad. De hecho, en este momento, no hay tratamiento neuroprotector disponible en el mercado.

20

Numerosos tratamientos sintomáticos se han centrado en la atenuación de esta deficiencia de dopamina (Chaudhuri *et al.*, 2009; Devos *et al.* 2013) (1, 2).

25

Como la dopamina no atraviesa la mucosa digestiva ni la barrera hematoencefálica, su precursor lipófilo L-dopa (Levodopa) se ha desarrollado como un medicamento administrado por vía oral para aliviar los síntomas de la enfermedad de Parkinson.

30

Sin embargo, hay numerosos inconvenientes farmacocinéticos relacionados con el uso de L-dopa, y desencadenan en la aparición de complicaciones relacionadas con L-dopa (CRLD). La L-dopa tiene una semivida corta en plasma, y genera una estimulación dopaminérgica pulsátil. En condiciones normales, las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia negra (SNpc) se disparan de manera continua, y la concentración de dopamina en el cuerpo estriado se mantiene a un nivel relativamente constante (Miller y Abercrombie, 1999; Venton *et al.*, 2003; Olanow *et al.*, 2006) (3-5). Sin embargo, en el estado de agotamiento de la dopamina, las dosis orales intermitentes de levodopa inducen una estimulación discontinua de los receptores de dopamina del cuerpo estriado y, después del tratamiento a largo plazo, contribuyen a la disfunción de las vías dopaminérgicas que conducen al desarrollo de complicaciones motoras (Fahn y el grupo de estudio de Parkinson, 2005; Parkinson study group, 2009) (6-7). Esta administración oral pulsátil que conduce a períodos alternativos de dosis inferiores y sobredosis podría contribuir al empeoramiento de la progresión de la enfermedad (Devos *et al.*, 2013) (2). De hecho, la administración oral intermitente de L-dopa es incapaz de restablecer la neurotransmisión dopaminérgica nigroestriada continua.

35

40

La administración dopaminérgica continua podría ser más fisiológica, y podría prevenir altas fluctuaciones en el nivel de dopamina que tendrían consecuencias perjudiciales.

45

Algunos tratamientos se han centrado en una administración dopaminérgica continua. Sin embargo, la administración directa de un gel de levodopa al duodeno (Olanow *et al.*, 2014; Devos *et al.*, 2009) (8, 9) o las infusiones subcutáneas de apomorfina, un agonista de la dopamina (Manson *et al.*, 2002; Drapier *et al.*, 2012) (10-11), han demostrado una eficacia moderada para reducir las CRLD y una ergonomía deficiente debido a la bomba externa (Syed *et al.*, 1998; Devos *et al.*, 2009) (9, 12). El uso de agonistas de dopamina de acción prolongada (Rascol *et al.*, 2000) (13) o la administración de L-dopa con un inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) para prolongar la semivida de eliminación de la dopamina (Stocchi *et al.*, 2010) (14) no logró mejorar significativamente las CRLD graves.

50

55

También se ha estudiado la distribución espacial de la dopamina y del metotrexato durante la microperfusión intracerebral continua (Sendelbeck y Urquhart, 1985) (15). La infusión se realizó en los tejidos cerebrales, más concretamente, en la región talámica media del diencefalo, con una bomba miniosmótica Alzet 2001 llena de clorhidrato de dopamina y metotrexato de sodio disueltos en líquido cefalorraquídeo artificial desoxigenado que contenía fluorescencia de sodio. La bomba miniosmótica se llenó con la solución al menos 16 h antes de la implantación. Sin embargo, en estas condiciones, el oxígeno necesariamente penetrará en la bomba y hará que la dopamina sea tóxica. Por otra parte, el estudio solo se realizó para analizar la difusión de diferentes fármacos de acuerdo con su liposolubilidad y polaridad, sin ninguna intención terapéutica.

60

La liberación continua de dopamina de una matriz mesoporosa de TiO₂ se ha descrito en el documento MX

2012012559. La dopamina se incrusta en la matriz producida mediante un método de gel sol. Sin embargo, dicha matriz debe implantarse en el núcleo caudado del cerebro, cuya implantación es invasiva, y no es conveniente para el paciente. Por otra parte, esta liberación continua de dopamina de la matriz mesoporosa solo permite controlar los síntomas de la enfermedad de Parkinson, sin producir ningún efecto neuroprotector.

5 Otra estrategia terapéutica se relaciona con una infusión continua de dopamina directamente en el cuerpo estriado o en el ventrículo lateral en animales.

10 Yebenes *et al.*, (1987) (16) y Yebenes *et al.*, (1988) (25) evaluaron el efecto de la dopamina o los agonistas de la dopamina mediante infusión intracerebroventricular en ratas con lesiones unilaterales de la vía nigroestriada y monos tratados con MPTP. La infusión se realizó en el ventrículo lateral cerebral ipsilateral a la lesión con un catéter conectado a una bomba Alzet 2001 llena de dopamina en diferentes vehículos tales como el metabisulfito de sodio. Se usó metabisulfito de sodio para reducir la autoxidación de la dopamina. Se observó que los síntomas motores disminuyeron y que las concentraciones intracerebrales de dopamina aumentaron.

15 Sin embargo, la rotación contralateral se indujo mediante la infusión de dopamina o agonistas de la dopamina con un máximo 2 días después de la implantación y una disminución lenta durante un período de 5 días de infusión. Este efecto muestra que la infusión continua induce un efecto de taquifilaxis, apoyado por la reducción en el número de receptores de DA en animales infundidos. Esto significa que el tratamiento induce un fenómeno de adaptación con una pérdida progresiva de eficacia. Por lo tanto, se requiere aumentar progresivamente la dosis de dopamina para mantener una máxima eficacia.

20 Por otra parte, se observó un problema de oxidación. La autoxidación de la dopamina induce la formación de quinonas y radicales libres que son altamente tóxicos para las células. Esta autoxidación de la dopamina induce la oxidación del tejido circundante y las paredes celulares. Se ha demostrado que esta oxidación induce neurotoxicidad y, por consiguiente, podría actuar contra el empeoramiento de la enfermedad de Parkinson. Este problema de autoxidación se redujo, pero se mantuvo cuando la dopamina se disolvió en metabisulfito de sodio. Por otra parte, el metabisulfito de sodio induce problemas de tolerancia, tales como la reacción alérgica a los sulfitos. Además, se ha demostrado que el empeoramiento de la degeneración neuronal es inducido por el uso de sulfito en las neuronas piramidales (Akdogan *et al.*, 2011) (17). Esto sugiere una posible toxicidad del metabisulfito de sodio en el modelo de enfermedad de Parkinson.

25 Por último, pero no menos importante, el tratamiento estudiado por Yebenes *et al.* fue solo una terapia sintomática, y no pudo lograr una protección de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra humana ni del cuerpo estriado.

30 Por lo tanto, todavía existe la necesidad en la técnica de un tratamiento de la enfermedad de Parkinson que no presente los inconvenientes mencionados anteriormente. Más particularmente, existe la necesidad de una composición que permita una terapia neuroprotectora de la enfermedad de Parkinson y no solo una terapia sintomática. También existe la necesidad de una composición que sea, por un lado, estable y que no presente problemas de oxidación que conduzcan a un aumento de la neurodegeneración de la sustancia negra y a los efectos secundarios relacionados, y, por otro lado, que no induzca taquifilaxis. Por último, existe la necesidad de una composición terapéutica que no proporcione una implantación altamente invasiva ni complicada.

35 **Objeto de la invención**

40 Los inventores han encontrado ahora que los inconvenientes anteriores pueden superarse cuando la dopamina está comprendida en una solución farmacéutica que se mantiene en condiciones anaeróbicas desde su formulación hasta su administración.

45 La invención se dirige, por tanto, a una solución farmacéutica que comprende dopamina para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, manteniéndose dicha solución farmacéutica en condiciones anaeróbicas desde su formulación hasta su administración.

50 Por "en condiciones anaeróbicas desde su formulación hasta su administración" se entiende todas las condiciones necesarias para la prevención de la oxidación o autoxidación de la dopamina hasta su administración al sitio de administración deseado, normalmente durante la formulación, acondicionamiento/almacenamiento (si corresponde) y administración. Esto significa que la formulación, el almacenamiento (si corresponde) y el uso, incluyendo la administración en el sitio de administración deseado, de la solución farmacéutica de la invención se realizan en un entorno esencialmente exento de oxígeno, es decir, que contiene menos del 5 % de oxígeno, preferentemente, menos del 2 % de oxígeno, más preferentemente, menos del 1 % de oxígeno, más preferentemente, menos del 0,5 % de oxígeno, más preferentemente, aproximadamente el 0 % de oxígeno. Asimismo, la solución farmacéutica de la invención en sí misma está exenta de oxígeno, lo que significa que contiene menos del 5 % de oxígeno, preferentemente, menos del 2 % de oxígeno, más preferentemente, menos del 1 % de oxígeno, más preferentemente, menos del 0,5 % de oxígeno, más preferentemente, aproximadamente el 0 % de oxígeno.

55 De hecho, la presente invención se basa en los hallazgos inesperados de que, cuando la dopamina se encuentra en

una solución farmacéutica que se mantiene en condiciones anaeróbicas desde su formulación hasta su administración, es capaz de tratar la enfermedad de Parkinson restaurando eficazmente la actividad motora normal sin inducir taquifilaxis. Por otra parte, solo se observa una ligera autooxidación cuando la dopamina se usa en condiciones anaeróbicas como se ha descrito anteriormente.

5 Además de estos efectos sintomáticos, se ha encontrado ventajosamente que, en estas condiciones, la dopamina induce eficazmente neuroplasticidad, incluyendo al menos un efecto neuroprotector, a las neuronas del cuerpo estriado y de la SNpc. Dicho efecto neuroprotector para las neuronas del cuerpo estriado o del SNpc no se puede inducir cuando la dopamina se formule y/o se administre aeróbicamente.

10 Asimismo, estos efectos sorprendentes se pueden obtener cuando la dopamina se encuentra en una solución farmacéutica que se mantiene en condiciones anaeróbicas desde su formulación hasta su administración, incluso sin agente conservante. Por lo tanto, no se requiere el uso de metabisulfito de sodio y se superan los inconvenientes relacionados con este compuesto.

15 El término "neuroplasticidad" (o plasticidad cerebral) se refiere a la capacidad del cerebro para reorganizarse mediante la formación de nuevas conexiones neuronales. En la presente invención, la neuroplasticidad significa que el número de neuronas es mayor cuando se aplica el tratamiento de la invención sin el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. La neuroplasticidad comprende la neuroprotección, la neurogénesis (es decir, formación de neuronas a partir de células madre), el cambio de fenotipo a neuronas dopaminérgicas (es decir, a partir de neuronas no dopaminérgicas) y/o los cambios de plasticidad tales como la sinaptogénesis y dentritogénesis.

El término "neurogénesis" se refiere a la producción de nuevas neuronas a partir de células madre.

25 Se ha demostrado anteriormente que la proliferación de progenitores se ve afectada en la zona subventricular (SVZ) y en la zona subgranular (SGZ) de pacientes afectados por la enfermedad de Parkinson, probablemente como consecuencia de la denervación dopaminérgica (Hoglinger *et al.* 2007) (18). De hecho, se ha demostrado que el agotamiento experimental de la dopamina disminuye la proliferación de progenitores tanto en la SVZ como en la SGZ en roedores. En el modelo de ratones con 6-hidroxidopamina de la enfermedad de Parkinson, la proliferación en la SVZ se redujo en aproximadamente un 40 % (Hoglinger *et al.* 2007) (18).

30 Por "efecto neuroprotector" o la "neuroprotección" se entiende la preservación de la estructura neuronal y/o la función de los pacientes afectados por la enfermedad de Parkinson en comparación con los pacientes que no están afectados por la enfermedad de Parkinson. Preferentemente, se refiere a la preservación del número de neuronas en el cuerpo estriado y/o en la *pars compacta* de la sustancia negra de pacientes afectados por la enfermedad de Parkinson en comparación con pacientes que no están afectados por la enfermedad de Parkinson.

35 El término "tratamiento", "tratar" y términos derivados significan revertir, aliviar, detener o prevenir la enfermedad de Parkinson y/o al menos un síntoma relacionado con la enfermedad de Parkinson. El término "tratamiento" también se refiere a un tratamiento profiláctico que puede retrasar la aparición de la enfermedad de Parkinson.

La solución farmacéutica de la invención es farmacéuticamente aceptable, es decir, no produce una reacción adversa, alérgica u otra reacción perjudicial cuando se administra a un paciente.

45 Por "dopamina" se entiende la molécula dopamina en forma de su base libre (4-(2-aminoetil)benceno-1,2-diol), así como sus sales farmacéuticamente aceptables, tales como, por ejemplo, su clorhidrato.

50 La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a cualquier sal obtenida de la dopamina, teniendo dicha sal una actividad biológica ligeramente similar en comparación con la actividad biológica de dicho compuesto de la invención. La dopamina es una amina, y puede formar sales de adición de ácido. Las sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas. Los ejemplos de dichos ácidos son ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido acético, ácido fumárico, ácido succínico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido tartárico y ácido maleico, de los que el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácido acético son particularmente preferidos. Preferentemente, la sal farmacéuticamente aceptable es clorhidrato de dopamina.

55 La solución farmacéutica de la invención puede comprender además complejos, moléculas, péptidos, sales, vectores o cualquier otro compuesto que pueda mejorar o que pueda ser beneficioso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

60 Ventajosamente, la solución farmacéutica de la invención está exenta de agente conservante.

65 Por "agente conservante" se entiende todas las moléculas, los péptidos, las sales u otros compuestos que tienen un efecto antioxidante o que son esenciales para conservar la dopamina y otros compuestos que constituyen la solución farmacéutica de la invención.

En una variante particularmente preferida de la presente realización, la solución farmacéutica de la invención se formula para una administración parenteral.

5 Preferentemente, la solución farmacéutica contiene vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser, en particular, soluciones salinas isotónicas estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, en especial, liofilizadas que permitan la constitución de soluciones inyectables tras la adición, en función del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica. Por ejemplo, cuando se disuelve en solución salina (o solución de cloruro de sodio), el clorhidrato de dopamina así obtenido da una solución ácida estable, que
10 tiene preferentemente un pH comprendido entre 4,5 y 7, más preferentemente entre 5,5 y 7, dependiendo de la dilución.

La solución farmacéutica de la invención está preferentemente en forma de una solución acuosa.

15 Con respecto a la formulación de la solución de dopamina, la dopamina puede proporcionarse, por ejemplo, directamente en forma de una solución que se administre al paciente. También es posible proporcionar dopamina sólida, por ejemplo, en forma de polvo, que se disuelva en un disolvente adecuado, en especial, en un disolvente acuoso, formando la solución poco antes de la administración. La preparación de la solución de dopamina justo o poco antes de la administración reduce aún más el riesgo de oxidación y tiene la ventaja de una vida útil más
20 prolongada de la dopamina sólida en comparación con las soluciones de dopamina.

La formulación de la solución farmacéutica que comprende dopamina en condiciones anaeróbicas, es decir, la solución que está exenta o esencialmente exenta de oxígeno, puede obtenerse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante la desoxigenación con gas inerte tal como nitrógeno, freones, argón, xenón,
25 (36)-kriptón o neón. Con este fin, se puede realizar un lavado de una solución acuosa, por ejemplo, en una solución acuosa que contenga sal, en la que se haya disuelto dopamina previamente en una atmósfera inerte como se ha descrito en el documento FR0114796.

La forma (en especial, la concentración) de la solución farmacéutica, la vía de administración, la dosis y la pauta dependen naturalmente de la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.
30

La solución farmacéutica de la presente invención se puede usar para el tratamiento de cualquier organismo vivo, más en especial, un mamífero y, más particularmente, un ser humano y más particularmente un ser humano de más de 45 años, más preferentemente de más de 65 años.
35

Ventajosamente, dicha solución farmacéutica es adecuada para la administración intraventricular cerebral. Más específicamente, dicha solución farmacéutica está adaptada para ser administrada en el ventrículo lateral derecho, preferentemente, cerca del foramen interventricular, de modo que la solución farmacéutica pueda administrarse en el tercer ventrículo.
40

De hecho, los presentes inventores han descubierto que, sorprendentemente, una administración cercana al foramen interventricular, en particular, colocando el catéter en el ventrículo lateral derecho cerca del foramen interventricular, permite que la solución farmacéutica se administre directamente en el tercer ventrículo y permita la concentración bilateral de dopamina en el cuerpo estriado a través de las paredes del ventrículo y del área subventricular (SVZ). Esta administración reduce considerablemente las complicaciones motoras, mientras que la dopamina se concentra lateralmente en la región frontal y en el núcleo caudado cuando se administra en la región frontal del cerebro, lo que sería menos ventajoso con respecto a las complicaciones motoras y al desarrollo de psicosis.
45

Por lo tanto, la presente invención también proporciona una solución farmacéutica como se ha descrito anteriormente, solución farmacéutica que está adaptada para ser administrada en un ventrículo cerebral, preferentemente, en el ventrículo lateral derecho, preferentemente, cerca del foramen interventricular.
50

Con este fin, y para llevar a cabo la administración en condiciones anaeróbicas, la solución farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la invención se adapta para administrarse con una bomba anaeróbica.
55

La administración de la solución de la invención en condiciones anaeróbicas también puede realizarse mediante cualquier otro método conocido por el experto en la materia.

60 Por "bomba anaeróbica" se entiende cualquier dispositivo que permita una liberación controlada de la solución de la invención y que no degrade la anaerobia de dicha solución al exponerla al oxígeno. Por lo general, dicha bomba debe ser compatible con la presente invención, y en particular, es capaz de administrar anaeróbicamente una solución de dopamina en el sitio deseado de administración.

65 Por ejemplo, se puede usar una bomba SYNCHROMED II (comercializada por Medtronic), una bomba IPRECIO (comercializada por Iprecio) o una bomba ALZET (comercializada por Alzet) con este fin. La bomba SYNCHROMED

II (comercializada por Medtronic) es adecuada para seres humanos y, por lo tanto, se puede usar preferentemente en pacientes humanos. Esta bomba permite condiciones anaeróbicas completas y una excelente estabilidad de la dopamina. De hecho, los inventores han demostrado que la dopamina en condiciones anaeróbicas fue estable durante al menos un mes.

5 Por lo tanto, el uso de estas bombas reduce extremadamente el riesgo de oxidación o de autoxidación de la dopamina. El balance de beneficio/riesgo para el uso de dopamina en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson fue negativo antes del desarrollo de estas bombas anaeróbicas.

10 Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros, y en particular, en función del modo de administración usado, de la patología relevante o, como alternativa, de la duración deseada del tratamiento.

15 La presente invención también proporciona una solución farmacéutica y su uso como se ha descrito anteriormente, administrándose dicha solución farmacéutica de manera continua con variaciones de dosis. Preferentemente, dicha solución farmacéutica se administra con una dosis diurna predominante o con una dosis diurna exclusiva.

20 De hecho, los presentes inventores han descubierto que este protocolo de administración reduce, e incluso evita, la taquiflaxia y permite una eficacia a largo plazo del tratamiento sin aumentar el riesgo de desarrollo de psicosis inducido por una dosis nocturna excesiva.

25 Dicho protocolo de administración puede llevarse a cabo fácilmente usando una bomba anaeróbica como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, una bomba SYNCHROMED II. Por "administración continua" se entiende una administración de la solución farmacéutica de la invención en un período continuo, ya sea durante todo el día y la noche, es decir, durante 24 horas, o solo durante unas cuantas horas.

30 "Dosis diurna predominante" significa que la dosis nocturna es más baja que la diurna, preferentemente, al menos un 25 % más baja que la diurna, más preferentemente, al menos un 50 % más baja que la diurna, más preferentemente, al menos un 70 % más baja que la diurna, más preferentemente, al menos un 80 % más baja que la diurna, más preferentemente, al menos un 90 % más baja que la diurna.

Por "una dosis diurna exclusiva" se entiende que no hay una dosis nocturna.

35 En una realización particular, la solución farmacéutica como se ha descrito anteriormente se administra con la siguiente pauta posológica:

- una dosis diurna continua y estable,
- un bolo administrado por la mañana y
- opcionalmente, al menos un bolo cuando sea necesario, y/u
- 40 - opcionalmente, una dosis nocturna continua y estable más baja que la dosis diurna, preferentemente, al menos un 25 % más baja que la diurna, más preferentemente, al menos un 50 % más baja que la diurna, más preferentemente, al menos un 70 % más baja que la diurna, más preferentemente, al menos un 80 % más baja que la diurna, más preferentemente, al menos un 90 % más baja que la diurna.

45 Por "bolo" se entiende una dosis única y relativamente alta de la solución farmacéutica de la invención que se administra para lograr un efecto inmediato. Preferentemente, el bolo es de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Se administra un bolo por la mañana y, opcionalmente, cuando sea necesario, es decir, cuando el paciente necesite un efecto inmediato del tratamiento.

50 Los inventores han descubierto que este protocolo de administración permite la determinación de una dosis mínima eficaz que puede variar de un paciente a otro. Los síntomas motores y no motores de la enfermedad de Parkinson se tratan sin ninguno de los efectos secundarios (disquinesias, fluctuaciones, psicosis...), que, en general, ocurren con la administración periférica de tratamientos dopaminérgicos (es decir, la administración oral pulsátil de L-dopa, la administración subcutánea de apomorfina, la administración yeyunal de un gel de L-dopa) ni los riesgos de autoxidación observados con la administración central (intracerebroventricular) de la dopamina aeróbica. Estas complicaciones o efectos secundarios pueden detenerse o incluso prevenirse si el tratamiento con dopamina anaeróbica de acuerdo con la invención se administra antes de la aparición de dichas complicaciones. Además, el uso de esta dosis mínima eficaz produce al menos una neuroprotección y, en última instancia, incluso un restablecimiento neuronal. Por lo general, el uso de una bomba anaeróbica permite determinar una dosis mínima eficaz que se adapte a cada caso.

60 Por "dosis mínima eficaz" se entiende una cantidad suficiente para ser eficaz, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicada a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total será decidido por el médico tratante dentro del alcance de un buen juicio médico. La dosis eficaz mínima específica para cualquier paciente en particular que la necesite dependerá de una variedad de factores que incluyen la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente, el tiempo de administración, la vía de administración, la

duración del tratamiento; los medicamentos usados en combinación o coincidentes con los factores similares conocidos en el campo de la Medicina. Por ejemplo, está bien dentro de las habilidades del experto en iniciar dosis del compuesto a niveles inferiores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Las dosis también pueden variar de acuerdo con la sensibilidad a la dopamina por parte del paciente. Por ejemplo, previamente, se ha observado una proporción de 1/100 a 1/300 entre la dosis requerida administrada por vía oral y la dosis administrada con una vía intracerebroventricular (ICV) (por ejemplo, morfina, baclofeno).

En el presente documento, también se proporciona un método para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson que comprende administrar dopamina a un paciente que lo necesite, en el que la dopamina se formula, acondiciona y administra anaeróticamente.

Descripción de las figuras

Figura 1: Estabilidad de la solución de la invención a lo largo del tiempo en bombas anaeróticas (A: SYNCHROMED II, B: ALZET 2001)

Figura 2: Restauración del déficit motor en ratones de MPTP tras 7 días de infusión de dopamina intracerebroventricular o tratamiento oral con L-dopa. Las dosis de dopamina se expresan en $\mu\text{g}/\text{día}$ y de L-dopa en $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$. Los datos se expresan en medias porcentuales \pm ETM de ratones con solución salina ($n = 8-15$). * frente a ratones de solución salina, # frente a ratones de MPTP no tratados, $p < 0,05$ (pruebas de ANOVA de una vía y LSD Fisher post-hoc).

A: velocidad media

B: distancia cubierta en zona de ensayo durante 10 min.

Figura 3: Modificaciones del contenido de neurotransmisores en el cuerpo estriado de ratones de MPTP tras 7 días de infusión de dopamina intracerebroventricular o tratamiento oral con L-dopa. Dopamina, acetato de dihidrofenilo (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) (A, B), serotonina (5HT) y acetaldehído de hidroxindol (5HIA) (C, D) y noradrenalina (NA) (E, F) en el cuerpo estriado ipsilateral a la infusión de dopamina con bomba (A, C, E) y cuerpo estriado contralateral (B, D, F). Las dosis de dopamina de tratamiento se expresan en $\mu\text{g}/\text{día}$ y de L-dopa en $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$. Los datos se expresan en medias porcentuales \pm ETM de ratones de solución salina ($n = 8$). * frente a ratones de solución salina, # frente a ratones de MPTP no tratados, $p < 0,05$ (pruebas de ANOVA de una vía y LSD Fisher post-hoc).

Figura 4: Restablecimiento de la tinción TH-ir en SNpc y cuerpo estriado de ratones de MPTP tras 7 días de infusión de dopamina intracerebroventricular preparada y administrada en condiciones anaeróticas, dopamina preparada y administrada en condiciones aeróticas o con tratamiento oral de L-dopa. Las dosis de dopamina se expresan en $\mu\text{g}/\text{día}$ y de L-dopa en $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$. Los datos se expresan en medias porcentuales \pm DT de ratones de solución salina ($n = 10$). "dopamina A" significa dopamina preparada y administrada en condiciones anaeróticas, "dopamina O₂" significa dopamina preparada y administrada en condiciones aeróticas. * significa una diferencia significativa entre la condición designada y la condición de solución salina. # significa una diferencia significativa entre la condición designada y la condición de MPTP. $p < 0,05$ (pruebas de ANOVA de una vía y LSD Fisher post-hoc).

A: Recuento de neuronas TH-ir en SNpc

B: Densidad óptica TH-ir en el cuerpo estriado dorsal

Descripción detallada de la invención

Ejemplos

Ejemplo 1

El solicitante ejecutó su invención usando ratones de MPTP. Estos ratones se intoxicaron con MPTP para reproducir las mismas complicaciones motoras que las inducidas por la enfermedad de Parkinson. La MPTP es una neurotoxina (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) que causa síntomas permanentes de la enfermedad de Parkinson mediante la destrucción de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro.

Se produjeron diferentes soluciones de la invención y se infundieron en ventrículos cerebrales usando una cánula y una bomba ALZET en la que se había realizado una desoxigenación previa con gas inerte.

Dichas soluciones se han realizado diluyendo clorhidrato de dopamina en solución salina que previamente se han desoxigenado mediante lavado con nitrógeno en un gas inerte. Dichas soluciones tienen un pH comprendido entre 5,58 y 6,84 dependiendo de la dilución. Este pH permite que la solución sea bastante estable, ya que la dopamina está en su forma protonada como se muestra en la figura 1.

Los ratones de MPTP obtienen sus funciones motoras "normales" con 0,06 mg/día de dopamina (DA con MPTP a 0,06) tras 7 días de tratamiento. Por el contrario, los ratones de control (LD con MPTP) que se trataron con dosis altas de L-Dopa tuvieron comportamientos anormales, tales como disquinesia, como se muestra en la figura 2.

5 Se han analizado las "paredes ventriculares" de los grupos de ratones. Las paredes ventriculares de los ratones tratados con altas dosis de dopamina aeróbica comprenden numerosas zonas negras, a diferencia de las paredes ventriculares de los ratones tratados con la solución de la invención.

10 El color negro se debe a la oxidación de las paredes del ventrículo de la quinona de la dopamina y los radicales libres producidos por la oxidación de la dopamina.

Por último, los inventores descubrieron que el uso de una solución de la invención produce un efecto neuroprotector en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, como se muestra en la figura 4.

15 Por lo tanto, en el presente documento se propone una solución para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en el que dicha solución se administra con variaciones de dosis por infusión en el ventrículo lateral derecho, preferentemente, cerca del foramen interventricular, de modo que la solución se puede administrar directamente en el tercer ventrículo. La invención permite obtener un mayor equilibrio de beneficio/riesgo que los
20 tratamientos conocidos anteriores.

Ejemplo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

25 Modelo de ratones de MPTP y diseño experimental

Se alojaron los animales por grupos (10 por jaula) en una sala con temperatura controlada (22 ± 2 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Había comida y agua disponibles a voluntad en la jaula. Se respetó un período de
30 habituación de 7 días tras el transporte antes de cualquier manipulación de los animales.

Se usaron ratones C57B1/6J macho de cinco meses de vida (Elevage Janvier, Le Genest St Isle, Francia) que pesaban 28-30 g. Los ratones recibieron cuatro inyecciones intraperitoneales (con intervalos de 2 h) de solución salina que contenía 0 ("ratones de solución salina") o 20 mg/kg de MPTP ("ratones de MPTP") (Sigma Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos). Se administró solución salina o MPTP en el día 0 (D0), la infusión central continua de
35 dopamina o el tratamiento con L-dopa periférica se administraron del día 7 al 14 (D7 a D14), y luego se realizaron la medición locomotora espontánea y el sacrificio el D14.

Tratamientos

40 Se crearon trece grupos diferentes:

- Ratones sin implantación de solución salina (tratados con solución salina)
- Ratones sin implantación de MPTP (tratados con solución salina)
- 45 - MPTP con implantación de bomba llenada en condiciones anaeróbicas con dopamina a 40 µg/día
- MPTP con implantación de bomba llenada en condiciones anaeróbicas con dopamina a 60 µg/día
- MPTP con implantación de bomba llenada en condiciones anaeróbicas con dopamina a 80 µg/día
- MPTP con implantación de bomba llenada en condiciones anaeróbicas con dopamina a 120 µg/día
- MPTP con implantación de bomba llenada en condiciones anaeróbicas con dopamina a 240 µg/día
- 50 - MPTP con implantación de bomba llenada en condiciones aeróbicas con dopamina a 60 µg/día
- MPTP con implantación de bomba llenada en condiciones aeróbicas con dopamina a 120 µg/día
- MPTP con implantación de bomba llenada en condiciones aeróbicas con dopamina a 240 µg/día
- Ratones de MPTP tratados con L-dopa a 12,5 mg/kg + benzerasida a 12 mg/kg, i.p. dos veces al día
- Ratones de MPTP tratados con L-dopa a 25 mg/kg + benzerasida a 12 mg/kg, i.p. dos veces al día
- 55 - Ratones de MPTP tratados con L-dopa a 50 mg/kg + benzerasida a 12 mg/kg, i.p. dos veces al día

Tratamiento con una solución de la invención

Las soluciones de la invención se han preparado mediante la dilución de clorhidrato de dopamina (a veces denominado de aquí en adelante para abreviar "dopamina") (referencia H8502, Sigma-Aldrich) en solución salina (NaCl al 0,9 %) que previamente se había desoxigenado mediante lavado abundante con nitrógeno en gas inerte. Dichas soluciones tienen un pH comprendido entre 5,58 y 6,84 dependiendo de la dilución. Este pH permite que la solución sea bastante estable, ya que la dopamina está en su forma protonada.

65 La estabilidad de este fármaco en la bomba osmótica ALZET 2001 se probó durante 30 días a 37 °C usando un ensayo de HPLC de dopamina cada 4 días (véase la Figura 1B). La bomba osmótica ALZET 2001 se calibró para

infundir a una velocidad de 1 µl/hora durante 7 días.

La solución de dopamina se inyectó en la bomba conectada a una cánula de infusión cerebral, bien en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Los experimentos anaeróbicos se procesaron en una atmósfera que contenía hidrógeno al 5 %, dióxido de nitrógeno al 5 % y nitrógeno al 90 % (cámara anaeróbica/ambiental Bactron, Anaerobe System). Si aparecía oxígeno, se combinaba directamente con hidrógeno, dando el agua recogida en un bote. Por otra parte, se añadió resazurina en el área como un indicador rédox que cambia su color en presencia de oxígeno. Luego, las bombas se mantuvieron en estas condiciones para el cebado durante 4 horas a 37 °C antes de la cirugía estereotáxica.

10 Tratamiento con L-DOPA

Se administró L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) junto con un inhibidor de la DOPA descarboxilasa periférica para prevenir la síntesis periférica de la dopamina a partir de L-DOPA. Se disolvió clorhidrato de metiléster de L-dopa (Sigma-aldrich) en solución salina con benserazida a 12 mg/kg, independientemente de la dosis de L-dopa (Cenci y Lundblad, 2007) (19) y se preparó de forma extemporánea antes de cada inyección. La L-dopa se administró por vía intraperitoneal (i.p.) dos veces al día durante 7 días a las dosis descritas previamente (Espadas *et al.*, 2012; Fornai *et al.*, 2000; Cenci y Lundblad, 2007) (19,21).

20 Preparación de la bomba ALZET

La bomba escogida para el presente estudio fue el tipo 2001 con un volumen de reservorio de 200 µl, que permitió la infusión de 1 µl por hora durante 7 días. El kit de infusión cerebral proporcionó una cánula cerebral (calibre 30; DI = 0,16 mm; DE = 0,31 mm; longitud bajo el pedestal = 3 mm) y un soporte de cánula adaptado para ratones. Se incluyó un tubo de catéter en el kit, y se puede cortar a la longitud necesaria para conectar la cánula al moderador de flujo de la bomba ALZET. El catéter, que conecta la cánula con la bomba, debe ser un 25 % más largo que la distancia entre el sitio subcutáneo de la bomba y la ubicación de la cánula, para permitir el libre movimiento de la cabeza y del cuello del animal.

En condiciones ambientales adaptadas, en el recinto de la caja de manipulación con guantes anaeróbica, cuando se requería en el protocolo, se disolvieron las diferentes soluciones de dopamina, y las diferentes partes del conjunto de infusión cerebral y la bomba osmótica se llenaron con las soluciones de dopamina con una jeringa y un tubo de llenado específico.

Para eliminar definitivamente la presencia de burbujas de aire y "poner en marcha" la bomba, se requiere cebado; se colocaron las bombas precargadas en un bote cerrado anaeróbico con solución salina estéril al 0,9 % a 37 ° durante al menos cuatro horas. Para evitar cualquier mezcla de soluciones durante el cebado y la exposición al oxígeno durante la implantación quirúrgica, se usó parafilm para cubrir el extremo de la cánula. El conjunto de infusión de la bomba y el cerebro ya está listo para el implante.

También se controló que la bomba ALZET no tuviera un impacto negativo en el rendimiento de la actividad motora al comparar el rendimiento de la actividad motora de ratones de solución salina y de MPTP bien sin implantación (NI) o con implantación de una bomba Alzet llena de solución salina (solución salina).

45 Implantación de la bomba Alzet mediante cirugía

Se anestesiaron los ratones con hidrato de cloral (300 mg/kg, Sigma-Aldrich) y se colocaron en un marco estereotáxico. En resumen, tras la incisión del cuero cabelludo y la limpieza/el secado del cráneo, se realizó una perforación a través del cráneo en coordenadas estereotáxicas para el ventrículo lateral derecho, B - 0,34 mm, L + 1 mm (atlas cerebral de Paxinos y Watson). Luego, se insertó la bomba de Alzet llena por vía subcutánea en el lomo del ratón y se fijó la cánula de infusión cerebral a un soporte de cánula adaptado al marco estereotáxico. Se colocó el portador de la cánula en las coordenadas estereotáxicas anteroposteriores y laterales requeridas, y la cánula se bajó lentamente a través del orificio trepanado, hasta el ventrículo lateral. Entonces, se ancló la cánula de soporte al cráneo con cemento acrílico. Una vez seca la incrustación de cemento, se cortó suavemente la cabeza del soporte de la cánula, se suturó el cuero cabelludo y se dejó que los animales se recuperaran bajo una lámpara caliente hasta que se despertaron. Tras la cirugía, se realizaron cuidados diarios a lo largo del experimento.

Evaluación de la actividad motora

Después de 7 días de tratamiento (L-dopa i.p. o dopamina i.c.v.), se registró la actividad motora espontánea en un actímetro (Panlab, Barcelona, España) durante 10 minutos. El aparato era un recinto de plexiglás transparente de 45 x 45 x 35 cm dotado de dos marcos de rayos infrarrojos. Este aparato permitió medir la actividad motora horizontal (distancia recorrida, velocidad, tipo de movimiento) y el comportamiento posterior en función de las obstrucciones de los rayos infrarrojos. Los parámetros escogidos se recogieron con el programa informático Actitrack (Panlab, Barcelona, España).

Tinción y análisis de tirosina hidroxilasa nigroestriada

Después de 7 días de tratamiento (L-dopa i.p. o dopamina i.c.v), se anestesiaron los animales profundamente con pentobarbital sódico y se perfundieron por vía transcardiaca con paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0,1 M para la fijación de tejidos (pH 7,4). Se extirparon los cerebros y, tras un proceso posterior a la fijación, se crioprotegieron y se congelaron.

Se prepararon secciones coronales de cuarenta micrómetros de espesor del cuerpo estriado y de la *pars compacta* de la sustancia negra (SNpc)/área tegmental ventral (VTA) usando un criostato (Leica, Nussloch, Alemania). Se tomaron cortes en serie de Bregma +0,98 mm a Bregma -0,82 mm para el cuerpo estriado, y de Bregma -2,92 mm a Bregma -3,42 mm para la SNc/VTA.

Se usaron esos cortes coronales de flotación libre para el análisis inmunohistoquímico. Se incubaron los cortes sucesivamente con anticuerpo policlonal de conejo anti-tirosina hidroxilasa (1:1000, Chemicon International, CA, EE.UU.), anticuerpo policlonal anti-conejo conjugado biotinilado de cabra (1:500, kit ABC de Vectastain elite, Vector Laboratories, CA, EE.UU.), y el complejo de avidina/biotina conjugado con peroxidasa de rábano picante (kit ABC de Vectastain elite, Vector Laboratories, CA, Estados Unidos). Se expusieron los cortes luego a diaminobenzidina para la detección.

Se evaluó el número de neuronas TH-ir ("inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa") de la SNpc contando las neuronas TH-ir del hemisferio izquierdo y derecho en cada 4ª corte de la SNpc de todos los grupos experimentales. Se usó el programa informático de análisis de estereología Mercator (Explora Nova, La Rochelle, Francia) para realizar recuentos estereológicos imparciales de las neuronas TH-ir. Para la cuantificación imparcial, se dibujó una línea alrededor de la SNpc de cada corte. El observador tenía ocultación de los grupos experimentales. Las células se contaron con un aumento de 40, usando un microscopio Nikon Eclipse E600 (Tokio, Japón). Se usaron marcos de recuento aleatorios y sistemáticos. El número de neuronas TH-ir en la SNpc se evaluó contando las neuronas TH-ir del hemisferio izquierdo y derecho en cada cuarto corte de la SNpc de todos los grupos experimentales. Como no se encontró ninguna diferencia entre la SNps izquierda y derecha, se agruparon las neuronas TH-ir contadas de ambos lados y para cada animal, se calculó una suma de neuronas contadas en cada corte. Para el cuerpo estriado dorsal, se evaluó la tinción con TH como una densidad óptica en cada corte, se calculó un valor de densidad óptica medio para cada animal.

Cromatografía líquida de alto rendimiento

Catorce días después de la inyección de MPTP o de solución salina para los ratones o 7 días después de la implantación de la bomba, se anestesiaron los animales profundamente con pentobarbital sódico y se perfundieron por vía transcardiaca con solución salina recién preparada. Se extirparon los cerebros rápidamente y se diseccionaron para recoger el cuerpo estriado izquierdo y derecho, que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se determinaron la dopamina, los metabolitos y la 5-cisteinil-dopamina mediante HPLC usando una columna Chromsystems 6100 y la fase móvil de Chromsystems mediante detección colorimétrica (Coulouchem III, Thermo Fisher).

Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media \pm ETM (o DT en la tabla). Para todos los parámetros, se usó un ANOVA de una vía para evaluar el efecto del grupo, seguido de la prueba LSD Fisher post hoc (STATISTICA 6.1, Statsoft, Francia). Si los datos no seguían una distribución gaussiana, se realizó un análisis de la varianza de Kruskal-Wallis, seguido de una prueba de Mann-Whitney post hoc (STATISTICA 6.1, Statsoft, Francia). La significancia se fijó en $p < 0,05$.

RESULTADOS**EXPERIMENTO 1: Determinación de la eficacia de la infusión de dopamina en el déficit motor de ratones de MPTP (registrada mediante actimetría)**

En el siguiente experimento, el uso del término "dopamina" significa "dopamina anaeróbica".

Para evaluar la eficacia de la infusión de dopamina central (es decir, la infusión de dopamina intracerebro-ventricular) frente a L-dopa periférica en ratones de MPTP, se realizó la medición de la sintomatología y de la actividad locomotora después de cada tratamiento. Como se muestra en la Figura 2 y como se ha informado anteriormente (Laloux *et al.*, 2012) (22), los ratones de MPTP mostraron una reducción en la velocidad media y la distancia recorrida en la zona de ensayo.

Siete días de infusión intracerebro-ventricular de dopamina restablecieron la velocidad media y la distancia cubierta, independientemente de las cinco dosis ensayadas en ratones tratados con MPTP. Por el contrario, la actividad locomotora espontánea en ratones tratados con MPTP se restableció solo para 50 mg/kg/día de tratamiento con L-

dopa periférica, mientras que 25 y 100 mg/día no tuvieron efecto (Figura 2).

La potenciación motora descrita en el presente estudio demostró que la dopamina administrada por infusión intraventricular puede penetrar a través del cuerpo estriado e inducir una potenciación motora en modelos de roedores que padecen la enfermedad de Parkinson.

Asimismo, se observó que la dosis mínima eficaz de dopamina anaeróbica es la dosis de 0,06 mg/día, que permitió un restablecimiento significativa y total de la actividad motora normal. También se observó el efecto clásico de la dosis de dopamina de 0,04 (con menor eficacia en la función motora) a 0,12 mg/día (sobredosis sobre la función motora). Esto refleja perfectamente la situación conocida de los pacientes con enfermedad de Parkinson. La dosis más alta, de 0,24 mg/día, se está volviendo menos eficaz como una situación de sobredosis.

Por último, pero no menos importante, se observó un restablecimiento de la actividad motora normal tras siete días de infusión de dopamina intracerebro-ventricular en condiciones anaeróbicas. Al contrario de los estudios previos en los que la dopamina no se administró en condiciones anaeróbicas (Yebenes *et al.*) (16) y en los que la actividad motora disminuyó tras dos o tres días de tratamiento (que es un signo de taquifilaxis), siete días de tratamiento de la invención no inducen taquifilaxis.

EXPERIMENTO 2: La infusión de dopamina cerebral y el tratamiento periférico con L-dopa modificaron diferencialmente el contenido de dopamina, noradrenalina y serotonina en el cuerpo estriado de los ratones

En el siguiente experimento, el uso del término "dopamina" significa "dopamina anaeróbica".

Después de haber mostrado un restablecimiento de los parámetros motores en ratones de MPTP tratados con la solución de la invención, se analizaron las modificaciones de neurotransmisión inducidas por ambos tratamientos; es decir, la solución de la invención y L-Dopa, sobre la estructura cerebral específica, es decir, el cuerpo estriado dorsal.

Como se muestra en la Figura 3, la intoxicación por MPTP indujo una reducción del aproximadamente 85-90 % del contenido de dopamina (también del 70-80 % para DOPAC y del 60-70 % para HVA), del 35-50 % de noradrenalina y del 40-40 % de serotonina (también del 20-50 % de HIA) en cada cuerpo estriado.

La infusión de dopamina cerebral y el tratamiento periférico con L-dopa indujeron modificaciones significativas de los contenidos en el cuerpo estriado de dopamina, noradrenalina y serotonina en ratones de MPTP.

Asimismo, se puede observar un efecto de dosis paralela entre la dosis de dopamina administrada a través de la infusión intracerebro-ventricular y la dosis de la dopamina dentro del cuerpo estriado. Esto muestra que la dopamina puede atravesar la barrera ventricular y alcanzar la zona diana del cuerpo estriado con un efecto de dosis lógico. Hay un efecto máximo alcanzado a los 0,12 mg/día. De hecho, el aumento de la dosis hasta 0,24 mg/día no permitió aumentar la dosis de dopamina. Esto se correlaciona perfectamente con los resultados de la función motora medida por actimetría.

En el lado infundido (cuerpo estriado ipsilateral), la dopamina a 60 y 80 µg/día aumentó el contenido de HVA sin efecto en el contenido en el cuerpo estriado de DA o DOPAC y sin modificación de los sistemas de neurotransmisión de NA o 5HT en comparación con los ratones de MPTP no tratados. Las dosis más altas de dopamina, de 120 y 240 µg/día, fueron capaces de aumentar el contenido de DA y metabolitos, y la dosis de 240 µg/día también aumentó el contenido de HIA y NA (Figura 3, A,C,E).

En el lado no infundido (cuerpo estriado controlateral), la dopamina a 60 y 80 µg/día no tuvo efecto, mientras que las dosis más altas aumentaron los metabolitos de dopamina y serotonina (DOPAC, HVA, HIA) sin efecto sobre NA (Figura 3, B,D,F).

La inyección periférica de 25 mg/día de L-dopa no tuvo ningún efecto sobre la neurotransmisión dopaminérgica, pero indujo un aumento de serotonina y noradrenalina en ambos cuerpos estriados, superando el contenido en el cuerpo estriado de los ratones de control, mientras que las dosis más altas, es decir, de 50 y 100 mg/día, indujeron un aumento significativo de la dopamina y los metabolitos en el cuerpo estriado, sin efecto complementario sobre el contenido de serotonina y noradrenalina (Figura 3 C a F).

Sorprendentemente, la L-dopa periférica y la dopamina central tuvieron efectos opuestos dependientes de la dosis. Las dosis bajas de L-dopa indujeron un aumento en el contenido de NA y 5HT, y solo las dosis más altas fueron capaces de modificar la dopamina, mientras que la infusión central de dopamina indujo primero un aumento de la dopamina, y las dosis más altas aumentaron el contenido de NA y 5HT. En otros lugares, la dopamina central indujo un aumento en la dopamina y los metabolitos, mientras que la L-dopa aumentó primero la dopamina con poco efecto sobre los metabolitos, lo que sugiere que la dopamina también indujo un aumento en el recambio de la dopamina. La L-dopa por vía oral indujo un alto nivel de dopamina extracelular con un menor recambio de dopamina, lo que sugiere un uso insuficiente de dopamina y un riesgo de toxicidad por dopamina. Por el contrario, la dopamina

administrada i.c.v. se usa con un bajo nivel de dopamina extracelular y un menor riesgo de toxicidad relacionada con la administración exógena de dopamina/L-dopa. La toxicidad de la L-dopa también podría ser mayor con respecto al menor nivel de almacenamiento (es decir, el menor nivel de neuronas dopaminérgicas restantes: neuronas TH+).

5 **EXPERIMENTO 3: Determinación del impacto de la infusión de dopamina en las lesiones de las vías nigroestriadas en ratones de MPTP.**

10 Como se muestra en la Figura 4, primero se observa que el modelo de MPTP es eficaz, ya que la administración de MPTP produjo una pérdida del 44,3 % de las neuronas con expresión de TH en la SNpc en comparación con los ratones inyectados con solución salina y una pérdida del 38,2 % de las neuronas con expresión de TH en el cuerpo estriado en comparación con los ratones inyectados con solución salina.

15 De forma interesante, la infusión anaeróbica de dopamina a 60 y 80 µg/día indujo un aumento significativo en las neuronas TH-ir en la SNpc, de respectivamente el 30,65 % y el 25,19 %, en comparación con los ratones tratados con MPTP, mientras que el tratamiento con L-dopa o la difusión de dopamina aeróbica (3 h de aerobia) no tuvo ningún efecto significativo (Figura 4A). Por otra parte, si las condiciones aeróbicas se mantienen durante 12 h, una dosis de 240 µg/día induce la muerte en todos los animales.

20 El efecto neuroprotector observado de la infusión de dopamina anaeróbica intracerebro-ventricular fue sorprendente y reveló una gran ventaja en comparación con la L-dopa periférica o la infusión de dopamina aeróbica intracerebro-ventricular, que no pudieron reproducir este efecto.

25 En el cuerpo estriado, la infusión anaeróbica de dopamina i.c.v. a dosis de 40, 60 y 80 µg/día revierte la pérdida de terminaciones TH-ir en ratones de MPTP, mientras que el tratamiento oral con L-dopa o la difusión de dopamina aeróbica no.

30 Esos resultados proporcionaron evidencia de una recuperación de TH-ir después de la infusión anaeróbica i.c.v. continua de dopamina en el cuerpo estriado, pero también en la SNpc (dependiendo de la dosis administrada), mientras que la infusión continua i.c.v. de dopamina aeróbica o la L-dopa intermitente periférica no. Esta recuperación funcional puede ser representativa de diferentes fenómenos, ya sea el brote sináptico de neuronas dopaminérgicas supervivientes o células locales que cambian hacia un fenotipo dopaminérgico o células recién reclutadas de un nicho de neurogénesis.

35 Se demostró así que se logró un número significativamente mayor de células dopaminérgicas dentro de la sustancia negra con una dosis mínima eficaz de 60 µg/día de dopamina anaeróbica. De forma interesante, el efecto de la dosis en la neuroprotección se correlaciona con los resultados previos sobre la función motora (véase el Experimento 1) y la neurotransmisión nigroestriada dopaminérgica (véase el Experimento 2).

40 Finalmente, se observó un buen índice terapéutico (hasta 6 veces la dosis mínima eficaz), ya que no se observó un empeoramiento de la degeneración. De hecho, el intervalo entre la dosis eficaz más baja y la primera dosis tóxica fue amplio, ya que la dosis de 240 (6 veces la primera dosis eficaz de 40) no fue tóxica.

45 **EXPERIMENTO 4: Evaluación de la dopamina autooxidada relacionada con la dosis en el cuerpo estriado para las diferentes dosis (5-cisteinil dopamina)**

En el siguiente experimento, "dopamina" significa "dopamina anaeróbica".

50 Incluso si el fenotipo TH de las neuronas nigroestriadas no fue alterado, permanece el posible efecto tóxico de un exceso de dopamina extracelular. De hecho, el tratamiento con L-dopa o dopamina ha demostrado ser tóxico para las neuronas supervivientes al causar un estrés oxidativo adicional debido a los productos de autooxidación de mayor contenido de dopamina y su recambio. Tanto la dopamina como su precursor L-dopa pueden autooxidarse produciendo un radical de semiquinona y, posteriormente, una quinona más estable que reaccione con la cisteína, glutatión o cisteína libres que se encuentran en la proteína (Hastings y zigmond, 1994; Pattison *et al.*, 2002) (23,24). La reacción entre la dopamina quinona y la cisteína produce la formación de 5-cisteinil-dopamina, un metabolito oxidativo estable de la dopamina que es tóxico para las células. Esto podría inducir un aumento en las especies oxidativas reactivas que tienen consecuencias perjudiciales para los tejidos.

60 Por lo tanto, se analizó si la infusión de dopamina central indujo la autooxidación de la dopamina a través de la determinación de la concentración del derivado de 5-cisteinil-dopamina en el cuerpo estriado inyectado.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla 1.

65 *Tabla 1: Concentración de 5-cisteinil-dopamina en el cuerpo estriado (los datos se expresan como la media ± ETM. Las dosis de dopamina (DA) se expresan en µg/día. La importancia estadística se evaluó con el análisis de varianza de Kruskal Wallis y la prueba LSD Fisher post-hoc. El umbral significativo se estableció en $p < 0,05$; *frente a solución salina; # frente a MPTP).*

Grupo	Frecuencia (n = 8)	5-cisteinil-dopamina (nmol/mg)
Solución salina	0	0
MPTP	0	0
DA con MPTP a 40	1	0,23
DA con MPTP a 60	3	0,26 ± 0,13
DA con MPTP a 80	5	0,18 ± 0,05
DA con MPTP a 120	6	0,39 ± 0,14*
DA con MPTP a 240	6	0,78 ± 0,15*

Un ligero aumento en la 5-cisteinil-dopamina muestra un ligero aumento en la autooxidación de la dopamina. Sin embargo, como se muestra anteriormente, esta ligera autooxidación no indujo un empeoramiento de la neurodegeneración dentro del cuerpo estriado ni dentro de la sustancia negra, y se observó un efecto neuroprotector.

La coloración de las paredes ventriculares es un buen indicador de la oxidación realizada. Opuesta a las experimentaciones previas realizadas con dopamina sin preparación anaeróbica (Yebeles *et al.*, 1987) (16), la dopamina preparada en anaerobia y preparada con dosis adaptadas indujo una oxidación muy baja de la pared ventricular (es decir, una coloración negra de la pared correspondiente a la oxidación grave).

Solo se observó una coloración marrón muy leve en una parte muy pequeña de la pared ventricular cercana a la cánula de infusión (véase la primera columna de la Tabla: tres ratones de los ocho solo mostraron una ligera coloración parcial marrón). Esto se explica por la ligera autooxidación de la dopamina como se demostró con el aumento paralelo de 5-cisteinil-dopamina.

REFERENCIAS

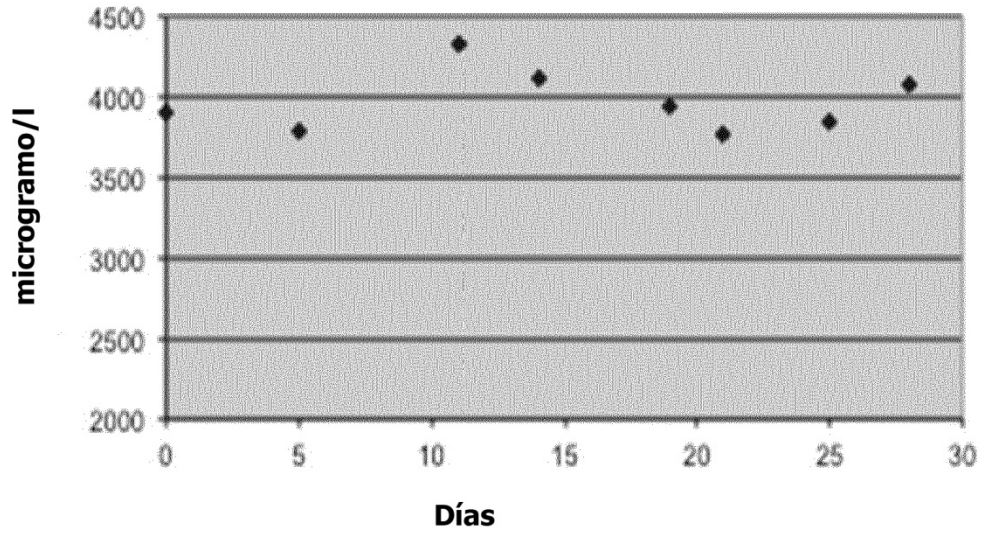
- (1) Chaudhuri KR1, Schapira A. H. "Non-motor symptoms of Parkinson's disease: "dopaminergic pathophysiology and treatment". *Lancet Neurol.* 2009;8:464-74.
- (2) Devos D., Lejeune S., Cormier-Dequaire F., Tahiri K., Charbonnier-Beaupel F., Rouaix N., Duhamel A., Sablonniere B., Bonnet A. M., Bonnet C., Zahr N., Costentin J., Vidailhet M., Corvol J. C. "Dopa-decarboxilase gene polymorphisms affect the motor response to L-dopa in Parkinson's disease". *Parkinsonism Relat Disord.* 2014;20:170-5.
- (3) Miller D. W., Abercrombie E. D.; "Role of high-affinity dopamine uptake and impulse activity in the appearance of extracellular dopamine in striatum after administration of exogenous L-DOPA": "studies in intact and 6-hydroxy-dopamine-treated rats". *J Neurochem.* 1999;72:1516-22.
- (4) Venton B. J., Zhang H., Garris P.A., Phillips P. E., Sulzer D., Wightman R. M. "Real-time decoding of dopamine concentration changes in the caudate-putamen during tonic and phasic firing". *J Neurochem.* 2003;87:1284-95.
- (5) Olanow C. W., Obeso J. A., Stocchi F. "Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson's disease: scientific rationale and clinical implications". *Lancet Neurol.* 2006;5:677-87.
- (6) Fahn S.; "Parkinson Study Group. Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease?" *J Neurol.* 2005;252 Supl 4:IV37-IV42.
- (7) "Parkinson Study Group CALM Cohort Investigators. Long-term effect of initiating pramipexole vs levodopa in early Parkinson disease". *Arch Neurol.* 2009;66:563-70.
- (8) Olanow C. W., Kieburtz K., Odin P., Espay A. J., Standaert D. G., Fernandez H. H., Vanaganas A., Othman A. A., Widnell K. L., Robieson W. Z., Pritchett Y., Chatamra K., Benesh J., Lenz R. A., Antonini A.; "LCIG Horizon Study Group. Continuous intrajejunal infusion of levodopa-carbidopa intestinal gel for patients with advanced Parkinson's disease: a randomised, controlled, double-blind, double-dummy study". *Lancet Neurol.* 2014;13:141-9.
- (9) Devos D.; French DUODOPA Study Group. "Patient profile, indications, efficacy and safety of duodenal levodopa infusion in advanced Parkinson's disease". *Mov Disord.* 2009;24:993-1000.
- (10) Manson A. J., Turner K., Lees A. J. "Apomorphine monotherapy in the treatment of refractory motor complications of Parkinson's disease: long-term follow-up study of 64 patients". *Mov Disord.* 2002;17:1235-41.
- (11) Drapier S., Gillioz A. S., Leray E., Péron J., Rouaud T., Marchand A., Vérin M. "Apomorphine infusion en advanced Parkinson's patients con subthalamic stimulation contraindications". *Parkinsonism Relat Disord.* 2012;18:40-4.
- (12) Syed N., Murphy J., Zimmerman T.Jr, Mark M. H., Sage J. I. "Ten years' experience with enteral levodopa infusions for motor fluctuations in Parkinson's disease". *Mov Disord.* 1998;13:336-8.
- (13) Rascol O., Brooks D. J., Kerczyn A. D., De Deyn P. P., Clarke C. E., Lang A. E., "A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa". *N Engl J Med.* 2000;342:1484-91.

- (14) Stocchi F., Rascol O., Kieburtz K., Poewe W., Jankovic J., Tolosa E., Barone P., Lang A. E., Olanow C. W. "Initiating levodopa/carbidopa therapy with and without entacapone in early Parkinson disease: the STRIDE-PD study". *Ann Neurol.* 2010;68:18-27.
- 5 (15) Sendelbeck S. L. y Urquhart J. "Spatial Distribution of Dopamine, Methotrexate and Antipirine During Continuous Intracerebral Microperfusion". *Brain Research* 1985;328:251-258
- (16) de Yebenes JG1, Fahn S, Lovelle S., Jackson-Lewis V., Jorge P., Mena M. A., Reiriz J., Bustos J. C., Magarinos C., Martinez A." Continuous intracerebroventricular infusion of dopamine and dopamine agonists through a totally implanted drug delivery system in animal models of Parkinson's disease". *Mov Disord.* 1987;2:143-58.
- 10 (17) Akdogan I., Kocamaz E., Kucukatay V., Yonguc N. G., Ozdemir M. B., Murk W. "Hippocampal neuron number loss in rats exposed to ingested sulfite". *Toxicol Ind Health.* 2011;27:771-8.
- (18) Borta A., Hoglinger G. U. "Dopamine and adult neurogenesis". *J Neurochem.* 2007; 100:587-95.
- (19) Cenci M. A., "Lundblad M. Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice". *Curr Protoc Neurosci.* octubre de 2007; Capítulo 9: Unidad 9.25.
- 15 (20) Espadas I., Darmopil S., Vergaño-Vera E., Ortiz O., Oliva I., Vicario-Abejón C., Martín E. D., Moratalla R. "L-DOPA-induced increase in TH-immunoreactive striatal neurons in parkinsonian mice: insights en regulation and function". *Neurobiol Dis.* 2012;48:271-81.
- (21) Fornai F., Battaglia G., Gesi M., Giorgi F. S., Orzi F., Nicoletti F., Ruggieri S. "Time-course and dose-response study on the effects of chronic L-DOPA administration on striatal dopamina levels and dopamina transporter following MPTP toxicity". *Brain Res.* 2000;887:110-7.
- 20 (22) Laloux C., Petrault M., Lecointe C., Devos D., Bordet R. "Differential susceptibility to the PPAR-γ agonist pioglitazone en 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina and 6-hidroxidopamina rodent models of Parkinson's disease". *Pharmacol Res.* 2012;65:514-22.
- (23) Hastings T. G., Zigmond M. J., "Identification of catechol-protein conjugates in neostriatal slices incubated with [3H] dopamine: impact of ascorbic acid and glutathione". *J Neurochem.* 1994;63:1126-32.
- 25 (24) Pattison D. I., Dean R. T., Davies M. J., "Oxidation of DNA, proteins and lipids by DOPA, protein-bound DOPA, and related catechol(amine)s". *Toxicology.* 2002;177:23-37.
- (25) DE YEBENES J. G. *ET AL*: "Continuous intracerebroventricular infusion of dopamine and dopamine agonists through a totally implanted drug delivery system in animal models of Parkinson's disease", *JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION.* SUPLEMENTO, SPRINGER, AUSTRIA, vol. 27, N.º de suplemento, 1 de enero de 30 1988 (01-01-1988), páginas 141-160.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una solución farmacéutica que comprende al menos dopamina para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en el que dicha solución farmacéutica se mantiene en condiciones anaeróbicas desde su formulación hasta su administración.
2. La solución farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la dopamina es clorhidrato de dopamina.
- 10 3. La solución farmacéutica para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la solución farmacéutica está exenta de agente conservante.
- 15 4. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la solución está adaptada para ser administrada en el ventrículo cerebral, preferentemente, en el ventrículo lateral derecho, preferentemente, cerca del foramen interventricular.
5. La solución farmacéutica para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha solución está adaptada para ser administrada con una bomba anaeróbica.
- 20 6. La solución farmacéutica para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha solución se administra de manera continua con variaciones de las dosis.
7. La solución farmacéutica para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha solución se administra con una dosis diurna predominante o con una dosis diurna exclusiva.
- 25 8. La solución farmacéutica para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha solución se administra con la siguiente pauta posológica:
- 30 - una dosis diurna continua y estable,
- un bolo administrado por la mañana y
- opcionalmente, al menos un bolo cuando sea necesario, y/u
- opcionalmente, una dosis nocturna continua y estable más baja que la dosis diurna, preferentemente, al menos un 25 % más baja que la diurna, más preferentemente, al menos un 50 % más baja que la diurna, más preferentemente, al menos un 70 % más baja que la diurna, más preferentemente, al menos un 80 % más baja que la diurna, más preferentemente, al menos un 90 % más baja que la diurna.
- 35

A



B

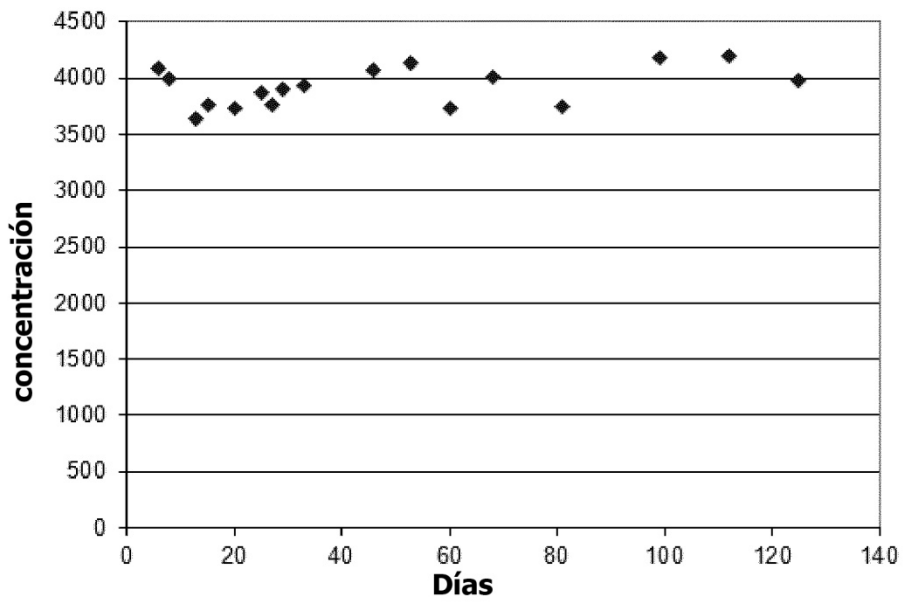


Figura 1

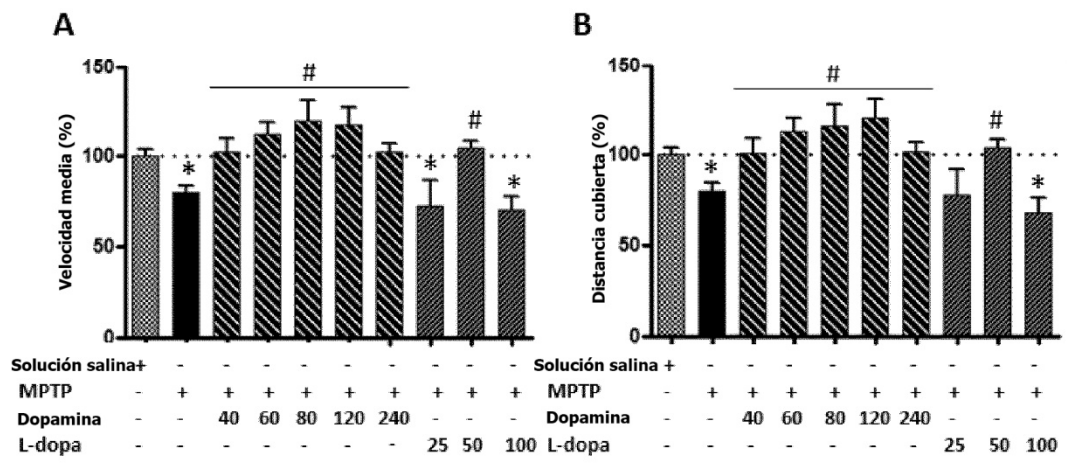


Figura 2

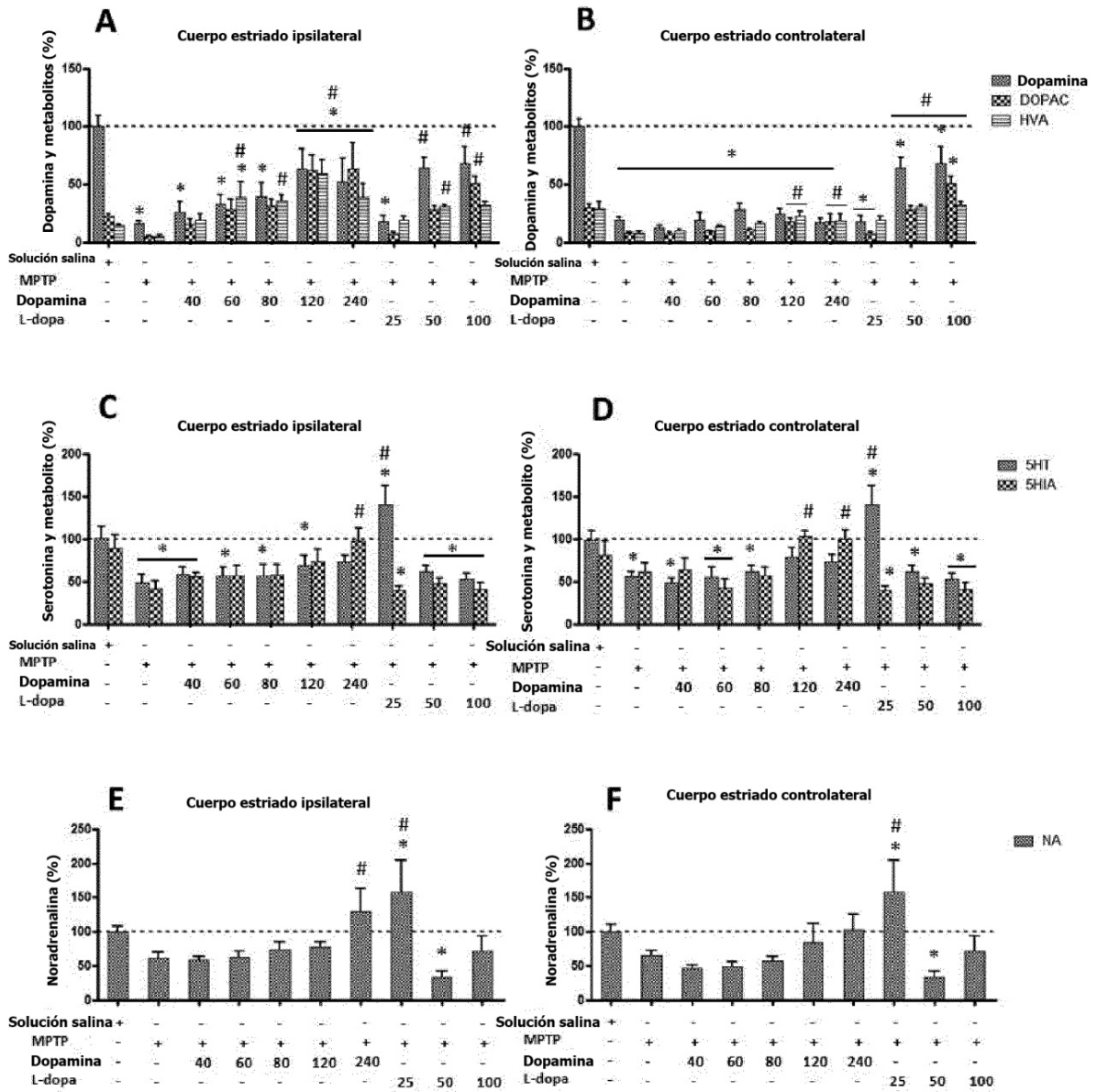
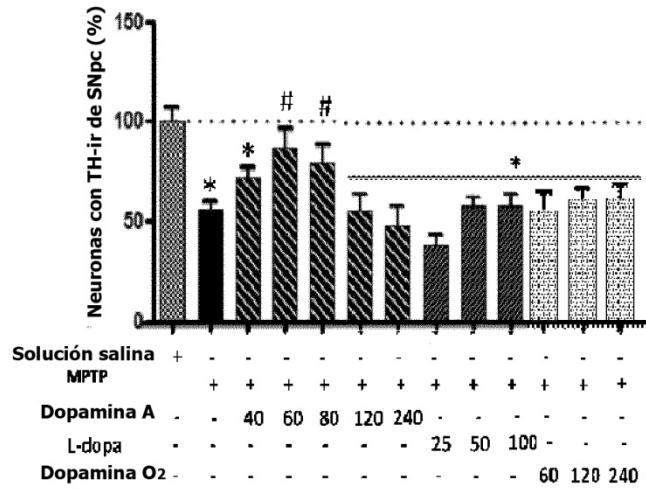


Figura 3

A



B

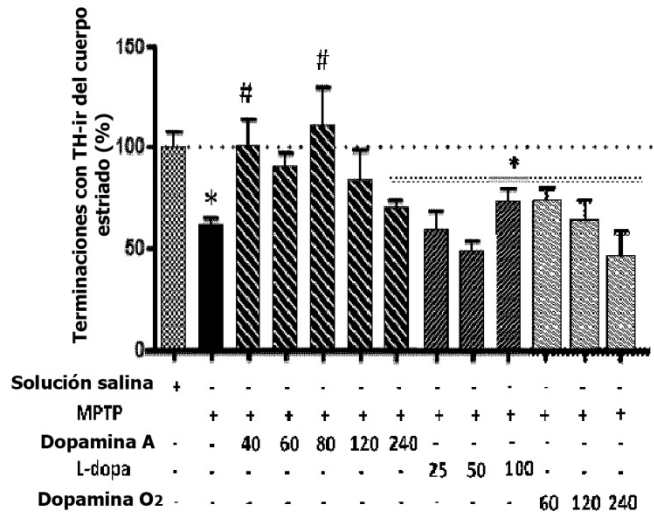


Figura 4