



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 338 970**

② Número de solicitud: 200802281

⑤ Int. Cl.:
A61K 31/095 (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **31.07.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.2010**

Fecha de la concesión: **01.03.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **11.03.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
11.03.2011

⑰ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Ciudad Universitaria
28040 Madrid, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑱ Inventor/es: **Miras Portugal, María Teresa;
Díaz Hernández, Miguel y
Garrido Jurado, Juan José**

⑳ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

㉔ Título: **Uso de antagonistas del receptor P2X7 para favorecer el crecimiento y ramificación axonales.**

㉖ Resumen:

Uso de antagonistas del receptor P2X7 para favorecer el crecimiento y ramificación axonales.

Uso de antagonistas del receptor P2X7, especialmente de BBG, para favorecer el crecimiento y ramificación axonales. La presente invención se refiere al uso de antagonistas del receptor P2X7 capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, y vehículos farmacéuticamente aceptables, para fabricar medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades o estados asociados con: a) ausencia o reducción de crecimiento axonal; b) pérdida de colaterales axonales; c) lesión nerviosa; d) pérdida o degeneración de las conexiones sinápticas.

Asimismo, se describe el uso de los citados antagonistas para potenciar el crecimiento axonal, tanto en neuronas en cultivo, como en neuronas trasplantadas.

ES 2 338 970 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso de antagonistas del receptor P2X7 para favorecer el crecimiento y ramificación axonales.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de las enfermedades neurodegenerativas y lesiones nerviosas relacionadas con alteraciones del crecimiento axonal, colaterales axonales y/o conexiones sinápticas. Concretamente, la invención describe el uso de antagonistas del receptor P2X7 capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, y vehículos farmacéuticamente aceptables, para la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas destinados al tratamiento de dichas enfermedades y lesiones.

Otro uso de los citados antagonistas está relacionado con la potenciación del crecimiento axonal a partir de neuronas en cultivo, así como de neuronas trasplantadas. También se detalla un método de obtención de cultivos de neuronas diferenciadas a partir de células madre, a través del cultivo de las mismas con un antagonista de P2X7. Los cultivos así obtenidos se pueden usar para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de las enfermedades o lesiones descritos anteriormente.

20 **Estado de la técnica**

La formación de circuitos neuronales depende inicialmente del establecimiento de dominios especializados en la neurona, axón y dendritas. El primer suceso en la diferenciación neuronal es la formación y crecimiento de un axón, que permite la transferencia vectorial de información entre las neuronas. El crecimiento axonal requiere la reorganización coordinada del citoesqueleto de microtúbulos y microfilamentos, a través de cascadas de señalización específicas.

La formación y crecimiento del axón están regulados positivamente mediante diferentes señales extracelulares, como factores neurotróficos, neurotransmisores y otras moléculas de señalización. Se ha implicado en la formación y crecimiento del axón a diferentes proteínas en diferentes vías, incluyendo PI3-quinasa, Akt (proteína-quinasa de GSK3), GSK3 (glucógeno-sintetasa-quinasa 3), JNK, ξ PKC, mPar3/6, rap1B o LKB1. La coordinación de esta maquinaria controla la dinámica del citoesqueleto, regulando la polimerización y despolimerización de microtúbulos y microfilamentos. Estos procedimientos, no sólo facilitan el crecimiento axonal, sino que son importantes también para la localización de los receptores de membrana en puntos específicos a lo largo del axón. Aunque se ha estudiado extensivamente el papel de los receptores de factores neurotróficos en el desarrollo del axón, se ha prestado poca atención a la influencia de los receptores purinérgicos en el desarrollo y crecimiento axonales.

Las purinas actúan como neurotransmisores y moduladores en el sistema nervioso central y periférico, pero las purinas extracelulares también realizan un papel trófico directo en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso y en su respuesta a enfermedades y lesiones. Una de tales purinas, el ATP, se comporta como un neurotransmisor rápido en el sistema nervioso central, actuando sobre los canales catiónicos activados por ligando, conocidos como receptores P2X (P2XRs). Estos receptores son capaces de incrementar transitoriamente la concentración de Ca^{2+} intracelular interviniendo en su entrada, independientemente de la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El flujo de calcio y las elevaciones transitorias de su concentración en los conos de crecimiento regulan la velocidad de desarrollo axonal. La supresión de las elevaciones transitorias de Ca^{2+} acelera la extensión del axón, mientras que el flujo de calcio retarda el crecimiento axonal que, de lo contrario, sería rápido. Los P2XR se pueden formar mediante la combinación homomérica y heteromérica de siete subunidades diferentes, P2X₁₋₇, y están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (CNS) de los mamíferos. En el hipocampo, el P2XR modula la liberación de neurotransmisores, facilita la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP), y también interacciona con otros receptores de membrana. Es más, hay evidencias de que los P2XRs podrían tomar parte en la formación de redes neuronales durante el desarrollo del hipocampo, postulando un papel trófico en la señalización purinérgica. Sin embargo, se sabe poco acerca de la participación de los receptores P2X en la regulación del crecimiento axonal y las cascadas de señalización reguladas por esos receptores en las neuronas, durante la diferenciación neuronal.

Se ha demostrado que diversos factores y receptores inducen el crecimiento y desarrollo del axón y el establecimiento de conexiones sinápticas, a través de diferentes vías. Sin embargo, el establecimiento correcto de circuitos neuronales también precisa mecanismos que controlen negativamente el crecimiento axonal, como sucede durante la orientación axonal. Se ha demostrado que diferentes proteínas secretadas y de la matriz extracelular, como las semaforinas y efrinas, están implicadas en la regulación negativa del crecimiento axonal. Sin embargo, no se sabe si otros receptores de membrana, factores o moléculas podrían actuar también como mediadores en este control negativo. En la presente invención, se demuestra que el receptor purinérgico P2X7, activado por ATP, juega un papel importante en el control negativo del crecimiento axonal en neuronas del hipocampo en cultivo. El efecto negativo del ATP en la neuritogénesis se ha descrito previamente en cultivos de explantes del tubo neural y en neuronas del ganglio espiral, a través de los receptores P2X2 y P2X3. En algunos estudios, se han identificado mRNAs de P2X7R. Otros estudios han localizado P2X7R en terminales presinápticos de neuronas del hipocampo en el SNC, principalmente en el hipocampo. Asimismo, uno de los autores de la presente invención ha localizado P2X7R en los terminales presinápticos de células granulares del cerebelo. A pesar de la localización de P2X7R en los conos de crecimiento axonal (terminales presinápticos) y su relación con la modulación de la liberación de neurotransmisor, no se ha estudiado aún la función de este receptor durante el desarrollo axonal y regeneración de neuronas.

El artículo Sperl gh B ata *et al.*, *P2X7 receptors in the nervous system*, *Progress in Neurobiol.* 78 (2006), 327-346, se refiere al papel de los receptores P2X7 en la modulación de la liberación de neurotransmisores y a su influencia en la función neuronal presináptica. También se indica la inhibición de este efecto por antagonistas de P2X7, como BBG y oxo-ATP. Se analiza también su potencial terapéutico en determinadas enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, a diferencia de los hallazgos de la presente invención, el efecto aquí se basa en la acción sobre la liberación de GABA y glutamato. De hecho, en el punto 6 del propio artículo, se indica que la localización en hipocampo de dichos receptores P2X7 es aún incierta y que los astrocitos de la glía podían contribuir a la liberación de neurotransmisor en la que los P2X7R actúan como mediadores. Por tanto, según se indica en las conclusiones de este artículo, las funciones de los receptores P2X7 se refieren a su efecto sobre la neurotransmisión en neuronas; a la activación de receptores P2X7 en microglía y astrog a, relacionados con las citoquinas y la vía inflamatoria; y a la producción de una señal de muerte celular de las células que los expresan. En ningún momento se menciona el efecto del P2X7 sobre el crecimiento axonal y las aplicaciones terapéuticas de los antagonistas son totalmente diferentes de las descritas en la presente invención.

El artículo Jun, D-J. *et al.*, *Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors*, *The J. of Biol. Chem.*, 2007.12.28, 282 (52), 37350-37358 se refiere al hecho de que en células SN4741 de la *substantia nigra*, tanto la inflamación producida por el ATP como la apoptosis, son revertidas mediante pretratamiento con KN-62 (antagonista de P2X7R) o por inhibición de la expresión de P2X7R con siRNAs. Nuevamente este efecto se refiere a la activación de la apoptosis por P2X7R, y no se relaciona con su efecto sobre la elongación axonal.

Asimismo, el documento EP1469072, se refiere al diagnóstico de alteraciones afectivas mediante secuencias génicas que codifican P2X7R alterados. También se hace referencia a la utilización de moduladores de la actividad de la proteína P2X7R para el tratamiento de dichas alteraciones. Se cita una variedad muy amplia de moduladores muy diferentes en cuanto a su estructura que se han escogido al azar porque afectan a P2X7R, pero no se sabe qué efecto producen, ni se indica que ninguno de ellos presente ventajas concretas. Los únicos efectos conocidos que se citan son, nuevamente, de tipo inflamatorio, a través de la IL-1 .

El documento WO2005041892, se refiere a un método de tratamiento de lesiones de la médula espinal utilizando antagonistas de receptores purinérgicos. En las lesiones de la médula espinal, además de la lesión primaria, se produce en los días sucesivos una lesión denominada secundaria que incrementa la extensión de las lesiones de la médula, aunque sus mecanismos son bastante desconocidos. Principalmente se produce la liberación excesiva de neurotransmisores, que pueden producir daños al sobreestimar las células nerviosas, entre ellos el glutamato. Cuando se lesiona la médula espinal, las neuronas inundan el área con glutamato, que desencadena un proceso de excitotoxicidad, originando la muerte de neuronas y oligodendrocitos. Adicionalmente, al romperse la barrera hematoencefálica, las células del sistema inmunológico penetran en el cerebro o la médula espinal, desencadenando una respuesta inflamatoria. Esta respuesta origina la liberación de citoquinas, que ejercen una influencia maligna en las actividades de las células nerviosas. Por ejemplo, las células microgliales empiezan a producir citoquinas proinflamatorias que estimulan y activan otras microglías. La lesión también estimula a los astrocitos en reposo a producir citoquinas. Estos astrocitos reactivos pueden, en última instancia, participar en la formación de tejido cicatricial en el interior de la médula espinal, actuando como barrera para la regeneración axonal. La respuesta inmunológica provoca también la sobreproducción de radicales libres, que alteran la respuesta celular al crecimiento y a los factores de supervivencia, y convierten esos factores en agentes destructores. Regiones amplias de la zona peritraum tica se caracterizan por una liberación elevada, patológica, de ATP. Los astrocitos liberan ATP a través de una vía regulada, produciendo la propagación de ondas intracelulares de entrada de calcio al citosol. A su vez, las señales de calcio astroc ticas se transmiten a las neuronas adyacentes, modulando así su potencia sin ptica. Las neuronas de la médula espinal expresan receptores purinérgicos P2X7, y su exposición al ATP conduce a incrementos irreversibles en la concentración de Ca²⁺ y a la muerte celular. Todos estos mecanismos relativos al daño secundario: excitotoxicidad, inflamación, liberación de radicales libres y apoptosis, aumentan el tamaño del área afectada por la lesión de la médula espinal. Las células gliales se agrupan para formar cicatriz, que crea una barrera para cualquier axón que podría potencialmente regenerarse y reconectarse. El efecto aquí descrito se basa en la inhibición de la apoptosis de células medulares o cerebrales, desencadenada por el ATP. Por tanto, este tratamiento está encaminado a paliar los efectos de la lesión medular denominada secundaria y no tiene relación alguna con el deterioro de los axones producido en este tipo de lesiones. El efecto se basa nuevamente en la vía glial e inflamatoria y no actúa directamente sobre el daño originado en los axones, ni produce la regeneración de los mismos, sino que se centra en paliar los efectos asociados a la lesión, principalmente la apoptosis.

Por tanto, a diferencia del estado de la técnica conocido, la presente invención muestra que la inhibición de P2X7R a nivel del hipocampo induce la elongación y ramificación de los axones de neuronas en esta zona. Este efecto, totalmente novedoso, se ha observado gracias a una técnica de cultivo de neuronas a baja densidad, que hace que las neuronas se comporten de forma análoga a las del tejido nervioso en desarrollo, observándose claramente el crecimiento axonal. Además, se ha comprobado que dicha inhibición produce la inhibición de la enzima GSK3, tanto en neuronas en cultivo como en cerebro de ratones adultos. La relación entre P2X7R y GSK3 había sido propuesta ya en astrocitos y células gliales (Neary, J. y Kang, Y., *P2 purigenic receptors signal to glycogen synthase kinase-3  in astrocytes*, 2006.08.15, *J. of Neurosc. Res.*, 84(3), 515-524. Sin embargo, de forma novedosa y sorprendente, en la presente invención se demuestra que la relación en neuronas es exactamente la contraria a la detectada en astrocitos y células gliales: mientras que en astrocitos y células gliales la inhibición de P2X7R produce la activación de GSK3, en neuronas cerebrales da lugar a la inactivación de GSK3. Consecuentemente, los antagonistas de P2X7R podrían utilizarse para inducir neuroregeneraci n, en todas aquellas enfermedades o situaciones en las que se produce pérdida

de neuronas, pues la elongación y ramificación de los axones permitiría una multiplicación de las conexiones que permitiría una mejora del estado del individuo.

Particularmente, se cree que el incremento de la actividad de GSK3 juega un papel importante en trastornos degenerativos como la enfermedad de Alzheimer y los trastornos bipolares. El desarrollo de antagonistas directos de GSK3 es un campo muy activo en la actualidad por su posible utilidad para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o los trastornos bipolares. Sin embargo, la utilización de antagonistas directos de GSK3 presenta una serie de desventajas importantes:

- a) GSK3 es una quinasa implicada en vías de supervivencia cuyos niveles tienen que estar muy bien controlados en un individuo: incrementar su actividad por encima de ciertos niveles puede significar la muerte; inhibirla excesivamente, también.
- b) GSK3 está presente en muchas ubicaciones diferentes. Sus antagonistas directos actuarían en todas esas ubicaciones, produciendo efectos secundarios indeseables en las mismas.

El receptor P2X7R, en cambio, se localiza en el sistema nervioso central, siendo muy abundante en la corteza cerebral y en el hipocampo. Por ello, los citados antagonistas de P2X7R podrían utilizarse para la preparación de medicamentos destinados a tratar las citadas enfermedades. Así, la presente invención supera las desventajas descritas mediante el uso de antagonistas específicos de P2X7R que atraviesan la barrera hematoencefálica (BBG, KN-62), que permiten limitar la inhibición de GSK3 al hipocampo y la corteza, y en concreto a la región terminal de los axones. Además, la inhibición a través de P2X7R permite un control mucho más fino del grado de inhibición necesaria para el tratamiento de las enfermedades descritas. Adicionalmente, la utilización de estos antagonistas permite la utilización de vías de administración que no implican necesariamente la administración directa al sistema nervioso central, sino que se pueden utilizar vías de administración menos peligrosas, como la intraperitoneal o intravenosa.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere al uso de antagonistas del receptor P2X7 capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, y vehículos farmacéuticamente aceptables, para fabricar medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades o estados asociados con: a) ausencia o reducción de crecimiento axonal; b) pérdida de colaterales axonales; c) lesión nerviosa; d) pérdida o degeneración de las conexiones sinápticas. También se describen las composiciones farmacéuticas que utilizan dichos antagonistas. Concretamente, un aspecto de la presente invención se refiere al uso del antagonista de P2X7 Brilliant Blue G para la elaboración de los medicamentos descritos.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de los citados antagonistas para potenciar el crecimiento axonal, tanto en neuronas en cultivo, como en neuronas trasplantadas.

Descripción detallada de la invención

Durante el establecimiento de los circuitos neuronales, las neuronas desarrollan sus axones hacia sus regiones diana, como respuesta tanto a estímulos positivos, como negativos. Estudios recientes demuestran que las corrientes transitorias de calcio en el cono de crecimiento regulan negativamente el crecimiento axonal. La presente invención se basa en el estudio del papel de los receptores de ATP ionotrópicos (P2X) en la regulación del crecimiento axonal. Los resultados obtenidos demuestran que el ATP exógeno añadido induce corrientes transitorias de calcio en la región distal del axón, en neuronas del hipocampo en cultivo, y una inhibición simultánea del crecimiento axonal. En este efecto actúan como mediadores los receptores P2X7 (P2X7R), que se han identificado en los conos de crecimiento axonal y actúan como mediadores del influjo de calcio en la región distal de los axones. La inhibición farmacológica de P2X7R o su supresión mediante interferencia de shRNA induce axones más largos y ramificados, junto con cambios morfológicos en los conos de crecimiento axonal. Con respecto a la vía de señalización que favorece este crecimiento axonal incrementado, los experimentos aquí descritos demuestran que la inhibición de P2X7R incrementa la actividad de FAK, la activación de la PI3-quinasa y la modificación de sus dianas posteriores en la vía de señalización, Akt y GSK3. Por tanto, los resultados obtenidos demuestran que, cuando los receptores P2X7 se inactivan, los axones crecen a mayor velocidad y forman más ramificaciones en neuronas del hipocampo en cultivo, lo cual es indicativo del papel negativo del ATP en el crecimiento axonal y del potencial terapéutico de los antagonistas de P2X7R para favorecer la regeneración axonal. Los resultados de la invención demuestran que el ATP disminuye la longitud axonal e incrementa las concentraciones de calcio, lo cual se puede evitar mediante adición de BBG, un antagonista específico de P2X7R. Estos resultados apuntan a una función de P2X7R en el control negativo del crecimiento axonal. Adicionalmente, los resultados de la invención muestran, por vez primera, que la inhibición de los receptores P2X7 o su bloqueo mediante shRNAs, permite a las neuronas del hipocampo desarrollar axones más largos con múltiples ramificaciones, lo que sugiere una relación entre P2X7R y la dinámica del citoesqueleto.

La inhibición de P2X7R también se ha relacionado con el mantenimiento de las sinapsis neuromusculares. De hecho, en la presente invención se observó que la morfología del cono de crecimiento axonal se modificaba cuando se inhibía P2X7R, cambiando de lamelipódica a filopódica (véanse Ej:6 y Fig. 6). De acuerdo con estos cambios morfológicos observados en el modelo de neuronas del hipocampo en cultivo de la invención, el influjo de calcio sólo se producía en el cono de crecimiento axonal, asociado con la expresión de P2X7Rs en la región de la actina y en el dominio de microtúbulos más distal. Estas regiones son las más dinámicas en términos de desarrollo axonal y

despolimerización de actina, lo cual permite el crecimiento de los microtúbulos. Por tanto, la expresión de P2X7R y su activación en el cono de crecimiento axonal podría actuar como mediador en la polimerización de actina local, y reprimir el crecimiento axonal. En efecto, ya se había observado que los receptores P2X7 precipitan conjuntamente con proteínas asociadas al citoesqueleto de actina y que la activación de P2XR por ATP inducía la formación de bastones de cofilina y la retracción de neuritas en células PC12. Por tanto, los resultados descritos muestran que P2X7R participa en el control negativo del crecimiento axonal, como se demuestra mediante el uso de los antagonistas de P2X7R y shRNAs de P2X7R. La inhibición o supresión de estos receptores podría despolimerizar la actina y permitir el crecimiento axonal, así como la formación de múltiples terminales axonales.

A continuación, se investigó la vía por la que la inhibición de P2X7R incrementaba el crecimiento axonal. P2X7R funciona como canal de calcio en respuesta a ATP. Por tanto, un posible candidato que podría estar implicado en la cascada de señalización de P2X7R era la proteína quinasa II dependiente de calcio-calmodulina (CAMKII). Se ha demostrado que CAMKII se fosforila por activación de los receptores de P2X7 en células granulares cerebelares. Además, la activación de CAMKII incrementa la localización en membrana de otros receptores P2X (P2X3) y da lugar a la potenciación de respuestas de ATP. Los datos de la presente invención muestran que la inhibición de P2X7R reduce la cantidad de CAMKII fosforilada en los conos de crecimiento axonales. Esta reducción de CAMKII en los conos de crecimiento axonales podría estar relacionada con las modificaciones morfológicas en los mismos. De hecho, CAMKII β puede empaquetar y reticular filamentos de F-actina y se disocia de F-actina tras estimulación con Ca²⁺/calmodulina. Se ha observado previamente que, en las neuronas P19, la inhibición de CAMKII induce una reorganización de F-actina, presentando también conos de crecimiento con una estructura filopódica.

Los datos mencionados anteriormente y nuestros resultados sugieren que P2X7R podrían regular, a través de CAMKII, proteínas asociadas a actina. Una de ellas, la quinasa de adhesión focal (FAK), se ha sugerido que juega un papel crucial en la dinámica celular, controlando el proceso de ramificación y crecimiento axonal en neuronas del hipocampo. Los resultados de la invención demuestran que el BBG incrementa la fosforilación de FAK en la tirosina 397, activando así FAK. Esta autofosforilación de FAK se podría explicar por la fosforilación reducida de CAMKII, inducida a su vez por la inhibición de P2X7R. Por tanto, los cambios en la morfología de los conos de crecimiento axonal en respuesta a BBG observados en nuestros experimentos, se deben al influjo reducido de calcio a través de los receptores P2X7.

Los agonistas de P2X7R, como Bz-ATP, pueden inducir la reorganización de actina en macrófagos cuando Rho está activa. En neuronas, el crecimiento axonal está relacionado con la inactivación de Rho, lo cual estaría de acuerdo con la inactivación de los P2X7R mostrada en la invención. La actividad de Rho puede estar regulada, a su vez, entre otras señales, por la PI3-quinasa. Los resultados de la invención demuestran que la inhibición de la actividad de la PI3-quinasa anula el efecto de los antagonistas de P2X7R en el crecimiento axonal. Por tanto, la inhibición de los receptores P2X7 induce la activación de FAK y regula la actividad de la PI3-quinasa, favoreciendo el crecimiento axonal.

Estos antagonistas inducen la fosforilación de dianas de la PI3-quinasa, como Akt y GSK3, posteriores en la vía de señalización. GSK3 es uno de los principales reguladores de la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos. Cuando se analizó GSK3 en neuronas de hipocampo en cultivo o ratones tratados con BBG, se observó que aumentaba la fosforilación de GSK3 en las serinas 9/21. De hecho, la disminución de la actividad de GSK3 se confirmó mediante el incremento de Tau desfosforilada (Tau-1). Tau-1 está asociada con la estabilización de los microtúbulos y su acumulación reflejaría una mayor superficie axonal y más contactos sinápticos. Esto podría explicar el crecimiento y la ramificación axonales observados en neuronas cuando se inhiben los P2X7Rs, y está en consonancia con que la inhibición o la inhibición parcial de GSK3 induzcan ramificación axonal una vez que una neurona ha comenzado a hacer crecer un axón. Es más, la inhibición de GSK3 o el uso de siRNAs contra GSK3 reduce los niveles de expresión de FAK en células HeLa. Esta relación entre GSK3 y FAK, ambas reguladas por P2X7R, sugiere que el ATP dispara los mecanismos implicados en el control negativo del crecimiento y la ramificación axonales.

En términos de cómo GSK3 podría estar regulada por los P2X7Rs, una de las quinasas mejor conocidas que fosforila a GSK3 es Akt, que se activa cuando es fosforilada por la PI3-quinasa. En astrocitos, BzATP induce la fosforilación de Akt a través de los receptores P2X, y la subsiguiente fosforilación de GSK3. Sin embargo, nuestros resultados muestran que, en las neuronas de hipocampo en cultivo tratadas con BzATP, la fosforilación de Akt disminuye de forma transitoria. El efecto opuesto se observa en las neuronas tratadas con antagonistas del P2X7R, en consonancia con el incremento en la fosforilación de GSK3 en los ratones tratados con antagonistas de P2X7R. Aunque no hay incremento en la Akt activa en los ratones tratados durante cuatro meses, es posible que la presencia de células de glía en los extractos cerebrales de hipocampo pueda compensar el efecto observado en las neuronas. El menor incremento en la fosforilación de Akt observado en las neuronas en cultivo tratadas con BBG podría explicar la formación de axones colaterales y el incremento en la longitud de axón, puesto que la Akt fosforilada es una proteína que está presente en el cono de crecimiento del axón, y está relacionada con la formación y la elongación del axón.

A partir de los resultados de este estudio es evidente que P2X7R regula rutas implicadas en el desarrollo del axón y que la actividad de GSK3 es un colaborador importante en estas rutas. Hay que señalar que se cree que el incremento en la actividad de GSK3 juega un papel clave en trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer (AD) y los trastornos bipolares. En la AD, se ha demostrado que GSK3 fosforila tau en la mayor parte de los residuos de serina y treonina que están hiperfosforilados en los filamentos helicoidales apareados (PHF)-tau y que se acumula en el citoplasma de las neuronas en las que se están preformando los ovillos. Basándose en las evidencias

que relacionan el incremento en la actividad de GSK3 y la patogénesis de la AD, se estudiaron también antagonistas de GSK3 a la vista de su potencial terapéutico en la AD.

En conclusión, se demuestra aquí que, en las neuronas, los P2X7Rs actúan negativamente, regulando el crecimiento del axón y controlando los axones colaterales. Este efecto puede tener muchas implicaciones, desde el control de la orientación axonal al número de contactos sinápticos establecidos por la neurona. Los receptores P2X7 podrían actuar como un sensor de regiones de muerte celular, evitando el crecimiento y establecimiento de conexiones sinápticas en las regiones en las que hay una mayor concentración de ATP extracelular, producido por ruptura celular. Esta idea se soporta mediante la demostración de que la inhibición de los receptores P2X7 induce el crecimiento y ramificación axonales en neuronas del hipocampo en cultivo. Estas alteraciones morfológicas se observaron también cuando se inhibía la expresión de P2X7R en neuronas del hipocampo, confirmando el efecto específico del antagonista de P2X7R, BBG. Todos estos resultados indican que la inhibición de P2X7R se podría considerar como una herramienta farmacológica para recuperar circuitos neuronales disfuncionales en trastornos que cursan con estos eventos, así como para mejorar el crecimiento y regeneración de axones lesionados.

En relación con estos hallazgos, la presente invención se refiere al uso de antagonistas del receptor P2X7 capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, y vehículos farmacéuticamente aceptables, para fabricar medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades o estados asociados con: a) ausencia o reducción de crecimiento axonal; b) pérdida de colaterales axonales; c) lesión nerviosa; d) pérdida o degeneración de las conexiones sinápticas. Concretamente una realización de la invención se refiere al uso del BBG para la fabricación de los citados medicamentos.

Según se indicó anteriormente, la utilización de antagonistas directos de GSK3 presenta una serie de desventajas importantes que son superadas en la invención mediante el uso de antagonistas específicos de P2X7R que atraviesan la barrera hematoencefálica, y permiten limitar la inhibición de GSK3 al hipocampo y la corteza. Además, la inhibición a través de P2X7R permite un control mucho más fino del grado de inhibición necesaria para el tratamiento de las enfermedades descritas. Por tanto, se prefieren aquellos usos en los que el antagonista se administra en una cantidad de 45,5 mg/kg, suficiente para inhibir la enzima GSK3.

Aunque los experimentos de la presente invención se realizaron con BBG, los datos experimentales constituyen una evidencia clara de que cualquier otro antagonista de P2X7 que atraviese la barrera hematoencefálica, produciría efectos similares. Otros ejemplos de dichos antagonistas serían el decavanadato ($[V_{10}O_{28}]_{6-}$) o el KN-62 (1-[N,O-bis-(5-isoquinolin-sulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenil-piperazina). Los antagonistas cuyo uso se prefiere son Brilliant Blue G (BBG) o KN-62.

Adicionalmente, la utilización de estos antagonistas permite la utilización de vías de administración que no impliquen necesariamente la administración directa al sistema nervioso central, sino que se pueden utilizar vías de administración más sencillas, como la intraperitoneal o intravenosa. Estas vías constituyen, pues, realizaciones preferidas.

En el contexto de la presente invención, se entiende como "lesión nerviosa" cualquier lesión del nervio parcial o completa con disrupción total o parcial del axón y/o su vaina de mielina, como consecuencia de una contusión, traumatismo o isquemia.

En cuanto a las enfermedades o estados a los que están destinados los antagonistas de la presente invención, se incluyen primeramente las lesiones de la médula espinal y las mielopatías, que son alteraciones de la médula espinal que pueden provocar una pérdida de sensibilidad y/o movilidad. Las dos causas principales de lesión medular son por traumatismos (accidentes de coche, caídas, disparos, etc.) o enfermedades (poliomielitis, espina bífida, tumores, ataxia de Friedreich, etc.). En estas lesiones se produce una disfunción de los axones que, al perder su cubierta de mielina, quedan con una capacidad disminuida de conducir los impulsos eléctricos esenciales para la comunicación axonal. La estimulación para regenerar los axones es un componente fundamental de la reparación de la médula espinal porque cada axón de la médula espinal lesionada que pueda ser reconectado aumenta las posibilidades de recuperar las funciones del cuerpo. Las neuronas del SNC tienen capacidad regeneradora, pero el ambiente dentro de la médula espinal adulta no facilita el crecimiento, principalmente debido a que las proteínas inhibitorias del crecimiento están incrustadas en la mielina. Estas proteínas parecen conservar los circuitos neurales en la médula espinal sana y evitan que los axones intactos crezcan en forma inadecuada, pero cuando la médula espinal se lesiona, estas proteínas impiden la regeneración. El bloqueo, a través de antagonistas, del receptor P2X7, favorece la regeneración axonal y, por tanto, la reparación de este tipo de lesiones.

Otro tipo de enfermedades a las que se pueden aplicar las enseñanzas de la presente invención, son las relacionadas con la pérdida de conexiones sinápticas que, según se ha descrito anteriormente, también se recuperan mediante el uso de los antagonistas de P2X7 descritos. Dentro de este grupo, se prefiere concretamente la enfermedad de Alzheimer que, según se ha detallado más arriba, está directamente relacionada con el incremento de la actividad de GSK3. La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa, que se manifiesta como deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza en su forma típica por una pérdida progresiva de la memoria o de otras capacidades mentales, a medida que las neuronas mueren y diferentes zonas del cerebro se atrofian. En la enfermedad de Alzheimer se produce específicamente una pérdida de neuronas del hipocampo, que se puede subsanar en cierta medida mediante el incremento de colaterales axonales producido por los antagonistas de P2X7 de la invención, que originan un incremento de conexiones sinápticas, supliendo, al menos en parte, la pérdida de neuronas en esta zona.

También dentro de esta categoría de enfermedades que cursan con pérdida de conexiones sinápticas, se prefiere la realización relativa a la isquemia cerebral. La isquemia cerebral se produce por una pérdida de oxígeno y nutrientes en las células cerebrales, cuando no existe un flujo sanguíneo adecuado. La isquemia conduce al infarto o muerte de células cerebrales, que con el tiempo son sustituidas por una cavidad llena de fluido en el cerebro. En la periferia del núcleo isquémico se produce una zona de penumbra isquémica, en la que se mantiene la viabilidad, debido a la eficacia de la circulación colateral. En esta zona, la actividad eléctrica se encuentra disminuida, pero la integridad estructural se mantiene durante un tiempo. La utilización de antagonistas de P2X7R permitiría recuperar la funcionalidad de las conexiones sinápticas en estos casos.

En relación con el hallazgo de la invención relativo al papel del P2X7R en la formación de las sinapsis neuromusculares, un uso adicional de la invención establece la aplicación de los antagonistas de P2X7R de la invención para el tratamiento de patologías motoras relacionadas con la pérdida de conexión entre neuronas y músculos y, preferiblemente, la esclerosis lateral amiotrófica, la miastenia gravis o la pérdida de inervación producida por intoxicación con toxina botulínica.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad degenerativa neuromuscular, por la cual las motoneuronas disminuyen gradualmente su funcionamiento y mueren, provocando una parálisis muscular progresiva, con exaltación de los reflejos tendinosos. Se produce una pérdida de fibras nerviosas acompañada de una cicatrización glial en la zona lateral de la médula espinal, región ocupada por axones nerviosos que son los responsables del control de los movimientos voluntarios. El restablecimiento de la sinapsis neuromuscular y de la funcionalidad de los axones en estas zonas, podría paliar los síntomas de la enfermedad.

La miastenia gravis (MG) es una enfermedad neuromuscular autoinmunitaria y crónica caracterizada por grados variables de debilidad de los músculos esqueléticos (voluntarios) del cuerpo. La miastenia gravis se produce por un defecto en la transmisión de los impulsos nerviosos a los músculos cuando la comunicación normal entre el nervio y el músculo se interrumpe en la unión neuromuscular. Normalmente, cuando los impulsos recorren el nervio, las terminaciones nerviosas secretan acetilcolina. La acetilcolina se desplaza a través de la sinapsis neuromuscular y se adhiere a los receptores de acetilcolina, en la membrana post-sináptica. Los receptores se activan y generan una contracción del músculo. En la miastenia gravis, los anticuerpos bloquean, alteran, o destruyen los receptores de acetilcolina en la unión neuromuscular, lo cual evita que ocurra la contracción muscular. Estos anticuerpos son producidos por el propio sistema inmunológico del cuerpo. La miastenia gravis es, por lo tanto, una enfermedad autoinmunitaria.

La intoxicación por toxina botulínica, o botulismo, actúa sobre la terminación nerviosa presináptica impidiendo la acción de los iones de calcio en el proceso de exocitosis necesario para la liberación de acetilcolina, disminuyendo de esta forma el potencial de placa y causando parálisis muscular. El resultado es una denervación funcional transitoria que causa parálisis, atrofia muscular y anomalías electromiográficas. El desarrollo de nuevos axones funcionales mediante el empleo de los antagonistas de P2X7R de la invención permitiría recuperar la funcionalidad en estas zonas.

Por último, otra categoría de enfermedades a las que se aplican los hallazgos de la presente invención, son patologías de tipo cognitivo. En estas patologías se produce una degeneración de las conexiones sinápticas que se puede paliar considerablemente utilizando los antagonistas de P2X7 de la invención y sus composiciones. Este aspecto constituye una realización adicional de la invención, prefiriéndose en concreto los casos relativos al tratamiento de la epilepsia o la esquizofrenia.

La epilepsia es un síndrome cerebral crónico caracterizado por crisis recurrentes debidas a unas descargas excesivas hipsincrónicas de impulsos nerviosos por las neuronas cerebrales, asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas. En la corteza cerebral de pacientes epilépticos aparecen microzonas con un incremento notable de sinapsis excitadoras y una disminución de sinapsis inhibitorias en las regiones alteradas. Además, en estas microzonas hay una clara pérdida de neuronas y formación de circuitos sinápticos hiperexcitadores que podrían explicar la actividad epiléptica. Consecuentemente, el restablecimiento de circuitos sinápticos normales y funcionales mediante el empleo de los antagonistas de la invención también supondría una mejora en el contexto de esta enfermedad.

En el caso de la esquizofrenia, se produce un déficit de proyecciones procedentes de axones del tálamo mediodorsal. Además, existen numerosas evidencias que sugieren que el desarrollo de los axones de las interneuronas corticales también está afectado en esta enfermedad. Las interneuronas se caracterizan por poseer axones cortos, al contrario que las neuronas con axones largos, como las córtico-espinales o tálamo-corticales pero, en cualquier caso, su regeneración mediante los antagonistas de la invención podría representar una mejora considerable en el funcionamiento cortical y por lo tanto, representa una diana atractiva para el desarrollo de una terapia apropiada para esta enfermedad.

Una realización especialmente interesante de la invención se refiere al uso de los medicamentos descritos, para potenciar el crecimiento axonal a partir de neuronas en cultivo. Así mismo, los medicamentos de la invención se podrían aplicar para tratar neuronas trasplantadas de mamífero no humano o las nuevas neuronas generadas en el cerebro durante la neurogénesis y favorecer su desarrollo axonal, paliando así los efectos de pérdida o degeneración neuronales producidos en las enfermedades anteriormente descritas.

Descripción de las figuras

Figura 1. *El ATP induce corrientes transitorias de calcio intracelulares en regiones distales del axón y ejerce un efecto negativo sobre el crecimiento axonal.*

5 (A) Imagen de fluorescencia de neuronas del hipocampo cargadas con colorante Fura-2. Se analizaron dos áreas diferentes a lo largo del axón (regiones 2 y 3) y del soma (región 1). Las líneas de los gráficos representan la relación de longitudes de onda de Fura-2 de 340 (F_{340}) y 380 (F_{380}) en el transcurso del tiempo. Las neuronas fueron estimuladas con ATP 1 mM (b) y después con KCl 60 mM (d) para analizar la funcionalidad de las neuronas. El panel derecho muestra imágenes representativas de cambios de fluorescencia de Fura-2, registrados en cuatro momentos diferentes del experimento (a, b, c y d). Las barras negras representan el período de tratamiento con ATP o KCl. (B) Se cultivaron neuronas del hipocampo durante 3 días en medio suplementado o no con ATP 1 mM. Las neuronas se tiñeron con anticuerpo anti-tubulina tirosinada (verde), para identificar la morfología neuronal, y con Faloidina-Alexa 594 (rojo) para identificar los conos de crecimiento. Barra de escala = 50 μ m. (C) Los gráficos representan la media \pm error estándar de la media de la longitud axonal ramificaciones axonales, y la relación entre ramificaciones y longitud axonal total obtenidos de los tres experimentos diferentes (n=150). Las diferencias estadísticas se analizaron usando una prueba t para muestras apareadas (* $P < 0,05$, **** $p < 0,0001$ frente al control).

20 Figura 2. *Los receptores purinérgicos regulan el crecimiento del axón y las dendritas en neuronas del hipocampo en cultivo.*

25 (A) Neuronas de hipocampo cultivadas durante 3 días *in vitro* (DIV) en presencia o ausencia de los antagonistas de P2X, BBG (5 μ M), Ip51 (1 μ M) y PPADS (30 μ M). Las neuronas se tiñeron con un anticuerpo anti- α -tubulina tirosinada para observar su morfología. Los axones se identificaron morfológicamente como la prolongación más larga. Barra de escala = 100 μ m. (B) Cuantificación de la longitud axonal y del número de ramificaciones del axón. La longitud del axón se representa como la longitud total del axón, incluyendo las ramificaciones. Las ramificaciones secundarias y terciarias representan ramificaciones de primer y segundo orden. Se calculó la relación entre las ramificaciones y la longitud axonal para cada neurona y el gráfico representa las medias de estas relaciones. Los datos representan la media \pm desviación estándar obtenidas de 3 experimentos independientes, que contenían cada uno de ellos al menos 50 neuronas. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ frente al control. (C) Neuronas del hipocampo cultivadas durante 3 DIV, en presencia o ausencia del antagonista del receptor de P2X, KN-62 (50 nM). Las neuronas se tiñeron con anticuerpo anti-tubulina (verde) y faloidina (rojo), para identificar la morfología neuronal. Las neuronas tratadas con KN-62 presentan la misma morfología axonal, comparadas con aquellas tratadas con BBG. Barra de escala = 100 μ m. (D) Los gráficos representan la media \pm error estándar de la media de la longitud axonal, ramificaciones axonales, y la relación entre longitud axonal y ramificaciones axonales, obtenida de tres experimentos diferentes (n=150). Las diferencias estadísticas se analizaron usando un test-t pareado (* $P < 0,01$, **** $p < 0,0001$ frente al control).

Figura 3. *La supresión de la expresión de P2X7R induce el crecimiento axonal.*

40 (A) La transferencia tipo Western de células HEK293T sin transfectar, transfectadas con shRNA Luc (shRNA de control para luciferasa) más pcDNA-P2X7R, y transfectadas con shRNA P2X7R más pcDNA P2X7R mostró la eficacia de los shRNA seleccionados para silenciar la expresión de P2X7R cuando se los comparó con el shRNA de control para la luciferasa (Luc). Se usó α -tubulina (α -Tub) como control de carga. Las bandas se escanearon y analizaron, y la relación P2X7R/ α -Tubulina se utilizó para estimar la eficiencia de los shRNA-P2X7R seleccionados. (B) Los valores de los histogramas se normalizaron con respecto a las HEK transfectadas con shRNA Luc más pcDNA P2X7R (n=3, ** $P < 0,001$). (C) Se muestran imágenes representativas de la fluorescencia de neuronas de hipocampo transfectadas con pEGFP, shRNA Luc y shRNA P2X7R, tras 1 día *in vitro*. Las neuronas se fijaron y se analizaron su longitud axonal y ramificaciones axonales a los 3 días *in vitro*. Barra de escala = 25 μ m. (D) Los gráficos representan la media \pm error estándar de la media de la longitud axonal y de las ramificaciones axonales por neurona, obtenidos en tres experimentos independientes. (n=60) (** $P < 0,001$ ANOVA de dos vías). Barra de escala = 50 μ m. GFP: proteína verde fluorescente. (E) Neuronas de hipocampo nucleofectadas con plásmidos de expresión para GFP, shRNA-P2X7 o P2X7-GFP. Las neuronas fueron nucleofectadas antes de añadirlas a la placa de cultivo y se mantuvieron en cultivo durante 3 días. Las neuronas se fijaron y tiñeron con tubulina (rojo) y las neuronas que expresaban GFP fueron identificadas como nucleofectadas (verde).

55 Figura 4. *Los receptores funcionales de P2X7 muestran una localización polarizada en la región distal del axón y los conos de crecimiento.*

60 (A) Las neuronas de hipocampo cultivadas durante 3 días *in vitro* se tiñeron con anticuerpos anti- α -tubulina tirosinada (Tyr- α -Tub) y anti-P2X7. Los recuadros muestran la región distal del axón teñida para tubulina (rojo) o receptor P2X7 (verde). El gráfico representa la intensidad de fluorescencia de tubulina y P2X7 a lo largo del soma y el axón, cuantificada usando el programa ImageJ. Barra de escala = 50 μ m. (B) Imágenes de la región más distal del axón y del cono de crecimiento de las neuronas de hipocampo teñidas con anticuerpos anti-tubulina y anti-P2X7. Hay que destacar la ausencia de tinción para P2X7 en los axones que corren paralelos a la región distal positiva para P2X7 de un axón, donde P2X7 está localizado en el dominio de los microtúbulos y en el dominio rico en actina (recuadro). (C) La imagen muestra una ampliación 2,5x de la región del axón de neuronas del hipocampo. Los recuadros muestran una imagen de fluorescencia de neuronas del hipocampo completas, cargadas con colorante Fura-2. Se analizaron cinco

ES 2 338 970 B1

áreas diferentes a lo largo del axón (1, 2, 3, 4 y 5). El panel derecho muestra el transcurso del tiempo de los cambios de fluorescencia de Fura-2, registrados en las áreas axonales seleccionadas. Las líneas del gráfico representan la relación entre las longitudes de onda 340 (F_{340}) y 380 (F_{380}) de Fura-2. Las neuronas fueron estimuladas con ATP (1 mM), en presencia o ausencia de BBG (1 μ M). Las barras negras indican el período de estimulación. Se aplicó también un pulso de KCl (60 mM), para analizar la funcionalidad de las neuronas. Se obtuvieron resultados similares cuando se estimuló a las neuronas con Bz-ATP (100 μ M), en presencia o ausencia de o-ATP (100 μ M, datos no mostrados).

Figura 5. *El BBG disminuye la pCAMKII en los conos de crecimiento axonales.*

(A) Conos de crecimiento axonales de neuronas del hipocampo (3 DIV), teñidos con anti-pCAMKII α/β , anticuerpos anti-pCAMKII α/β (anti-proteína quinasa II dependiente de calcio-calmodulina fosforilada), y faloidin-Alexa 594. Las neuronas se cultivaron en presencia o ausencia de BBG (5 μ M). Barra de escala = 25 μ m. (B) El gráfico representa la media \pm error estándar de la media de la intensidad de fluorescencia de pCAMKII α/β en los conos de crecimiento axonales (unidades relativas) en 150 neuronas de 3 experimentos independientes (* $P < 0,05$). Las imágenes son una ampliación 4x de los conos de crecimiento axonales de las neuronas del hipocampo, mostradas en A, teñidas para pCAMKII α/β .

Figura 6. *La inhibición de P2X7R modifica la morfología del cono de crecimiento axonal en neuronas del hipocampo.*

Las neuronas se cultivaron durante 3 DIV en ausencia (A) o presencia de los antagonistas de P2X7R BBG (50 μ M) (B) y KN-62 (50 nM) (C). La morfología del cono de crecimiento se detectó utilizando Faloidina-Alexa 594 (rojo) y la morfología neuronal se observó utilizando un anticuerpo anti-tubulina tirosinada (Tyr-Tubulina) (verde). Los conos de crecimiento de las neuronas control presentaban un lamelipodio y filopodios, mientras que las neuronas tratadas con antagonistas de P2X7R mostraban una morfología filopódica. Barra de escala = 10 μ m.

Figura 7. *Fosforilación de la quinasa de adhesión focal (FAK) en su tirosina 397 en neuronas del hipocampo, tras inhibición de los receptores P2X7.*

(A) Conos de crecimiento de neuronas del hipocampo control o tratadas con BBG, teñidos con anticuerpo anti-FAK. (B) Transferencia tipo Western de proteína FAK y pFAK (FAK fosforilada) en neuronas del hipocampo tratadas con BBG (5 μ M) durante 30 y 60 min. Se usó actina como control de carga. Los gráficos representan la media \pm desviación estándar de FAK, pFAK y relación pFAK/FAK de tres experimentos diferentes (*, $P < 0,05$, t-test pareado).

Figura 8. *La actividad de la PI3-quinasa es necesaria para la elongación y ramificación axonales inducidas por antagonistas de P2X7R.*

(A) Neuronas del hipocampo (3 DIV), cultivadas en presencia o ausencia de BBG (5 μ M) y/o antagonista de PI3-quinasa, LY-294002 (50 μ M). Las neuronas se tiñeron con anticuerpo anti-tubulina para observar la morfología neuronal. Barra de escala = 50 μ m. (B) Evolución temporal de la fosforilación de GSK3 (glucógeno-sintetasa-quinasa 3) y Akt (proteína-quinasa de GSK3) en extractos de neuronas del hipocampo tratados con BBG (5 μ M) durante 30 y 60 min. Los gráficos representan la media \pm desviación estándar de 3 experimentos diferentes. Hay que destacar el incremento significativo de la fosforilación de GSK3 (GSK3 α/β pSer, GSK3 fosforilada) tras una exposición de 30 min (* $P < 0,05$, test-t pareado). La fosforilación de Akt (pAkt, Akt fosforilada) está también sobreexpresada, pero no es significativa cuando se compara con el control. (C) Fosforilación de GSK3 en extractos de neuronas del hipocampo tratados durante 6 DIV con BBG (5 μ M), Ip51 (1 μ M) y PPADS (30 μ M). Sólo el tratamiento con BBG incrementa significativamente la fosforilación de GSK3 (* $P < 0,05$, test pareado). Los gráficos representan la media \pm desviación estándar de los tres experimentos independientes.

Figura 9. *El tratamiento de ratones silvestres con BBG induce la inhibición de la GSK3:* Los ratones fueron tratados durante 4 meses con BBG o con vehículo. (A) Experimentos representativos de inmunotransferencia de dos ratones control y dos ratones tratados con BBG donde se muestra la expresión total de GSK3, fosfo-GSK3 en los epítotos pS9/21, Tau total, fosfo-Tau (PHF1) y Tau defosforilada (Tau-1) en extractos proteicos del hipocampo de dichos ratones. Las membranas fueron reveladas con anticuerpos anti-beta III-tubulina para corregir cualquier posible desviación en la carga de proteína. (B) Los histogramas muestran la media \pm la desviación estándar de cada grupo experimental. (C) Experimentos representativos de inmunotransferencia de la proteína FAK procedentes de extractos de hipocampo de ratones tratados o sin tratar con BBG. La gráfica muestra la media \pm la desviación estándar de cada grupo experimental. La significancia estadística fue analizada mediante un test de ANOVA (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Figura 10. *La inhibición de P2X7R in vivo induce la inhibición de GSK3 y el incremento de los niveles de proteínas presinápticas de membrana en el hipocampo.*

Transferencias tipo Western de extractos cerebrales de hipocampo de ratones tratados con PBS o BBG marcados con una sonda de un anticuerpo contra la sinaptofisina, el anticuerpo SNAP-25, el anticuerpo contra el transportador vesicular del glutamato tipo-1 (V-GLUT-1), el anticuerpo contra la sintaxina y el anticuerpo contra el P2X7R. Las membranas se marcaron con una sonda de un anticuerpo anti- β III-tubulina (β III-Tub), para corregir cualquier posible desviación en la carga de proteínas. Panel inferior: Histogramas que muestran la cuantificación densitométrica de las

ES 2 338 970 B1

concentraciones de sinaptofisina, SNAP-25, V-GLUT-1, syntaxina y P2X7R en ratones tratados con BBG frente a muestras de ratones tratados con PBS (** $P < 0,005$, *** $P < 0,001$).

Ejemplos

5 Los siguientes ejemplos se llevaron a cabo utilizando los siguientes materiales y procedimientos:

Animales

10 Los animales se engendraron en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (Madrid, España). Se alojaron de cuatro a cinco ratones por jaula con comida y agua disponibles a voluntad. Los ratones se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada en ciclos de luz-oscuridad de 12/12 horas, encendiéndose las luces a las 07:00 horas.

Reactivos

15 ATP (A5394), Bz-ATP (B6396), oxo-ATP (A6779), PPADS (027K4601), BBG (B5133) adquiridos de Sigma, KN-62 (1277) de Tocris, Ip51 se sintetizó según se describió previamente (Pintor *et al.*, *Mol Pharmacol.* 51, 277-84). LY-2940002 se adquirió de Calbiochem.

20 Cultivo celular

Se prepararon neuronas de hipocampo según se describió previamente por Banker y Goslin, 1988. En resumen, el hipocampo se obtuvo de embriones de ratón E17 y, tras disección y lavado tres veces en HBSS exento de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, los tejidos se digirieron en la misma solución con tripsina al 0,25% durante 15 minutos. Se lavó de nuevo el hipocampo tres veces en HBSS exento de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y luego se disoció con una pipeta Pasteur pulida al fuego. Se contaron las células, se volvieron a suspender en medio de siembra en placa (MEM, suero de caballo al 10%, glucosa al 0,6%) y se sembraron en placa a una densidad de 5.000 células/cm² sobre cubreobjetos recubiertos con polilisina (1 mg/ml). Después de 2 horas, se cambiaron los cubreobjetos a un medio de cultivo de neuronas (Neurobasal, B-27, glutamax-1) añadido 24 horas antes del cultivo. Para analizar el efecto de los agonistas y antagonistas de los receptores P2X, los compuestos se añadieron a las neuronas en cultivo 4 días después de sembrarlas a las concentraciones indicadas. Para los experimentos bioquímicos, se sembraron en placa neuronas de corteza o hipocampo sobre placas de 60 mm recubiertas de polilisina (1 mg/ml) a una densidad de 200.000 células/cm² y se cultivaron durante 72 horas o 6 DIV con o sin tratamiento.

35 Las células HEK293T se mantuvieron en DMEM (Gibco) suplementado con FCS al 10% (v/v). Las células se volvieron a sembrar a razón de 10⁵ células/cm², 1 día antes de la transfección, tras lo cual se redujo el FCS al 0,5% (v/v).

40 Construcciones de plásmidos y diseño de RNAs pequeños en horquilla (shRNAs) para P2X7R

El DNAc completo del P2X7 humano se adquirió y secuenció por Geneservice Ltd. (número de clon de DNAc MGC: 20089, IMAGEN: 4298811; Cambridge, Reino Unido). El ADNc de P2X7 se aisló del plásmido original (pOTB7) mediante digestión con EcoRI y XhoI, y se subclonó en los sitios correspondientes del pcDNA3 para expresión en células de mamíferos. La inactivación del receptor de P2X7 se logró mediante interferencia con ARNs (ARNi) utilizando una estrategia con shRNAs basada en vectores. Para el receptor P2X7 se seleccionó la secuencia diana del shRNA 5'-GTTTTGACATCCTGGTTTT-3', de acuerdo con un protocolo de diseño racional publicado previamente (Reynolds *et al.*, 2004, Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 22, 326-30). Como control, se utilizó el oligonucleótido dirigido a la luciferasa de luciérnaga 5'-CTGACGCGGAATACTTCGA-3'. La especificidad de la secuencia se confirmó mediante un análisis BLAST para el P2X7R de rata, ratón y seres humanos. Se diseñaron, aparearon e insertaron en los sitios BgIII/HindIII del vector pSUPER.neo.GFP (OligoEngine, Seattle, WA), oligonucleótidos sintéticos de 64 nucleótidos directos e inversos (Sigma Genosys), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estas construcciones expresan shRNAs de 19 nucleótidos que forman bucles en horquilla de 9 pares de bases dirigidos contra los mRNAs de P2X7 o luciferasa (shRNA control). La expresión simultánea de la proteína verde fluorescente (GFP) a partir de este vector permitió la identificación de las células transfectadas mediante fluorescencia.

55 Transfección de células

Se realizaron transfecciones de células HEK 293T con las construcciones de plásmidos derivadas de pSUPERneo-GFP, usando lipofectamina 2000, según las instrucciones del fabricante. Tras 6 h, el medio se eliminó y las células se volvieron a incubar durante los períodos indicados, en presencia de medio de cultivo. La transfección neuronal se realizó 24 horas después de la siembra en placa, usando lipofectamina 2000 (9 μl , Invitrogen), 3 μg de shRNA control Luc o vectores shRNA P2X7R. La mezcla de transfección se eliminó después de 2 h y las neuronas se lavaron y mantuvieron durante 3 DIV.

65 Estudios de calcio: análisis microfluorimétrico

Las neuronas de hipocampo se cultivaron sobre cubreobjetos tratados con polilisina tal como se ha descrito previamente. Al día siguiente de que las células se sembraran en placa, las neuronas se lavaron con tampón HBM (NaCl

ES 2 338 970 B1

140 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 1,2 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM, pH 7,4), y se cargaron con una solución de Fura-2AM (5 μM) durante 30 min a 37 C. Este período facilitó la hidrólisis intracelular del Fura-2AM. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron de nuevo con medio HBM exento de Mg²⁺ y se montaron en una cámara de superfusión en un microscopio Eclipse TE-2000 de NIKON. Este medio era el mismo que se mencionó anteriormente, pero el MgCl₂ se sustituyó por glucosa a una concentración que conservaba la osmolaridad. Las neuronas se perfundieron continuamente a 1,2 ml/min con medio de perfusión exento de Mg²⁺ durante los ensayos funcionales. A las neuronas se les aplicaron pulsos control de 30 segundos de ATP (1 mM) o Bz-ATP (100 μM). En algunos casos, las neuronas se preincubaron durante 5 min con los antagonistas específicos de P2X₇, o-ATP (100 μM) o BBG (1 μM), antes de aplicar ATP o BzATP de nuevo, en presencia de ambos antagonistas de P2X₇. Al final de cada experimento se aplicó un pulso de K⁺ 60 mM para confirmar la viabilidad de las neuronas tras el estudio. En todos los casos los compuestos se disolvieron en medio HBM exento de Mg²⁺. Las neuronas se visualizaron utilizando un microscopio Nikon que contenía una lente de aceite Fluor 0,5-1,3 ×40 S. La longitud de onda de la luz entrante se filtró a 340 nm y 380 nm con la ayuda de un monocromador (ancho de banda de 10 nm, monocromador Optoscan, Cairin). Las imágenes de 12-bits se capturaron con una cámara ORCA-ER C 47 42-98 CCD de Hamamatsu (Hamamatsu City, Japón) controlada mediante el software Metafluor 6.3r6 PC (Universal Imaging Corp., Cambridge, Reino Unido). El tiempo de exposición fue 250 ms para cada longitud de onda y el tiempo de cambio fue <5 ms. Las imágenes se capturaron de forma continua y se almacenaron en un disco rápido SCSI. Los datos obtenidos en el transcurso del tiempo representan la intensidad media de luz en una pequeña región elíptica dentro de cada célula. Los componentes del fondo y autofluorescencia se restaron en cada longitud de onda.

Anticuerpos

Los anticuerpos comerciales utilizados fueron: los anticuerpos anti-P2X₇ obtenidos de Alomone (Jerusalén, Israel), Chemicon (Temecula, CA, EE.UU.) y GE Health Care-Pharmacia (Bucks, Reino Unido); anti-sintaxina, anti-α-sinucleína y Akt se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.); anti-sinaptofisina, anti-α-tubulina tirosinada y anti-β-actina se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MI, EE.UU.); anti-VGLUT1 y anti-SNAP-25 eran de Synaptic Systems (Göttingen, Alemania); anti-fosfo-GSK-3 (pS9/21); anti-pAkt (pS473) se obtuvieron de Cell Signalling (Beverly, MA, EE.UU.); anti-βIII tubulina se obtuvo de Promega (Madison, WI, USA); anti-GSK-3 α/β, anti-CaMKII α/β, anti-fosfo-FAK (pY397) y anti-FAK se adquirieron a Invitrogen-Biosource (San Francisco, CA, EE.UU.); anti-fosfo-CaMKII α/β (pT286/287) se obtuvo de Upstate cell signalling solutions (Lake placid, NY, EE.UU.); anti-tau-1 se obtuvo de Chemicon. Anti-tau-PHF1, anti-tau 7.51, anti-tau (12E8) y MAP2 (clon 514) fueron un donativo del Dr. Jesús Avila (Centro de Biología Molecular, Madrid).

Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica se llevó a cabo en neuronas cultivadas durante 3 DIV tras fijación en paraformaldehído al 4% durante 20 min. La unión inespecífica se bloqueó con gelatina al 0,22% y Tritón X-100 al 0,1% en tampón fosfato 0,1 M (PB). Las células se incubaron entonces con anticuerpos primarios durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa (1:1000) y falodina conjugada con Alexa-594 (1:100). Los cubreobjetos se montaron finalmente, utilizando fluoromount G (Southern Biotech). Las imágenes se capturaron utilizando una Leica DMI 6000 B acoplada a una cámara Leica DFC 350 FX y a un microscopio confocal Leica TCSSP5. El análisis de la longitud y las ramificaciones axonales se llevó a cabo utilizando el programa Neuron J. La intensidad de fluorescencia se evaluó utilizando la herramienta perfiladora de color RGB del programa Image J. Las imágenes se procesaron y se presentaron utilizando Adobe Photoshop e Illustrator CS3.

Transferencia tipo Western

Los extractos para las transferencias tipo Western se prepararon homogeneizando tejido cerebral recién diseccionado de ratón en un tampón de extracción enfriado en hielo que contenía HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, NaF 10 mM, Tritón X-100 al 1%, ortovanadato sódico 1 mM, EDTA 10 mM, y antagonistas de proteasas (PMSF 2 mM, 10 μg/ml de aprotinina, 10 μg/ml de leupeptina y 10 μg/ml de pepstatina). Las neuronas cultivadas se lisaron y homogeneizaron en el mismo tampón. Las muestras se homogeneizaron a 4°C y el contenido de proteínas se determinó mediante el método de Bradford. Se separó proteína total (20 μg) en geles de SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell). Los experimentos se llevaron a cabo utilizando los siguientes anticuerpos primarios (y diluciones): antiseros policlonales contra P2X₇ (1/1000), VGLUT1 (1/5000), α-sinucleína (1/5000), syntaxina (1/1000), pT^{286/287}CAMKII α/β (1/1000), Akt (1:1000), pAkt (473: 1:1000), fosfo-GSK-3 pS9/21 (1/1000), pY³⁹⁷FAK (1/1000) y FAK (1/1000); anticuerpos monoclonales contra α-tubulina (1/10000), βIII tubulina (1/1000), CaMKII α/β (1/1000), tau-1 (1/5000), tau-PHF1 (1/100), tau 7.51 (1/100), GSK-3 α/β (1/1000), β-actina (1/1000), tau 12E8 (1/2000), SNAP-25 (1/1000) y sinaptofisina (1/10000). Las membranas se incubaron con los anticuerpos seleccionados a 4°C durante toda la noche en leche en polvo descremada al 5%. Para detectar los anticuerpos primarios se utilizó un segundo anticuerpo monoclonal de cabra anti-ratón o un antisuero policlonal de cabra anti-conejo (ambos a 1/5000; Amersham), que se visualizaron mediante ECL (Amersham).

Tratamiento con fármacos

Se administro Brilliant Blue G a ratones adultos (de aproximadamente 7 meses de edad) durante 4 meses. El Brilliant Blue G se diluyó a 3 mg/ml en PBS exento de calcio y magnesio más DMSO al 0,2%. La solución vehiculizante contenía DMSO al 0,2% en PBS exento de calcio y magnesio. A los ratones-BBG se les administró una inyección

ES 2 338 970 B1

intraperitoneal (i.p.) de 45 mg/kg de peso corporal de Brilliant Blue G en PBS más DMSO al 0,2% cada 48 h. Los compañeros de carnada de control se trataron con la misma relación de solución vehiculizante (volumen por peso corporal). Los ratones se pesaron semanalmente.

5 *Análisis espectrofotométrico de las concentraciones de BBG en plasma y cerebro*

Se añadió Brilliant blue G (BBG) a diferentes concentraciones a PBS, plasma, o un homogeneizado cerebral, y se exploró cuál era la “longitud de onda de identificación” óptima entre 200 nm y 800 nm utilizando un espectrofotómetro (Ultrospec III de Pharmacia). En todos los casos, la absorbancia máxima se obtuvo a 576 nm. Se determinaron entonces los niveles de BBG en plasma y en los homogeneizados de cerebro de los ratones tratados con BBG (tipo silvestre y R6/1), de acuerdo con curvas de calibración generadas con un rango de diluciones de BBG en plasma o en homogeneizado de cerebro.

15 *Estadísticas*

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces y los resultados se presentan como la media y la desviación estándar. Las diferencias estadísticas se analizaron con la ayuda del software Origin 7.0 utilizando un prueba t para muestras apareadas o un ensayo ANOVA, tal como se indica en las leyendas de las figuras.

20 *Ejemplo 1*

25 *El ATP reduce la longitud del axón mediante el incremento de la concentración de calcio en el axón, en neuronas del hipocampo en cultivo*

Para estudiar el papel del ATP en la regulación del crecimiento axonal, se usó un modelo bien establecido de neuronas del hipocampo en cultivo, que se ha descrito anteriormente.

Como el ATP se une a los receptores purinérgicos, ionotrópicos y metabotrópicos, se analizó primeramente si el ATP podía movilizar el calcio en los axones. Las neuronas se sembraron en cubreobjetos, se cultivaron hasta que alcanzaron la etapa 3 (36 horas) y, a continuación, las neuronas se cargaron con colorante Fura-2. El día después de sembrar las neuronas en placa, se lavaron con tampón HBM (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 1,2 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM, pH 7,4), y se cargaron con solución FURA 2AM (5 μM) durante 30 min a 37°C. Este período facilitó la hidrólisis intracelular del Fura-2AM. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron de nuevo con medio HBM exento de Mg²⁺ y se montaron en una cámara de superfusión en un microscopio Eclipse TE-2000 de NIKON. Este medio fue el mismo que se mencionó anteriormente, pero el MgCl₂ se sustituyó por glucosa a una concentración que conservaba la osmolaridad. Las neuronas se perfundieron continuamente a 1,2 ml/min con medio de perfusión exento de Mg²⁺ durante los ensayos funcionales. A las neuronas se les aplicaron pulsos control de 30 segundos de ATP (1 mM) o Bz-ATP (100 μM) antes de preincubarlas durante 5 min con los antagonistas específicos de P2X7, o-ATP (100 μM) o BBG (1 μM). Posteriormente, se hicieron ensayos de nuevo con ATP (1 mM) o Bz-ATP (100 μM) en presencia de ambos antagonistas de P2X7. Al final de cada experimento se aplicó un pulso de K⁺ 60 mM para confirmar la viabilidad de las neuronas tras el estudio. En todos los casos los compuestos se disolvieron en medio HBM exento de Mg²⁺. Las neuronas se visualizaron utilizando un microscopio Nikon que contenía una lente de aceite ×40 S Flúor 0,5-1,3. La longitud de onda de la luz entrante se filtró a 340 nm y 380 nm con la ayuda de un monocromador (ancho de banda de 10 nm, monocromador Optoscan, Cairin). Las imágenes de 12-bits se captaron con una cámara ORCA-ER C 47 42-98 CCD de Hamamatsu (Hamamatsu City, Japón) controlada mediante el software Metafluor 6.3r6 PC (Universal Imaging Corp., Cambridge, Reino Unido). El tiempo de exposición fue 150 ms para cada longitud de onda y el tiempo de cambio fue <5 ms. Las imágenes se captaron de forma continua y se almacenaron en un disco rápido SCSI. Los datos obtenidos en el transcurso del tiempo representan la intensidad media de luz en una pequeña región elíptica dentro de cada célula. Los componentes de fondo y la autofluorescencia se restaron en cada longitud de onda.

A continuación, se analizó la respuesta al calcio de las neuronas, en presencia de ATP 1 mM. Es interesante destacar que las neuronas estimuladas con ATP tenían una concentración incrementada de calcio sólo en la región axonal distal y en los conos de crecimiento axonales (Fig. 1A, 3 y B). Tras el incremento de calcio inducido por ATP, se valoró la viabilidad neuronal mediante estimulación con KCl 60 mM. Este resultado sugiere que el ATP podría jugar un papel en el crecimiento axonal. Por ello, para analizar la longitud axonal en presencia de ATP, se cultivaron neuronas durante 24 horas y luego se trataron las neuronas cada 12 horas con ATP 1 mM, hasta las 72 horas en cultivo. Tras este período, las neuronas se fijaron, se tiñeron con anticuerpo anti-tubulina y Faloidin-Alexa 594, para observar la morfología neuronal. Se analizó la longitud y ramificación axonal en 100 neuronas de tres experimentos independientes. Nuestros resultados demuestran que las neuronas tratadas con ATP tenían axones significativamente más cortos que las neuronas control (153,03 ± 13,17 μm frente a 199,04 ± 14,94 μm), y también presentaban una reducción de las ramificaciones axonales (0,1 + 0,05 frente a 1,30 ± 0,19; Fig 1B,C).

65

Ejemplo 2

Los antagonistas de P2X7R favorecen la ramificación y elongación axonales

5 A la vista de este efecto del ATP en el crecimiento axonal y de la localización de su acción, se estudió a continuación cuál es el receptor de ATP que controla el crecimiento axonal. El ATP puede actuar sobre los receptores purinérgicos P2X y P2Y. La respuesta localizada del calcio al ATP sugiere que el receptor implicado en esta longitud axonal reducida es un receptor purinérgico P2X, que es un canal de calcio, mientras que los receptores metabotrópicos P2Y actúan movilizándolo procedente del retículo endotelial. Por tanto, se trataron neuronas del hipocampo cultivadas, con antagonistas farmacológicos específicos de diferentes receptores P2X, a la dosis indicada. Ip51 (1 μ M) bloquea los receptores P2X1 y P2X3 en el intervalo micromolar, PPADS (30 μ M) es un antagonista para P2X2 y P2X4, Brilliant Blue G (5 μ M) y KN-62 (50 nM) son antagonistas específicos para P2X7. Las neuronas se cultivaron durante 72 horas en presencia o ausencia de antagonistas, antes de ser fijadas y teñidas con diferentes marcadores para observar su morfología (Fig. 2). Las neuronas tratadas con BBG (5 μ M) mostraron un incremento de la longitud total del axón ($531,65 \pm 150,45 \mu\text{m}$) cuando se las comparaba con neuronas control ($295,9 \pm 12,66 \mu\text{m}$). Estos axones más largos tenían también más ramificaciones axonales secundarias y terciarias (Fig. 2A, B), con una media de $4,35 \pm 0,08$ y $0,72 \pm 0,13$ ramificaciones secundarias y terciarias, respectivamente, cuando se las comparaba con $0,92 \pm 0,1$ y $0,10 \pm 0,05$ ramificaciones secundarias y terciarias en neuronas control, respectivamente. Este efecto sobre el crecimiento y ramificación axonales no se observó cuando las neuronas se trataron con el antagonista de P2X1R y P2X3R, Ip51 (1 μ M). Sin embargo, en presencia de PPADS (30 μ M), las neuronas desarrollaron tanto un axón más largo que las neuronas control ($488,66 \pm 118,71 \mu\text{m}$) como más ramificaciones secundarias ($2,71 \pm 0,54$), aunque este efecto fue más modesto que el producido por BBG (Fig. 2B). Se analizó un segundo conjunto de experimentos usando BBG y otro antagonista específico de P2X7, KN-62 (50 nM). Se observó el mismo efecto sobre la elongación y ramificación axonales en las neuronas tratadas con KN-62 50 nM (Fig. 2 C, D). Para descartar que el incremento de la ramificación axonal pudiera estar ligado a axones más largos, se analizó la relación entre el número de ramificaciones y la longitud axonal. Esta relación sólo era significativamente diferente en las neuronas tratadas con BBG o KN-62, en comparación con las neuronas control (Fig. 2B, D), demostrando que la inhibición de P2X7R favorece el crecimiento y ramificación axonales.

Ejemplo 3

El bloqueo de la expresión de P2X7R induce el crecimiento y la ramificación axonales

35 Con el fin de validar las modificaciones morfológicas observadas en el crecimiento axonal tras el tratamiento con antagonistas de P2X7, se usó una segunda estrategia basada en la expresión de P2X7R usando la tecnología del RNA de interferencia. Se diseñó una estrategia basada en un shRNA derivado del vector pSUPER.neo.GFP para dirigirla al P2X7R.

40 La efectividad de esta estrategia de shRNA-P2X7R se confirmó primero en la línea celular HEK293T, que no expresa P2X7R nativo. Este receptor se expresó en células HEK293T, usando un vector que expresaba pcDNA3-P2X7R y cotransfectado con el vector que expresaba el ARN de interferencia para P2X7R o un shRNA inespecífico (shRNA-Luc). La expresión de P2X7R exógeno se redujo en un 65% en células cotransfectadas con shRNA-P2X7R (Fig. 3A). Una vez confirmadas la eficiencia y especificidad de shRNA-P2X7R, se transfectaron neuronas de hipocampo como las descritas en el Ejemplo 1, con el vector shRNA-P2X7R después de 1 DIV. Las neuronas se fijaron a los 3 DIV y se midieron la longitud y ramificaciones axonales. Las neuronas transfectadas con shRNA-P2X7R presentaban un incremento significativo de la longitud axonal, $908 \pm 221,7 \mu\text{m}$, en comparación con las neuronas transfectadas sólo con un plásmido que expresaba GFP ($395,9 \pm 93,39 \mu\text{m}$). Las neuronas transfectadas con un plásmido que expresaba un shRNA inespecífico tenían una longitud axonal similar y no significativamente diferente de las que expresaban sólo GFP ($517,8 \pm 105,9 \mu\text{m}$); (Fig. 3B, C). Este efecto fue similar al producido por el tratamiento con antagonistas de P2X7R (Fig. 2). En efecto, el bloqueo de la expresión de P2X7R también produjo un incremento significativo en el número total de ramificaciones de los axones ($4,62 \pm 0,53$), cuando se comparaba con las neuronas GFP ($1,16 \pm 0,33$) a los 3 DIV. Estos resultados confirman la implicación de P2X7R en el desarrollo axonal, tal como se había demostrado previamente utilizando una estrategia farmacológica.

Ejemplo 4

Los receptores P2X7 funcionales están localizados en la región distal de los axones

60 A la vista de los datos obtenidos, se analizó la distribución del receptor P2X7 en neuronas de hipocampo cultivadas 3 DIV, como las descritas en el Ejemplo 1. Las neuronas se tiñeron con tubulina para observar la morfología neuronal, y con un anticuerpo anti-P2X7R, que se demostró previamente que reconocía específicamente los receptores P2X7, (Fig. 3A). La expresión del receptor P2X7 se observó en el soma y también se polarizó a la región distal de los axones (Fig. 4A, B), donde se ha demostrado que el ATP induce un aumento en la concentración de calcio (Fig. 1A). Se confirmó este punto midiendo la intensidad de fluorescencia de P2X7 y tubulina a lo largo de los axones. 65 La intensidad de fluorescencia de P2X7 presentaba un gradiente, con una mayor intensidad en la región más distal del axón (Fig. 4A). Según se muestra en la figura 4B, los receptores P2X7 estaban presentes también en la región del cono de crecimiento. Esta localización sugiere un papel de P2X7R en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos y microfilamentos en el cono de crecimiento axonal.

Para confirmar que estos receptores de P2X7 en el cono de crecimiento son funcionales, se analizaron las concentraciones de calcio intracelular en los conos de crecimiento axonales, que se había demostrado previamente que regulaban el crecimiento axonal. Por tanto, se realizaron estudios microfluorimétricos de calcio, para confirmar que el flujo de calcio en el que el interviene el ATP, en los conos de crecimiento axonal de neuronas del hipocampo (Fig. 1A), se bloquea mediante antagonistas específicos de P2X7R. Los conos de crecimiento axonales (Fig. 4C) se identificaron en neuronas de hipocampo fluorescentes (Fig. 4C, recuadro), y se analizó la respuesta inducida por ATP 1 mM en conos de crecimiento, y en diferentes regiones a lo largo del axón (Fig. 4C). El flujo de calcio inducido por ATP se detectó en el cono de crecimiento (Fig. 4C, 1,2,3), de acuerdo con la localización de P2X7R en neuronas del hipocampo (fig. 4A, B). La respuesta provocada por ATP se suprimía cuando las neuronas se trataban previamente con BBG, a una concentración de 1 μ M (Fig. 4C). Se obtuvieron idénticos resultados cuando se usaron Bz-ATP (100 μ M) y o-ATP (100 μ M) como agonista y antagonista de P2X7R, respectivamente (datos no mostrados). Por tanto, se concluye que los receptores de P2X7 son activos en el cono de crecimiento axonal, están implicados en la regulación del calcio en el cono de crecimiento, y actúan como mediadores del efecto del ATP en la regulación del crecimiento axonal.

Ejemplo 5

Los receptores P2X7 modulan la CAMKII en neuronas de hipocampo en cultivo

A continuación, se examinó qué vía de señalización intracelular podía estar regulada por P2X7R. Entre las quinasas de calcio sensibles al calcio, las propiedades específicas de la proteína quinasa II dependiente de calcio-calmodulina (CAMKII) la hacen un candidato adecuado para participar en la vía de señalización del receptor P2X7. CAMKII es una de las proteínas más abundantes en el cerebro, y se ha descrito previamente que se fosforila mediante activación de los receptores P2X7 en las células granulares cerebelares. Por tanto, se analizó la expresión de pCAMKII en los conos de crecimiento axonal, en neuronas control y tratadas con BBG (Fig. 5A, B). Resulta interesante que, cuando se cuantificó la expresión de pCAMKII en los conos de crecimiento axonal, se detectó una reducción significativa de la intensidad de fluorescencia de pCAMKII en los conos de crecimiento de neuronas tratadas con BBG ($85,93 \pm 2,34\%$), en comparación con neuronas control ($100 \pm 3,9\%$; Fig. 5B). Estos resultados sugieren que CAMKII es un mediador de P2X7R en el control de la elongación axonal. Adicionalmente, las alteraciones en la morfología de los conos de crecimiento se detectaron en neuronas tratadas con BBG, sugiriendo alteraciones en el citoesqueleto de actina que intervendrían en la elongación axonal incrementada (Fig. 5A).

Ejemplo 6

Los antagonistas de P2X7R modifican la morfología del cono de crecimiento y activan FAK

Según se ha mencionado, los cambios en la longitud y ramificación axonales inducidos por los antagonistas de P2X7 en las neuronas del hipocampo (Figs. 2 y 3), pueden ser debidos a alteraciones en el citoesqueleto de actina. Por tanto, se analizó primeramente la morfología de los conos de crecimiento axonal en neuronas control y tratadas con antagonistas de P2X7R. Los conos de crecimiento de neuronas tratadas con antagonistas de P2X7R mostraban una morfología de tipo filopodia, sin una lamelipodia expandida (fig. 6B, C), a diferencia de los conos de crecimiento más expandidos, observados en neuronas tratadas con vehículo (Fig. 6A).

A fin de estudiar cómo se producían estas modificaciones morfológicas, se estudió la posible relación con FAK (quinasa de adhesión focal). Esta proteína interactúa con la actina y controla la formación de contactos y la estabilidad de los lamelipodios. Por tanto, se analizó la expresión de FAK en los conos de crecimiento de neuronas tratadas con vehículo o BBG (Fig. 7A). Las neuronas control presentaban un elevado número de adhesiones focales a lo largo del lamelipodio, mientras que las neuronas tratadas con BBG presentaban un número reducido de adhesiones focales. A continuación, se estudió si la cantidad o actividad de FAK cambiaba en neuronas de hipocampo en cultivo, tras tratamiento con antagonistas de P2X7R. Las neuronas se trataron con BBG durante 30 y 60 minutos, y los resultados demuestran que el tratamiento con BBG incrementa el porcentaje de FAK activa (pFAK^{Y397}), después de 60 minutos de tratamiento (Fig. 7B).

Ejemplo 7

La actividad de la PI3-quinasa actúa como mediadora del crecimiento axonal inducido por la inhibición de P2X7

Los resultados anteriores demuestran que la inhibición de los receptores funcionales en el cono de crecimiento axonal favorece el crecimiento y ramificación axonales. Además, el crecimiento axonal estaba acompañado de cambios morfológicos en el cono de crecimiento, asociados con un incremento en la actividad de FAK. Se ha demostrado previamente que la FAK activa (FAK^{Y397}) puede incrementar la actividad PI3-quinasa, y que la actividad PI3-quinasa regula el crecimiento axonal. Por tanto, se analizó si la inhibición de la PI3-quinasa podía suprimir el crecimiento axonal inducido por inhibición de P2X7R y, por tanto, la PI3-quinasa era un componente de la cascada de señalización regulada por P2X7R. Se cultivaron neuronas durante 24 horas y, a continuación, se trataron con BBG 5 μ M y un antagonista de PI3-quinasa (LY-294002 (50 μ M)). Las neuronas se fijaron a los 3 DIV y se tiñeron con anticuerpo anti-tubulina. Las neuronas tratadas con BBG presentaban axones más largos y más ramificaciones que las neuronas control, como se había demostrado previamente (fig. 2), mientras que las neuronas tratadas con BBG y LY-294002, presentaban la misma morfología axonal que las neuronas control (Fig. 8A), sugiriendo que el crecimiento axonal

incrementado mediante la inhibición de P2X7R precisa la activación de la PI3-quinasa. A continuación, se evaluó si la actividad de las proteínas reguladas por la actividad de la PI3-quinasa se podía modular mediante la inhibición de P2X7. Por tanto, se trataron neuronas de hipocampo a los 2 DIV con BBG 5 μM durante 30 y 60 minutos. En estos extractos celulares, se observó que la fosforilación de Akt aumentaba, pero no era significativamente diferente. También se analizó el estado de fosforilación de GSK3, que también es posterior a PI3-quinasa y Akt en la cascada de señalización, y se ha relacionado con el crecimiento y ramificación axonales. La fosforilación de GSK3 se incrementaba significativamente por BBG después de 30 minutos de tratamiento, indicando que la actividad PI3-quinasa se incrementa mediante inhibición de P2X7R (Fig. 8B). Además, se trataron neuronas de hipocampo con BBG 5 μM , Ip51 1 μM y PPADS 30 μM desde 24 horas a 6 DIV y, en estas condiciones experimentales, sólo el tratamiento con BBG incrementaba la fosforilación de GSK3, mientras que los otros antagonistas de P2X7 no modificaban significativamente la fosforilación de GSK3 (Fig. 8C), demostrando que, entre los receptores ionotrópicos de ATP, P2X7R es el receptor que modula la actividad de la PI3-quinasa durante la regulación del crecimiento axonal.

Ejemplo 8

El tratamiento con BBG induce la fosforilación de GSK3 en neuronas de hipocampo en cultivo y en ratones "in vivo"

Los resultados anteriores demuestran que la inhibición de los receptores P2X7 funcionales en el cono de crecimiento axonal favorece el crecimiento y la ramificación axonales. Además, el crecimiento axonal estuvo acompañado de cambios morfológicos en el cono de crecimiento, asociados con una disminución de la expresión de FAK. A continuación, analizamos qué mecanismos intracelulares intervenían en este efecto en el crecimiento axonal. Se ha demostrado que la activación de FAK disminuye en células en las que se bloquea GSK-3 β , y estudios recientes han demostrado que GSK3 juega un papel clave en el crecimiento y ramificación axonales. Así, evaluamos si la fosforilación de GSK3 y su quinasa, Akt, estaban afectadas por la exposición a un agonista (Bz-ATP) o un antagonista (BBG) de P2X7R en neuronas de hipocampo en cultivo. Resulta interesante que el tratamiento con Bz-ATP (200 μM) durante 5 min redujo la cantidad de Akt activa (pAkt) en un significativo 20%, y este efecto podría explicar la menor reducción en GSK3 después del tratamiento con Bz-ATP (Fig. 9A). Para evitar la degradación extracelular de Bz-ATP mediante ectonucleotidasas, los tratamientos no se prolongaron durante más de 15 min. Los tratamientos con el antagonista de P2X7R, BBG, durante 30 y 60 minutos, incrementaron ambos la cantidad de GSK3 fosforilada en un 50%, simultáneamente con un incremento en la fosforilación de Akt (Fig. 9B). Cuando las neuronas se trataron con BBG durante 6 DIV, la fosforilación de GSK3 se incrementó significativamente (Fig. 9), mientras que el tratamiento con otros antagonistas de P2X, Ip51 y PPADS, no modificó la fosforilación de GSK3 incluso después de 6 DIV (Fig. 9C). La inhibición de GSK3 inducida por antagonistas de P2X7R apoya la reducción de la proteína FAK. Es más, tanto las neuronas carentes de FAK como las neuronas tratadas con antagonistas de GSK3 o antagonistas de P2X7R (Fig. 2) muestran el mismo fenotipo en cultivo.

A continuación, se abordó la cuestión de si el uso del antagonista de P2X7R, BBG, en ratones puede afectar a la plasticidad neuronal regulando la actividad de GSK3. Descifrar los mecanismos que regulan la actividad de GSK3 en el cerebro del adulto es crucial, pues esta proteína juega un papel importante en diferentes enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer y los trastornos del estado de ánimo. Con el fin de examinar la relación entre GSK3 y P2X7R, así como para confirmar los mecanismos en los que P2X7R actúa como mediador en un modelo "in vivo", se bloqueó farmacológicamente el receptor de P2X7 tratando ratones adultos con BBG. Así, 10 ratones tipo silvestre (de 7 meses de edad) se dividieron en dos grupos diferentes, uno que recibió inyecciones intraperitoneales (i.p.) de BBG (a una dosis de 45,5 mg/kg) cada 48 h, mientras que en el otro grupo el BBG fue sustituido por PBS. La infusión de PBS o BBG no dio como resultado ninguna anomalía morfológica visible y no estuvo asociada con ningún síntoma obvio en los ratones. Los tratamientos se mantuvieron durante 4 meses, y luego se diseccionaron los hipocampos. La concentración de BBG en el hipocampo se midió mediante espectrofotometría. Los ratones tratados con el antagonista de P2X7 alcanzaron niveles de BBG de $18,04 \pm 6,94 \mu\text{M}$ en plasma y $183,1 \pm 9,5 \text{ nM}$ en cerebro.

Luego, se midió en extractos de hipocampo la cantidad total de GSK3 y su fosforilación en ratones a los que se había administrado PBS o BBG. Resulta interesante que se observara una disminución significativa de la proteína GSK3 total en los ratones que recibieron BBG en comparación con los ratones control (reducción de $33,2 \pm 5,66\%$, (Fig. 7B,C). Además, los ratones a los que se les administró BBG también mostraron un incremento significativo de la fosforilación inhibidora de GSK3 en las serinas 9/21 (incremento de $63,44 \pm 8,18\%$, Fig. 7B,C). En consonancia con ello, los niveles de Tau-1 se incrementaron en $60,32 \pm 24,8\%$, a continuación del tratamiento con BBG, simultáneamente con una reducción en los niveles de PHF-1 de $57,94 \pm 9,62\%$. Además, se analizó la expresión de FAK en los mismos ratones. Resulta interesante que la expresión de FAK se redujo significativamente ($46,18 \pm 6,11\%$) en ratones tratados con BBG en comparación con los ratones tratados con PBS.

Ejemplo 9

El tratamiento con BBG in vivo induce la expresión de proteínas sinápticas de membrana en el hipocampo

Nuestros resultados previos muestran que los antagonistas de P2X7R inducen la inhibición de GSK3, que afecta a las proteínas asociadas con microtúbulos y al citoesqueleto de actina, y finalmente producen un fenotipo neuronal caracterizado por un incremento en el crecimiento y la ramificación axonales. La siguiente cuestión del presente trabajo fue evaluar si los niveles de marcadores asociados a sinapsis también estaban modificados en los ratones tratados con

ES 2 338 970 B1

BBG. Tal como se esperaba, cuando se midieron las concentraciones de las proteínas presinápticas de membrana, se observó un claro y significativo incremento en syntaxina ($16,93 \pm 3,66$ veces) y SNAP25 ($2,22 \pm 0,31$ veces, Fig. 10) en los ratones tratados con BBG, frente a los ratones tratados con PBS. Sin embargo, el análisis de las proteínas asociadas a vesículas sinápticas sinaptofisina y V-GLUT1 no reveló cambios entre los ratones a los que se les había administrado BBG y los que recibieron PBS (Fig. 10). Finalmente, también se midieron los niveles de P2X7R en todos los ratones. Resulta interesante destacar que hubo una disminución significativa de $54,98 \pm 17,30\%$ en la expresión de P2X7R en los ratones que recibieron BBG, en comparación con los ratones control (Fig. 10). Estos datos enfatizan un papel de los receptores de P2X7 en el control del crecimiento del axón, pues la reducción de la expresión de P2X7R está acompañada por un incremento en las proteínas de membrana sináptica, que podría reflejar un número incrementado de contactos sinápticos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 338 970 B1

REIVINDICACIONES

5 1. Uso del antagonista del receptor P2X7 Brilliant Blue G, y vehículos farmacéuticamente aceptables, para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades o estados asociados con: a) ausencia o reducción de crecimiento axonal; b) pérdida de colaterales axonales; c) lesión nerviosa; d) pérdida o degeneración de las conexiones sinápticas.

10 2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el Brilliant Blue G se administra en una cantidad de 45 mg/kg de peso, suficiente para inhibir la enzima GSK3.

3. Uso según la reivindicación 1, en el que dichos medicamentos están diseñados para ser administrados por vía intravenosa.

15 4. Uso según la reivindicación 1, en el que dichos medicamentos están diseñados para ser administrados por vía intraperitoneal.

20 5. Uso según la reivindicación 1, en el que dichos medicamentos están destinados a ser suministrados a neuronas embrionarias de mamífero no humano *in vitro* para potenciar su crecimiento axonal y diferenciación, produciendo neuronas endógenas susceptibles de ser trasplantadas a un paciente afectado por las enfermedades descritas en la reivindicación 1.

25 6. Uso según la reivindicación 1, en el que dichos medicamentos están destinados a ser suministrados a neuronas embrionarias exógenas de mamífero no humano, trasplantadas a un paciente afectado por las enfermedades descritas en la reivindicación 1, para potenciar la diferenciación de dichas neuronas.

7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha enfermedad o estado es una lesión de la médula espinal.

30 8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha enfermedad o estado es una patología cognitiva que cursa con pérdida de conexiones sinápticas.

9. Uso según la reivindicación 8, en el que dicha enfermedad o estado es la enfermedad de Alzheimer.

35 10. Uso según la reivindicación 8, en el que dicha enfermedad o estado es la isquemia cerebral.

11. Uso según la reivindicación 8, en la que dicha enfermedad o estado es la epilepsia.

40 12. Uso según la reivindicación 8, en el que dicha enfermedad es la esquizofrenia.

13. Uso según las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha enfermedad o estado es una patología motora relacionada con la pérdida de conexión entre neuronas y músculos o con una menor actividad presináptica.

45 14. Uso según la reivindicación 13, en el que dicha enfermedad o estado es la esclerosis lateral amiotrófica.

15. Uso según la reivindicación 13, en el que dicha enfermedad o estado es la miastenia gravis.

50 16. Uso según la reivindicación 12, en el que dicha enfermedad o estado es la pérdida de inervación por intoxicación con toxina botulínica.

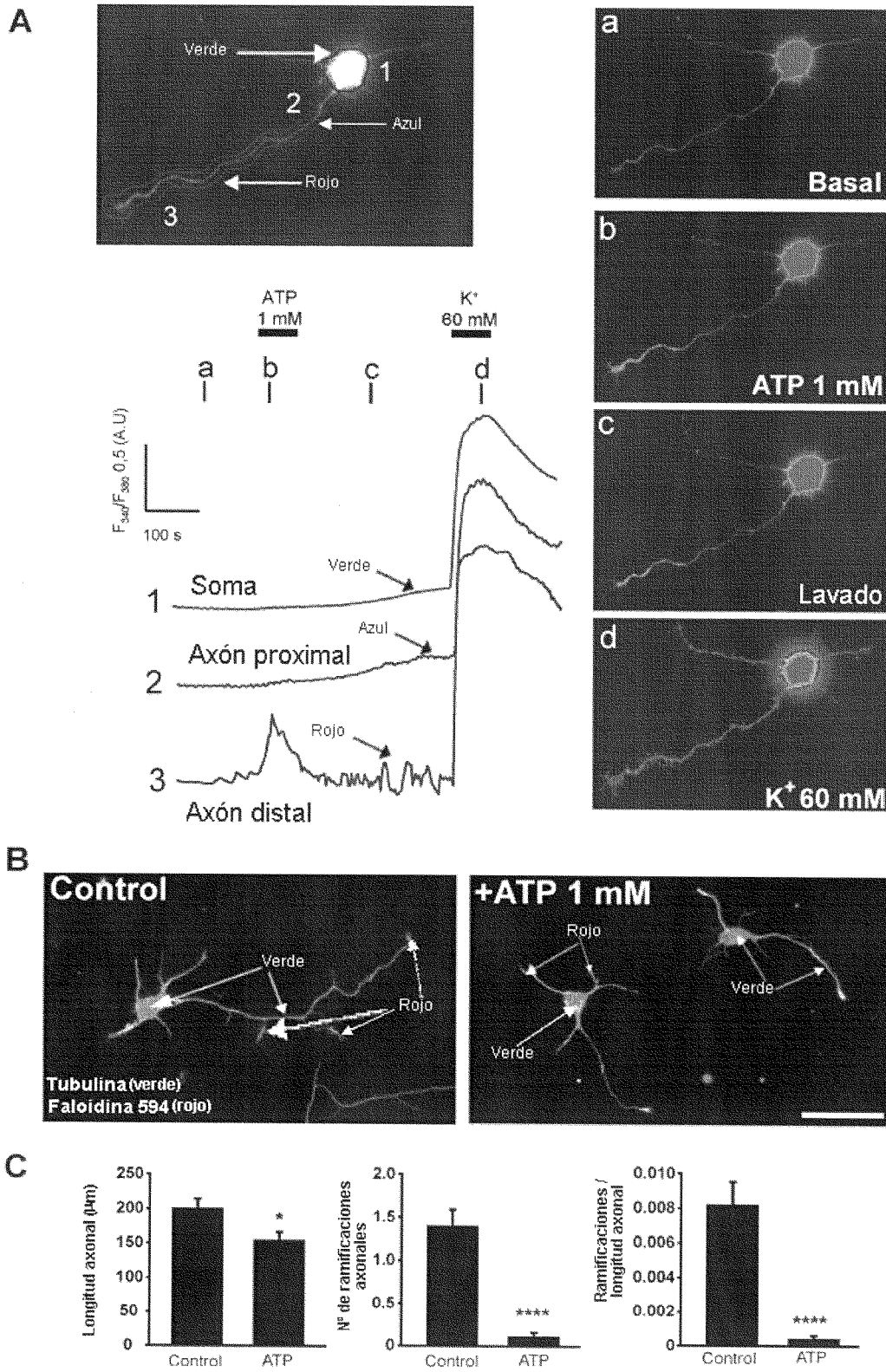


FIG. 1

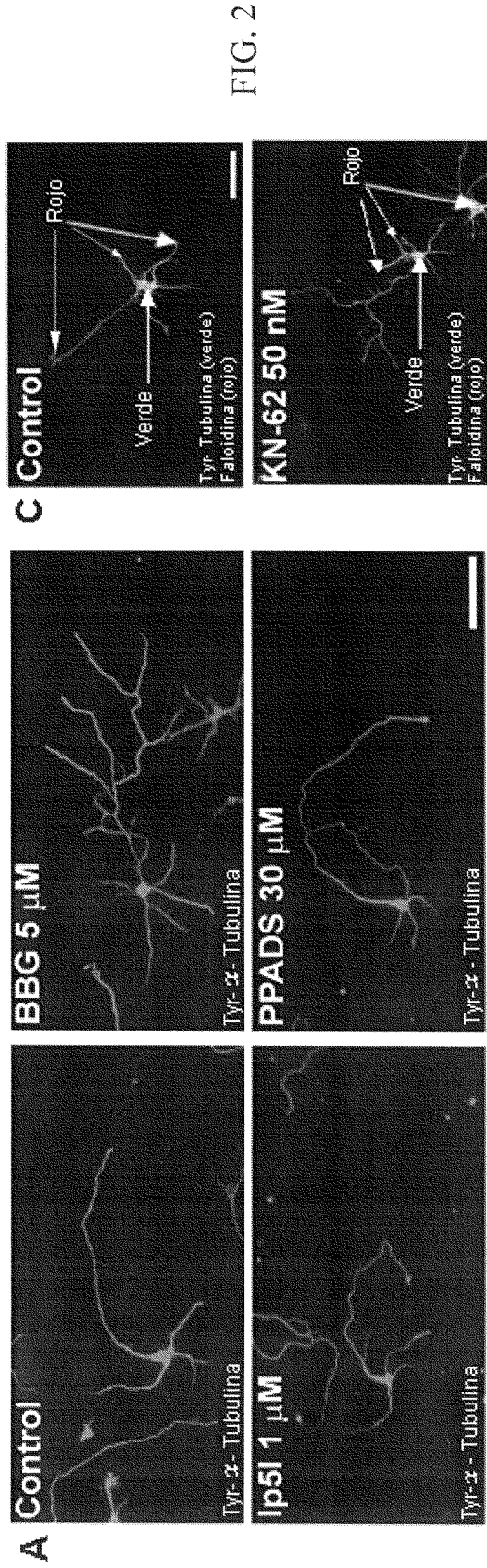
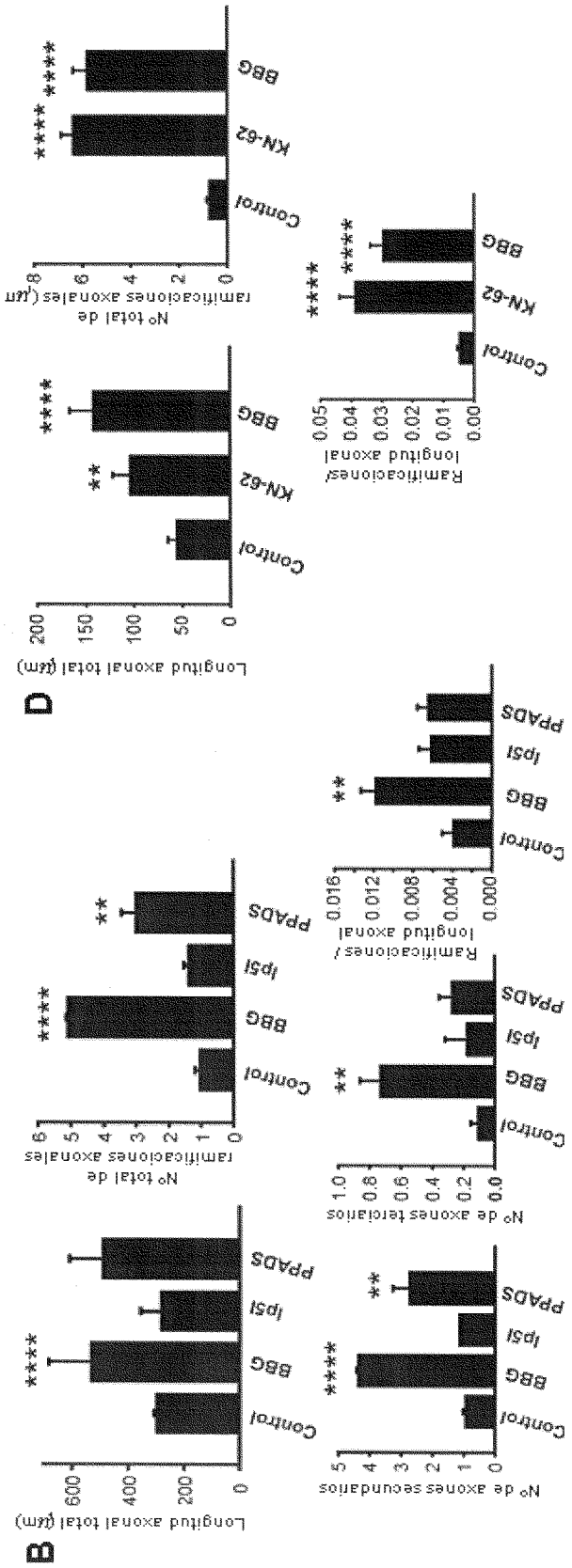
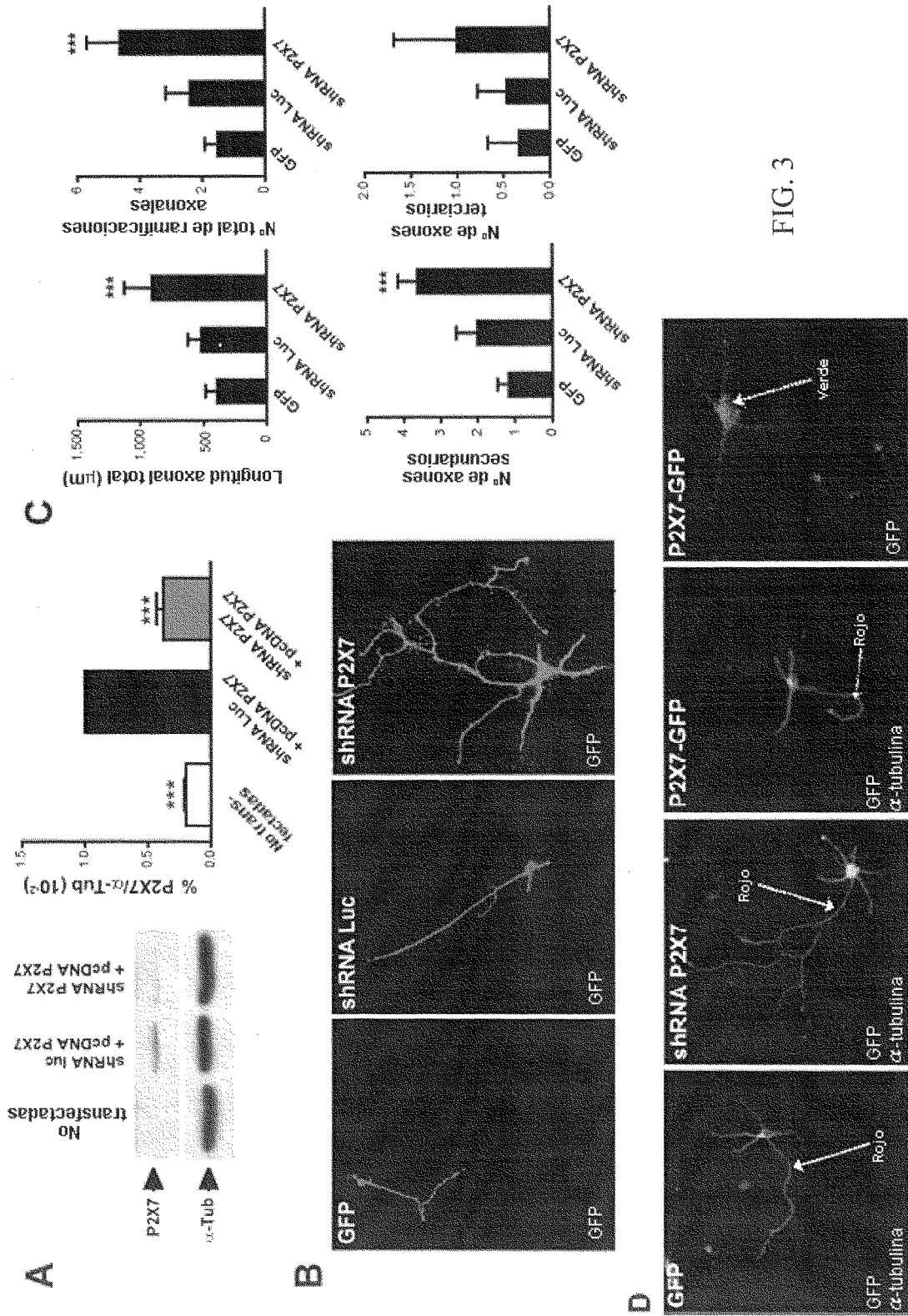


FIG. 2





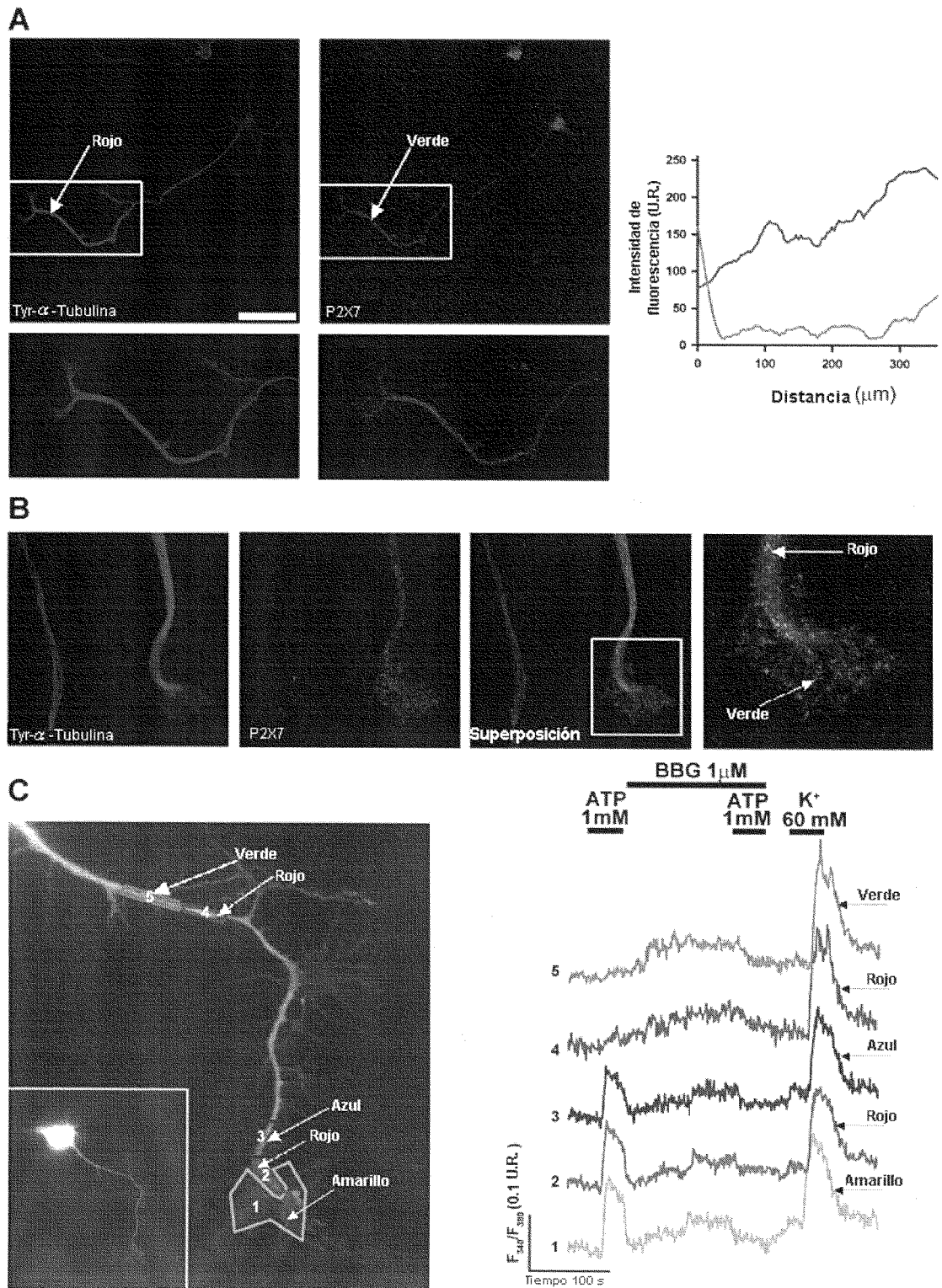


FIG. 4

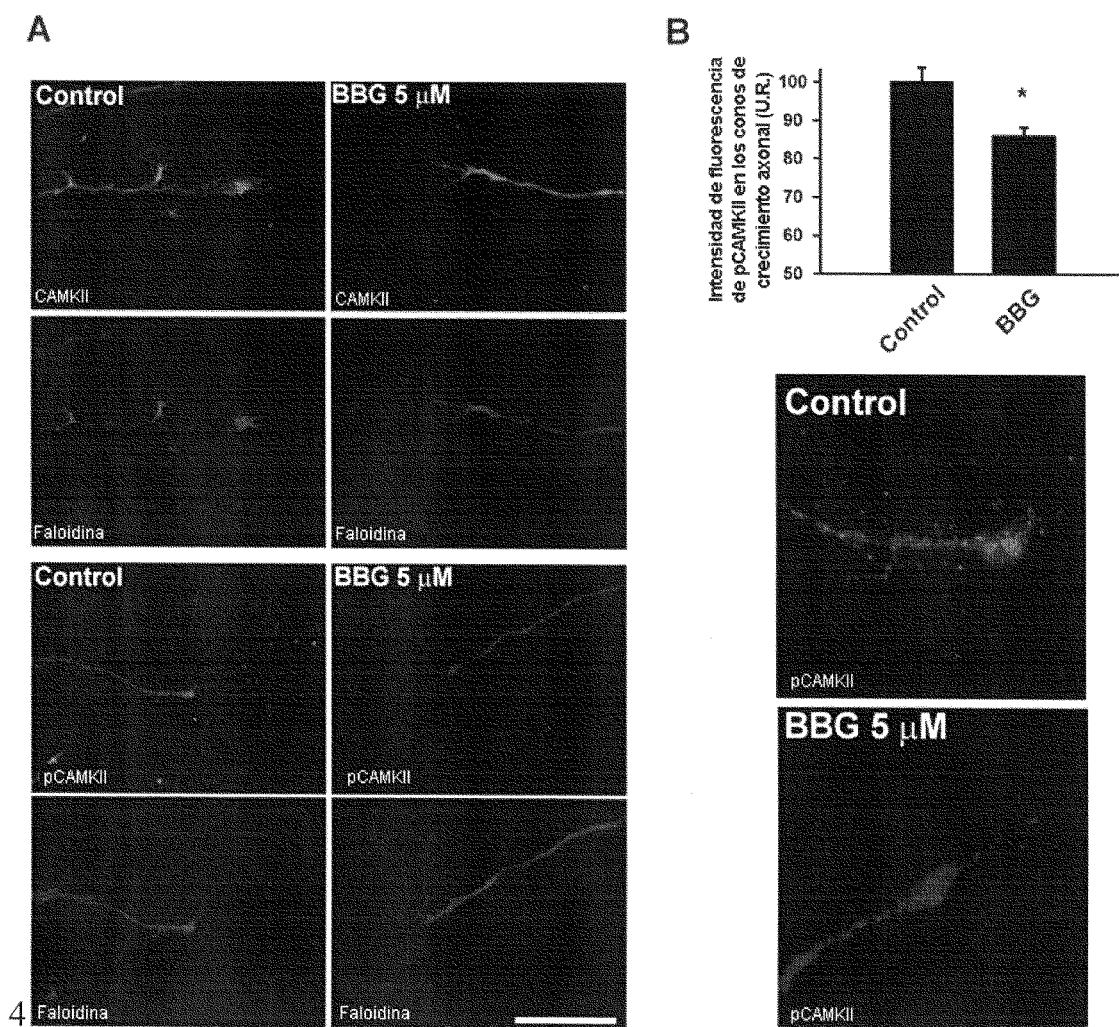


FIG. 5

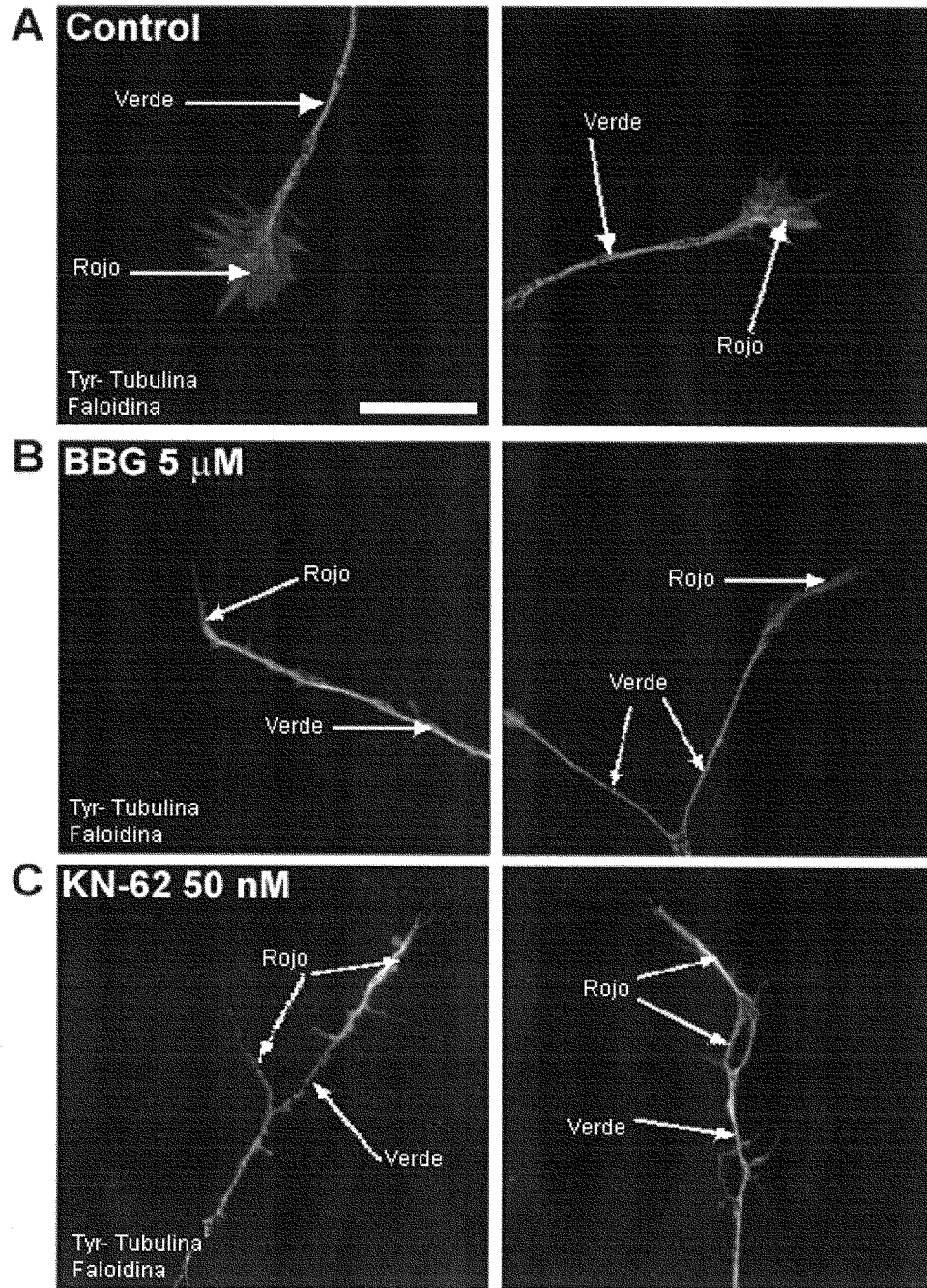


FIG. 6

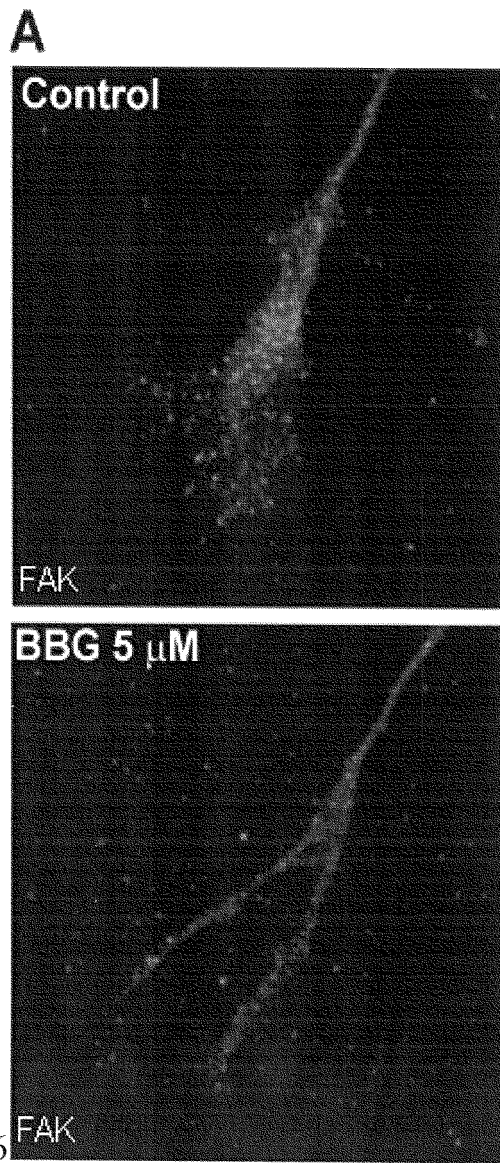


FIG. 6

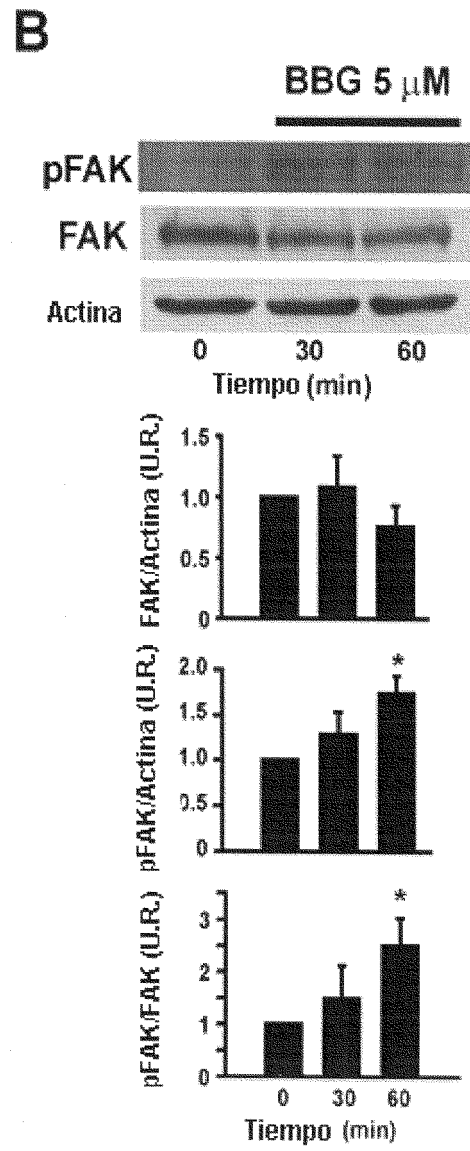


FIG. 7

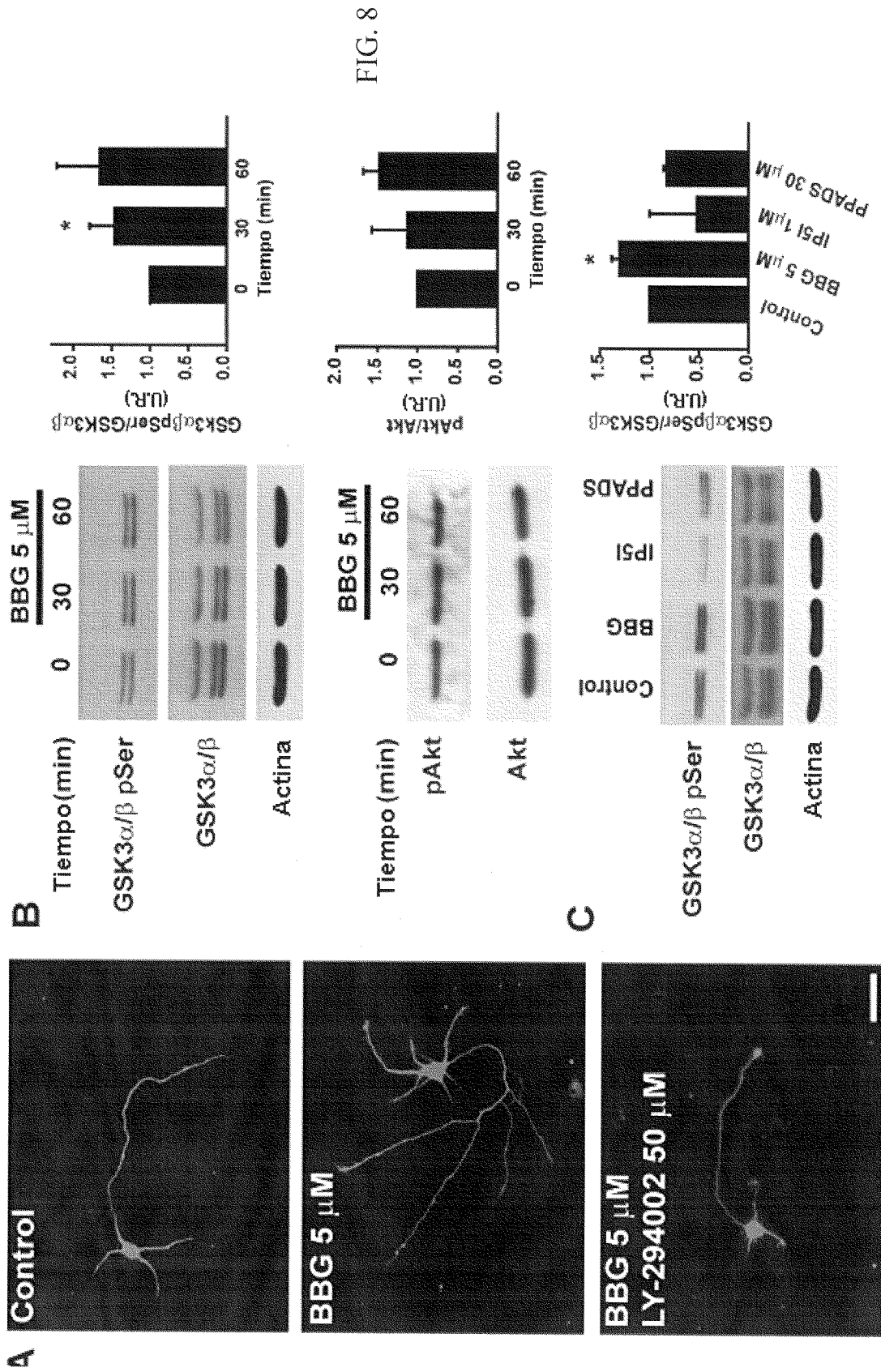


FIG. 8

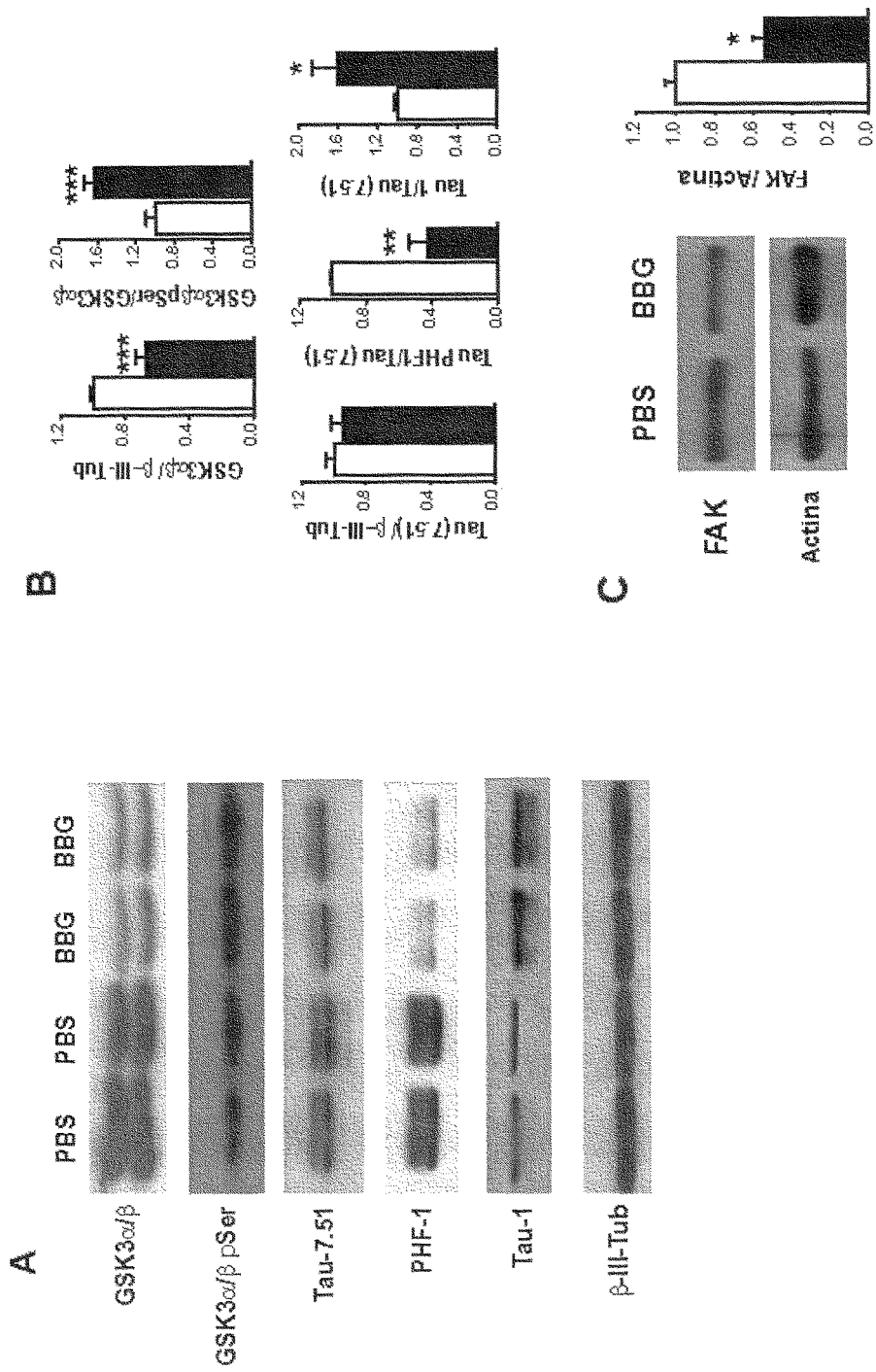


FIG. 9

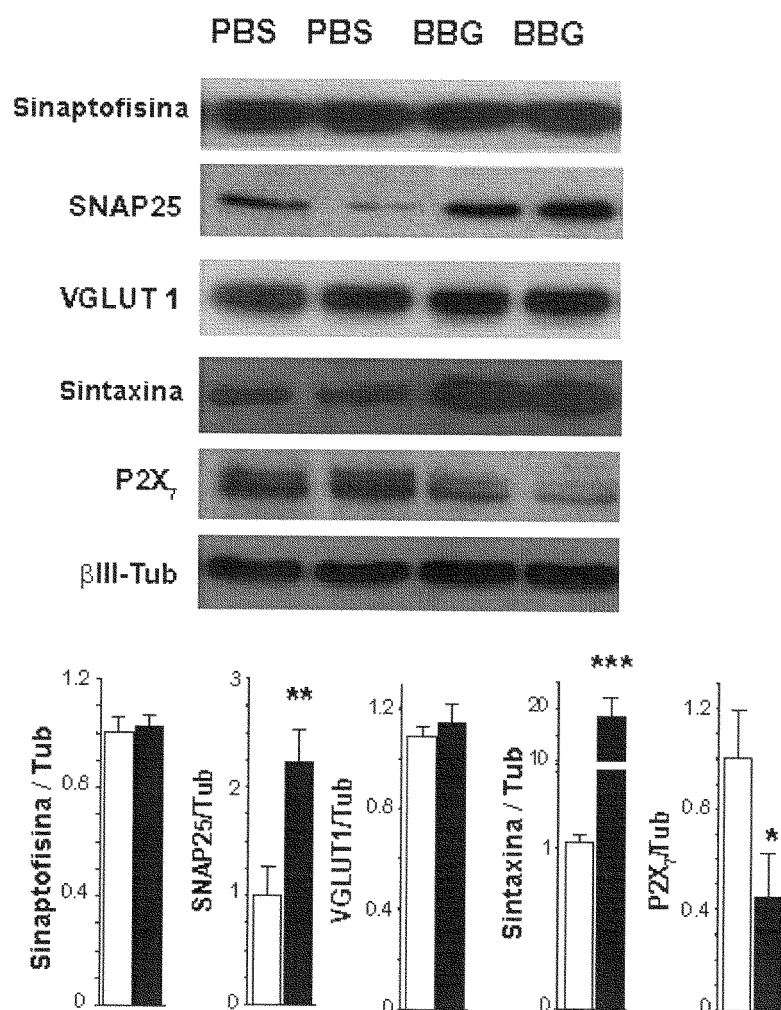


FIG. 10



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 338 970

② Nº de solicitud: 200802281

③ Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2005041892 A2 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC. & NEW YORK MEDICAL COLLEGE) 12.05.2005, todo el documento, especialmente resumen; párrafos [0024,0031,0033]; reivindicaciones.	1,3,4,7,8,10
X	SPERLÁGH, B. et al. P2X7 receptors in the nervous system. Progress in Neurobiology. Abril 2006. Vol. 78, nº 6, páginas 327-346. ISSN 0301-0082. Ver todo el documento, especialmente resumen y apartado 8 (páginas 338-340).	1,7-11,13
X	WO 2006130676 A2 (DUSKA SCIENTIFIC CO.) 07.12.2006, todo el documento, especialmente página 2, líneas 1-5,11-20; página 5, líneas 1-11; página 6, líneas 4-5; página 14, líneas 14-18; ejemplo 3; reivindicaciones 1,2,10-12,18.	1-4
X	GUENTHER, A., et al. Role of P2X7 receptors in cerebral ischemia models - in vitro and in vivo. Journal of Neurological Sciences. 10.11.2005. Vol. 238 (Poster Abstracts), página S398, resumen nº 1168. ISSN 0022-510X. Ver todo el documento.	1,8,10
A	WO 2005014007 A1 (UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO) 17.02.2005, todo el documento.	
A	MATUTE, C., et al. P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. The Journal of neuroscience : the official Journal of the Society for Neuroscience. 29.08.2007. Vol. 27, nº 35, páginas 9525-9533. ISSN 1529-2401 (Electrónico). Ver todo el documento.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.04.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 338 970

② Nº de solicitud: 200802281

③ Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ANDERSON, C.M., et al. Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. Trends in neurosciences. Mayo 2006. Vol. 29, nº 5, páginas 257-262. ISSN 0166-2236. Ver todo el documento.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.04.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

2/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 31/095 (2006.01)

A61P 21/04 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.04.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2,5,6,9,11-16	SÍ
	Reivindicaciones	1,3,4,7,8,10	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	5,6,12,14-16	SÍ
	Reivindicaciones	1-4,7-11,13	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2005/041892 A2	12-05-2005
D02	SPERLÁGH, B. et al.	04-2006
D03	WO 2006/130676 A2	07-12-2006
D04	GUENTHER, A., et al.	10-11-2005
D05	WO 2005/014007 A1	17-02-2005
D06	MATUTE, C., et al.	29-08-2007
D07	ANDERSON, C.M., et al.	05-2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe el uso del compuesto Brilliant Blue G (BBG), un antagonista del receptor P2X7, para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con reducción en el crecimiento axonal, pérdida de colaterales axonales, lesiones nerviosas y pérdida de conexiones sinápticas.

El documento D01 divulga el uso de antagonistas del receptor P2X7 para tratar lesiones de médula espinal, e incluye entre estos antagonistas el compuesto de la invención, BBG. El documento reivindica la utilización de estos antagonistas en el tratamiento de lesiones cerebrales y medulares, incluyendo isquemia y daños traumáticos, y la administración de los compuestos por distintas vías, entre ellas, la vía intraperitoneal y la intravenosa. Por consiguiente, el documento D01 afecta la novedad de las reivindicaciones 1,3,4,7,8 y 10 de la presente solicitud, que no cumplirían el requisito del artículo 6 de la Ley de Patentes.

En el documento D02 se describe la relación existente entre los receptores de P2X7 y varias enfermedades neurológicas, tales como isquemia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, daños de la médula espinal o neuropatías sensoriales. Este documento divulga también el potencial terapéutico de los antagonistas de estos receptores, y describe el BBG como uno de los más potentes y selectivos de estos antagonistas. A la luz de la información encontrada en D02, resultaría evidente para el experto en la materia utilizar el compuesto BBG para bloquear los receptores P2X7, y emplearlo para tratar las enfermedades neurodegenerativas. Por tanto, el documento D02 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1,7-11 y 13 de la solicitud, que, por ello, no cumplen el requisito del artículo 8 de la Ley de Patentes.

En el documento D03 se divulga nuevamente el uso del agente BBG como inhibidor del receptor P2X7, para el tratamiento de daños neuronales, por lo que este documento afecta también la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 4 de la solicitud. A pesar de que la dosis empleada en el ejemplo 3 de D03 no coincida con la reivindicada en la solicitud, no se considera que el empleo de la dosis concreta de la reivindicación 2 confiera actividad inventiva a la solicitud, pues tanto en D03 como en la solicitud, el único requisito es que las dosis sean suficientes para conseguir la inhibición de los receptores, cosa que se consigue en ambos casos. Por tanto, las reivindicaciones 1 a 4 de la solicitud no cumplen el requisito de actividad inventiva del artículo 8 de la Ley de Patentes.

El documento D04, un breve resumen del tratamiento de isquemia cerebral con BBG, afecta igualmente la actividad inventiva de las reivindicaciones 1,8 y 10 de la solicitud.

En los documentos D05 y D06 se describe el efecto de las sustancias antagonistas de los receptores P2X en el tratamiento de enfermedades desmielinizantes. Aunque entre los compuestos antagonistas empleados se incluye el BBG, en D05 y D06 el estudio se limita al efecto de los mismos en la reducción de la pérdida de la mielina, por lo que se considera que estos documentos no afectan la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.

Del mismo modo, también D07 se considera un mero documento del estado de la técnica, que no afectaría la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud, pues se limita a una descripción de la función de los receptores P2X7 presentes en las conexiones nerviosas y su efecto en la función neurotransmisora, y al posible papel de los antagonistas del receptor (incluido el BBG) como protectores neuronales.