

119 1/3
62

G. HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA.

53181

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 02013025 00000004 Folios: 75
Fecha (AMD): 2002-06-04 15:16:13
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Re: Expediente No. 02013025

Solicitud de patente.

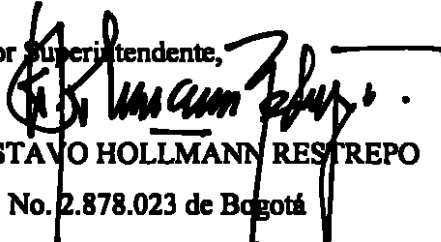
Solicitante: AVENTIS PHARMACEUTICALS INC.

Yo, GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO, vecino de Bogotá D.C., portador de la tarjeta profesional No. 5903, obrando como apoderado en este negocio, digo a usted que doy respuesta parcial al auto No. 9637 notificado por estado el 21 de marzo de 2002, en los siguientes términos:

1. El lugar de constitución de la sociedad es Somerset Corporate Boulevard, Bridgewater, New Jersey, Estados Unidos de América.
2. Acompaño el documento de poder de la sociedad AVENTIS PHARMACEUTICALS INC., domiciliada en Somerset Corporate Boulevard, Bridgewater, New Jersey, Estados Unidos de América, en el que consta la existencia, constitución y representación legal de la sociedad y el cual me faculta para obrar en este caso, debidamente traducido y legalizado, en fotocopia autenticada.
3. Acompaño la traducción al castellano de la memoria descriptiva y reivindicaciones.

El término para presentar la documentación faltante vence el próximo 19 de julio, lo cual haremos antes de esta fecha.

Señor Superintendente,


GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO

C.C. No. 2.878.023 de Bogotá

T.P. No. 5903.

120

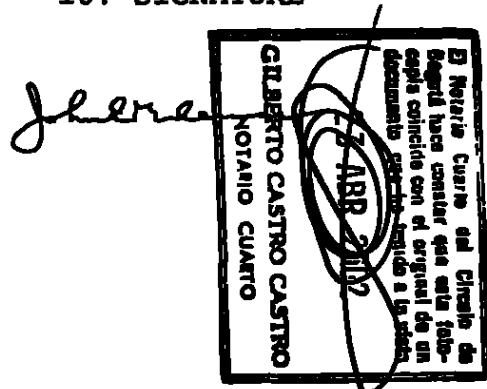
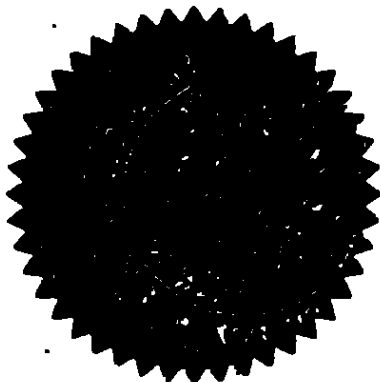
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
R. PETER WIDIN
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
COUNTY CLERK
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
COUNTY OF SOMERSET

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 9TH DAY OF APRIL 2002
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A149012
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



269
121

The undersigned, acting on behalf of and representing of AVENTIS PHARMACEUTICALS INC, domiciled in 300 Somerset Corporate Boulevard, Bridgewater, New Jersey, USA, hereby appoint(s) GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO and/or LUIS PATIÑO LEYVA, domiciled in Bogotá D.C., Republic of Colombia, as our true and legal attorney with the necessary powers:

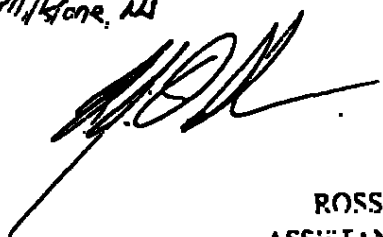
1) To apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial designs and models, commercial engravings and names, trademarks, slogans, health licenses, copyrights and domain names as well as their assignments, extensions, renewals and changes of name; 2) To prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3) To intervene as plaintiff or defendant, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial, administrative or police action, such as: action dealing with commercial engravings and names; oppositions against trademark registrations; caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and working of license agreements; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on all sort of industrial property matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to intellectual property matters.

To this effect, I (we) hereby authorize him to file applications, make descriptions, protests, amendments, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by Law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the above mentioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect my (our) interests, with all other necessary legal faculties, and I (we) hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to my (our) benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on my (our) behalf any action, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, substituting and revoking substitutions, taking notifications, and appointing judicial or extra-judicial attorneys.

Signed in on this 1st day of March of 2002.

Est. M. H. G. M.



ROSS J. OEHLER
ASSISTANT SECRETARY

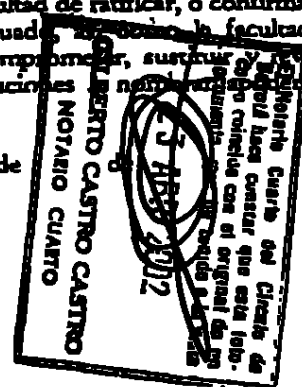
Yo (nosotros), obrando en nombre propio y representación de AVENTIS PHARMACEUTICALS INC, con domicilio en 300 Somerset Corporate Boulevard, Bridgewater, New Jersey, Estados Unidos de América, nombro(amos) a GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO y/o LUIS PATIÑO LEYVA, con domicilio en Bogotá D.C., República de Colombia, Cra 11^a No 94-76, Oficina 308, apoderado verdadero y legal, con poder especial, amplio y suficiente:

1) Para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, dibujos y modelos industriales, registro de marcas, registro de lemas comerciales, depósito de nombres y enseñanzas comerciales, registros sanitarios, derechos de autor y nombres de dominio así como sus traslapes, prórrogas, renovaciones y cambios de nombre; 2) Elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clases; 3) Intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas de nombre o enseña comerciales; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal, demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos, u observaciones a cualquier asunto sobre propiedad intelectual; al ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad intelectual.

A este efecto, lo facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la Ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando al descargo respectivo, y en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las facultades necesarias, y por este documento desde ahora declaro(amos) válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en mi (nuestro) beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar, o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado, así como la facultad de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones, y tomar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en el de



420
122

NOTARIAL CERTIFICATE (Corporation)

UNITED STATES OF AMERICA)
STATE OF NEW JERSEY) ss.
COUNTY OF SOMERSET)

On this 1st day of March, 2002, personally appeared before me, Ross J. Oehler, Assistant Secretary, known or identified to me to be the individual described in and who executed the foregoing document, Power of Attorney, and acknowledged the same as a free act and deed for uses and purposes therein expressed by authority of the said Corporation incorporated under the laws of the State of Delaware, United States of America.

I further certify that said authority, dated November 29, 2000, is based on a Resolution of the Board of Directors of said Corporation, which I have seen, appointing the said individual Attorney-in-fact with full power to sign the foregoing document on behalf of the said Corporation and that the purposes for which said document is granted are within the scope of the objects or activities of said Corporation,

SEAL

Nancy J. Ingram
Notary Public

Nancy J. Ingram
Notary Public, State of New Jersey
My Commission Expires August 2, 2004

Notary Signature
Print or Type Name
of Notary: Evaluation

STATE OF NEW JERSEY }
COUNTY OF SOMERSET }

ss.: I, PETER R. WIDIN, Clerk of the County of Somerset and also Deputy Clerk of the Superior Court in and for said County, the same being a Court of Record, Do Hereby Certify, that

Nancy J. Ingram

whose name is subscribed to the certificate of acknowledgment, proof or affidavit of the annexed instrument, was at the time of taking such acknowledgment, proof or affidavit, a

NOTARY PUBLIC

in and for said State, duly appointed, qualified, commissioned, sworn in and authorized by law to take affidavits, acknowledgements or proofs of deeds or conveyances for lands, tenements or hereditaments and other instruments in writing in said State of New Jersey. And I further certify that I am well acquainted with the handwriting of said official and do hereby believe the signature to the said certificate of acknowledgment, proof or affidavit is genuine.

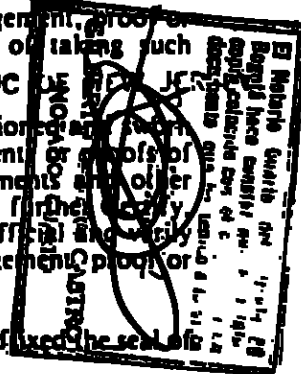
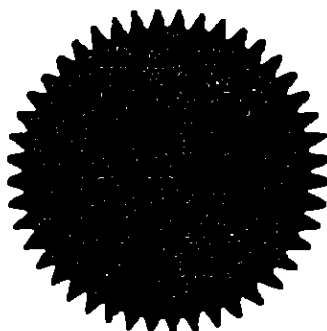
In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and affixed the seal of said County on

APR - 5 2002

R. PETER WIDIN

Clerk.

by *Deborah L. Anderson* Special Deputy Clerk.



ESTADO DE NEW JERSEY,, CONDAO DE SOMERSET

Yo, Peter S. Widin, Secretario del Condado de Somerset y Secretario Suplente de la Corte Superior de dicho Condado, la cual es una Corte de Registro, certifico que Nancy J. Ingram, cuyo nombre aparece suscrito al certificado de reconocimiento, prueba o declaración del instrumento adjunto, era en el momento de tomar tal reconocimiento, prueba o declaración Notaria Pública en y para el Estado de New Jersey, debidamente nombrada, calificada, comisionada y juramentada y autorizada por la ley para tomar declaraciones, reconocimientos o pruebas de escrituras o trasposos de tierras, tenencias o herencias y otros instrumentos escritos en el mencionado Estado. Y certifico además que conozco bien la firma de dicha funcionaria y estoy convencido de que la firma que aparece en el mencionado certificado de reconocimiento, prueba o declaración es genuina.

En testimonio de lo cual coloco mi firma y el sello del Condado el día de hoy 5 de Abril del 2002.

R. Peter Widin, Secretario

Deborah L. Anderson, Secretaria Especial Suplente

(Firma y Sello Oficial)

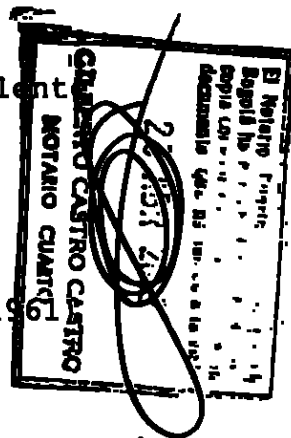
APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. Ha sido firmado por: R. Peter Widin
3. En su calidad de: Secretario del Condado
4. Y lleva el sello: del Condado de Somerset

Confirmado

5. En: Trenton, New Jersey
6. El día: Abril 9/2002
7. Por: John E. McCormac, CPA, Tesorero de New Jersey
8. Bajo el No.: A149012
9. Sello: Secretaría de Estado de New Jersey
10. Firma: (ilegible)



M. Méndez S

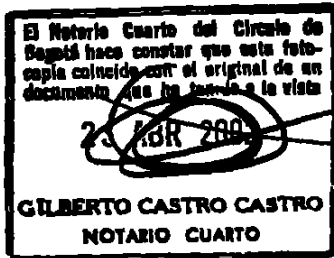
MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

223893
JH. Mendes
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002 APR 22 P 12:19

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



124 ✓ 72

TRADUCCION OFICIAL DEL INGLES de las certificaciones y la Apostilla adjuntas al poder que la compañía AVENTIS PHARMACEUTICALS INC domiciliada en Bridgewater, New Jersey, E.U.A., otorga a Gustavo Hollmann Restrepo y/o Luis Patiño Leyva.

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)

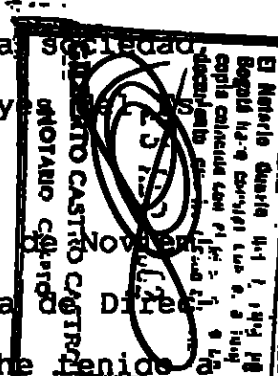
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

ESTADO DE NEW JERSEY

CONDADO DE SOMERSET

El día 1° de Marzo del año 2002 ante la suscrita Notaria compareció personalmente Ross J. Oehler, Secretario Suplente, quien yo sé o quien comprobó ante mí que es la persona mencionada en el adjunto poder y quien lo ejecutó, y él reconoció haber ejecutado dicho instrumento como un acto libre y voluntario destinado para los usos y propósitos allí expresados en virtud a la autoridad que le concede la mencionada sociedad la cual está incorporada de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Certifico además que dicha autoridad, fechada el 29 de Noviembre del 2000, se basa en una resolución de la Junta de Directores de la mencionada sociedad, documento que yo he tenido a la vista, nombrando a la mencionada persona apoderado con todo poder para firmar el instrumento adjunto en nombre de dicha sociedad, y que los propósitos para los cuales se otorga dicho instrumento se encuentran dentro del alcance de los objetivos o actividades de la mencionada corporación.



Nancy J. Ingram

Notaria Pública del Estado de New Jersey

Mi comisión expira Agosto 2 del 2004

(Firma y Sello Oficial).

METODO PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES O CONDICIONES DESMIELINANTES

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad neurológica inflamatoria y degenerativa que afecta el sistema nervioso central, y se asocia con la formación de placas neuronales y el deterioro de la conducción neuronal debido a la desmielinación (pérdida de mielina). De igual manera, la desmielinación extensiva comúnmente se presenta en el trauma de la médula espinal y en la apoplejía (Burge et al., 1993; Blight y DeCrescito, 1986; Pendlebury et al, 200).

La investigación básica sobre la fisiología de la propagación potencial del movimiento en fibras mielinadas mostró que el bloqueo en la conducción en fibras desmielinadas era en parte debida a la aparición de canales de potasio sensibles a la aminopiridina en áreas de pérdida de mielina (Bever 1996).

Los potenciales de movimiento se propagan a lo largo de fibras nerviosas normales mielinadas mediante un proceso de conducción saludadora, que resulta de una corriente de sodio generada por la apertura de canales de sodio sensibles al voltaje en el nudo de Ranvier. Así, al inicio de la estimulación eléctrica, iones de sodio (Na^+) entran en la neurona, causando que la neurona se cargue positivamente. Cuando la naturaleza positiva de la neurona se acerca a un nivel crítico, ocurre la "despolarización". La despolarización permite que un núcleo de iones fluya por la neurona, a lo largo del axón y a la terminación del nervio. Para

que la neurona se "vuelva a encajar", el exceso de carga positiva se debe disipar. Esto se hace a través del efluio de iones de potasio (de aquí en adelante llamados "K") a través de canales de potasio. Cuando la mielina se desorganiza, los canales de potasio sensibles al voltaje que se abren durante la despolarización aparecen en el axolema. La corriente de potasio, que fluye opuesta a la corriente de sodio, disminuye la duración y amplitud potencial del movimiento, contribuyendo a la falla en la conducción disminuyendo las densidades distales de corriente efectivas. Estas faltas de conducción se asocian con condiciones de incapacidad, incluyendo la debilidad muscular. Bloqueando el flujo de "K" a través de los canales de potasio, la neurona permanece despolarizada un mayor tiempo y se puede re-estimular más fácilmente. Así, se cree que los bloqueadores de canales de potasio son útiles en el tratamiento de enfermedades y condiciones que impiden la transmisión potencial de movimiento tales como MS, Daño Traumático del Cerebro (de aquí en adelante llamada "TBI") y el Daño de la Médula Espinal (de aquí en adelante llamada "SCI").

Los bloqueadores de los canales de potasio, tales como 4-amino piridina (de aquí en adelante llamada "4-AP"), aumenta la amplitud y la duración potencial del movimiento en las fibras desmielinadas y mejoran la propagación potencial del movimiento in vitro (Bostock et al, 1978; 1981; Targ y Cócix, 1985; 1986; Shi y Blight, 1997), facilita la liberación de neurotransmisores (Bostock et al, 1981; Hirsh y Quandt, 1993; Sherrat et al, 1980), y potencializa la contractibilidad muscular (Agoston et al, 1982; Savage et al, 1985). Estas observaciones sugerían que los bloqueadores de los canales de potasio, tales como el 4-AP, podían restaurar la conducción en fibras desmielinadas en pacientes con MS. Los resultados de ensayos clínicos posteriores apoyaron aún más la propuesta de que el tratamiento de aminopiridina podía mejorar los síntomas en algunos pacientes con MS (Jones et al 1983; Stefoski et al, 1987; Davis et al, 1990; van Diemen et al, 1992; Bever et al, 1994; Schwid et al, 1997).

La 4-AP también ha revelado su eficacia in el tratamiento de condiciones neurológicas incluyendo el SCI, reducción del dolor crónico y la espasmosis en pacientes con SCI, enfermedad de Alzheimer, síndrome post-polio, miastenia gravis, enfermedad de Huntington, trastornos de memoria relacionados con la edad, síndromes post-traumático, post-apoplejía o post-tóxico que afectan la memoria o la cognición, y la disautonomía (Wurtman RJ y Buyukuysal R, 1989; Hansebout RR y Blight A, 1996; Hansebout RR y Blight A 1994). Estudios clínicos para el uso de Fampridine-SR en pacientes con lesión de largo tiempo en la médula espinal han comenzado (Potter et al, 1998a,b) a pesar de la preocupación por la seguridad alrededor del uso de 4-AP en la población general de pacientes (Esclerosis Múltiple, Cognos Study #51, Decisions Resources, octubre, 1999; pp 77-8). Varios estudios han mostrado que dosis simples de 4-AP pueden restaurar algunas funciones en pacientes con SCI cuando se administran un año o más después de la lesión (Potter et al, 1998a,b; Qiao et al, 1997; Hayes et al, 1993; 1994). También se han reportado efectos positivos después de dosificación crónica. Se observaron avances clínicamente significativos en 16 de 16 pacientes después de 3 meses de dosificación oral diaria con 30 mg/kg de 4-AP en pacientes con SCI de 2 años o más. Algunos pacientes anteriormente clasificados con lesión completa se reclasificaron como nivel de lesión incompleta (Segal et al, 1999). Todos los pacientes mostraron algún grado de mejoría en al menos algún tipo de función pulmonar o neurológica después de 3 meses de tratamiento oral diario con 4-AP (30mg/día, o aproximadamente 0.5 mg/kg). Una dosis más baja no era activa.

Como se dijo anteriormente, el 4-AP bloquea los canales de potasio, prolongando efectivamente el potencial de movimiento. Desafortunadamente, este mecanismo por el cual los bloqueadores de canales de potasio pueden mejorar los síntomas asociados con enfermedades y condiciones que impiden la transmisión potencial del movimiento también pueden llevar a actividad tipo epiléptica. Incluso, 4-AP es un reconocido agente convulsivo en animales y humanos. Por lo tanto, la utilidad

de 4-AP como agente terapéutico para el MS, TBI y SCI es mitigada por la posibilidad de convulsiones y otros efectos secundarios. El desasosiego, la confusión y los ataques tónicos-clónicos generalizados han sido reportados con dosis mayores de 0.8 mg/kg (Ball et al, 1979; Bever et al, 1994). Van Diemen et al (1993) reportó que la magnitud de mejoría en pacientes con MS (definido por mejoría en ganancia en actividad suave) estuvo significativamente relacionada con el nivel de suero 4-AP, (33-75ng/ml necesario para mejoría significativa después de administración oral). Sin embargo, los efectos secundarios (parestesia/disestesia, vértigo/embotamiento, e incluso inestabilidad al caminar) se observaron con las mismas dosis. En otro estudio humano, Bever et al (1994) reportaron un ataque de grand mal con un nivel de suero de 104 ng/ml. Los dos grupos de investigadores sugirieron que dosis mayores y mayores niveles de suero probablemente producirían mayores mejorías en aquellos pacientes con MS que respondieron a dosis menores de 4-AP. Así, el grado de eficacia con el 4-AP está limitada por la dosis y los efectos secundarios.

La preocupación por los efectos secundarios asociados con niveles más altos de suero 4-AP ha llevado al desarrollo de formulaciones de liberación sostenida (Fampridine-SR) (Masterson JG y Myers M, 1994; 1996a; 1996b). Fampridine-SR está actualmente en la Fase 2 de estudios clínicos para MS. Pacientes en estudios clínicos previos de Fampridine-SR han mostrado mejoría en una variedad de funciones. Dependiendo del individuo, estas mejorías han incluido aumento de las funciones sexual, del intestino, y de la vejiga, aumento en la facilidad de movimiento y sensación, y reducción en espasticidad muscular, fatiga y dolor crónico.

Otro enfoque para eliminar los efectos secundarios no deseados asociados con 4-AP incluyen la co-administración de 4-AP y bloqueadores de canales de sodio dependientes del voltaje. Los bloqueadores de canal de sodio (Na^+) bloquean el ingreso de iones Na^+ y reducen la susceptibilidad de la neurona a la

despolarización. Esto reduce eficazmente la excitabilidad neuronal. Incluso, se ha reportado que la co-administración de bloqueadores de canales de sodio dependientes del voltaje y el 4-AP previenen las convulsiones inducidas por el 4-AP en ratones (Yamaguchi y Rogawski, 1992). El 4-AP no tiene propiedades de bloqueo del canales de sodio.

Los compuestos usados en los métodos reivindicados aquí se pueden sintetizar mediante procedimientos revelados en la Patente de Estados Unidos No. 4,970,218. Todas las patentes y otras publicaciones citadas aquí se incorporan aquí por referencia.

Se sabe que ciertos compuestos dentro del alcance de la presente invención pueden inducir el bloqueo dependiente del voltaje de canales de sodio *in vitro* e *in vivo* (Tang et al, 1995; 1998; Tang y Kongsamut, 1996). Los bloqueadores de canales de sodio dependiente de voltaje actúan más eficazmente durante condiciones de despolarización celular. Estos compuestos tienen poco o ningún efecto en la señalización neuronal normal, pero permiten el bloqueo de canales de sodio durante ataques, traumas de la cabeza o isquemia. Muchos de estos agentes son cerebro-protectores en modelos animales de estas condiciones patológicas (Madge et al, 1998).

Sin querer limitarse por la teoría, los bloqueadores de canales de potasio también son agentes viables para el tratamiento del dolor neuropático y del dolor relacionado con la citocinesis, incluyendo el dolor artrítico. Sweitzer et al (1999) ha sugerido que la activación microglial y la liberación de citocinesis pueden jugar un papel en la hiperalgesia posterior a la inflamación periférica o a la lesión periférica de nervios. Se ha reportado que los bloqueadores de canales de potasio, tales como 4-AP, bloquea la activación de microglia humana de ratón y de rata (eder, 1998). Pyo et al (1997) han reportado que el 4-AP puede reducir la liberación de nitrito de la microglia activada, indicando que los comportamientos de dolor se

pueden regular mediante este mecanismo. Además, se ha reportado que el 4-AP reduce la producción de NO inducida por lipopolisacarido (LPS) de macrófagos murinos (Lowry et al, 1998). La administración de LPS a ratones también se ha usado como sistema modelo para la identificación de la eficacia anti-ártrica con varios agentes diferentes con diferentes mecanismos de movimiento (McIlly et al, 2001). Varios modelos experimentales que involucran constricción del nervio ciático o del nervio espinal L o L6 se han desarrollado para explorar el dolor neuropático (Bennett y Xie, 1988; Seltzer et al, 1990; Kim y Chung, 1992).

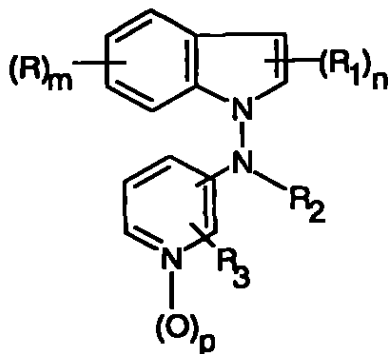
RESUMEN DE LA INVENCION

Se ha descubierto que compuestos de la fórmula I poseen propiedades bloqueadoras de canales de potasio. La combinación única de propiedades bloqueadoras tanto de canales de potasio como de canales de sodio significa que estos compuestos son útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades o condiciones desmielinantes. Por ejemplo, son útiles en el tratamiento de MS, SCI, TBI (daño cerebral traumático) y apoplejía. Estos compuestos proporcionan un agente terapéutico más seguro que el 4-AP porque el 4-AP sólo bloquea el canal de potasio que puede llevar a los efectos secundarios no deseables de desasosiego, confusión y ataques. Los compuestos de la fórmula I también son útiles para rehabilitación de apoplejía, el tratamiento de irritación y disfunción de la vejiga, el tratamiento de dolor visceral inducido por quemoquinesis (incluyendo el dolor artrítico) y el dolor neuropático.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Los compuestos de la fórmula I proporcionan una combinación única de propiedades bloqueantes para los canales de potasio y de sodio. Estos compuestos son útiles para el tratamiento de Enfermedades y condiciones Desmielinizantes como la Esclerosis Múltiple, el Daño de la Médula Espinal, la Lesión Traumática del Cerebro y la Apoplejía. Los compuestos también son útiles para la Rehabilitación de la Apoplejía, el tratamiento de la irritación y la disfunción

de la Vejiga, el tratamiento de dolor visceral inducido por quemoquinesis (incluyendo el dolor artrítico) y el dolor neuropático.



I

en donde

m es 0, 1, ó 2;

n es 0, 1 ó 2;

p es 0 ó 1;

cada R es independientemente hidrógeno, halógeno, trifluorometil, C₁-C₆alquilo, C₁-C₆alcoxi, benziloxi, hidroxí, nitro ó amino;

cada R₁ es independientemente hidrógeno, C₁-C₆alquilo, C₁-C₆alquenilo, C₁-C₆alcanoi, halógeno, ciano, -C(o)C C₁-C₆alquilo, C₁-C₆alquilenocn, C₁-C₆alquilenonR'R'' en donde R' y R'' son cada uno independientemente hidrógeno o C₁-C₆alquilo, C₁-C₆alquilenoc(o) C₁-C₆alquilo, ó -CH(OH)R₄ en donde R₄ es hidrógeno ó C₁-C₆alquilo;

R₂ es hidrógeno, C₁-C₆alquilo opcionalmente sustituido por halógeno, hidroxí ó benziloxi, C₁-C₆alquenilo, C₁-C₆alquinilo, -CO₂ C₁-C₆alquilo, ó -R₅

NR'R" en donde R₅ es C₁-C₆alquileo, C₁-C₆alquenileno ó C₁-C₆alquinileno y R' y R" son cada uno independientemente hidrógeno, C₁-C₆alquilo o alternativamente el grupo -NR'R" como un todo es 1-pirrolidinil; y R₃ es hidrógeno, nitro, amino, halógeno, C₁-C₆alcoxi, hidroxil o C₁-C₆alquilo.

Definiciones:

1) **Enfermedades Desmielinantes:** Tal como se usa aquí, Enfermedades Desmielinantes se definen como aquéllas en las que la mielina es el objetivo primario. Se dividen en dos grandes grupos: enfermedades adquiridas y desórdenes metabólicos hereditarios.

La esclerosis múltiple pertenece a la categoría de enfermedades adquiridas. La MS generalmente se manifiesta entre los 20 y 50 años de vida. La MS ataca la materia blanca del sistema nervioso central. En su manifestación clásica (90% de todos los casos), se caracteriza por fases alternantes de recaída/remisión – con periodos de remisión cada vez más cortos con el tiempo. Sus síntomas incluyen cualquier combinación de paraparesis espástica, paso inseguro, diplopia, e incontinencia.

La categoría de Desórdenes Metabólicos Hereditarios incluye las ocho leucodistrofias: leucodistrofia metacromática, enfermedad de Refsum, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Krabbe, fenilquetonuria, enfermedad de Canavan, enfermedad Pelizaeus-Merzbacher y enfermedad de Alexander. Las seis primeras son desórdenes de almacenamiento. La falta o el mal funcionamiento de una enzima causa una formación tóxica de sustancias químicas. La etiología de las enfermedades Pelizaeus-Merzbacher y de Alexander, por otra parte, permanece desconocida.

El curso clínico de los desórdenes desmielinantes hereditarios, que usualmente tienden a manifestarse en la infancia o primera niñez, es trágico. Niños

anteriormente normales pierden, en rápida progresión, la vista, el oído, el habla y el movimiento. La prognosis es la muerte en pocos años.

2) **Condiciones Desmielinantes-** Como se define aquí, una Condición Desmielinante es una condición que resulta en mielinación deficiente. Tales condiciones desmielinantes incluyen, aunque no están limitadas a ellas, lesión de la médula espinal, lesión traumática del cerebro y apoplejía.

3) **Lesión de la Médula Espinal (SCI)-** como se usa aquí, SCI se define como una lesión a la médula espinal que resulta en pérdida de función tal como la movilidad o la sensación.

4) **Lesión Traumática del Cerebro (TBI)-** Como se usa aquí, lesión traumática del cerebro se define como una lesión que resulta en daño al cerebro. Las lesiones en la cabeza pueden ocurrir en una de dos maneras:

- Una lesión cerrada de la cabeza ocurre cuando la cabeza que se mueve es rápidamente detenida, como cuando se golpea un parabrisas, o cuando es golpeada por un objeto como causando que el cerebro se golpee con la superficie dura de hueso dentro del cráneo. La lesión cerrada de la cabeza también puede ocurrir sin trauma externo directo a la cabeza si el cerebro sufre un movimiento rápido hacia delante o hacia atrás, como cuando una persona experimenta un latigazo.
- Una lesión penetrante de la cabeza ocurre cuando un objeto que se mueve rápido tal como una bala perfora el cráneo.

Tanto las lesiones cerradas como las lesiones penetrantes de la cabeza pueden resultar en daño del cerebro, localizado y extendido o difuso. Las incapacidades resultantes pueden incluir pérdida de memoria y alteración de emocional,

dificultades motrices, incluyendo parálisis y daño de los cinco sentidos. Además, muchos pacientes mueren de sus lesiones.

Hoy en día, el tratamiento se concentra en contener el daño tanto como sea posible en el periodo de 24 horas después de la lesión. Cuando alguien sufre una lesión en el cerebro, la devastación resultante se extiende más allá del trauma inicial. Sigue una cascada de "daño secundario". Las propias células inmunes del cerebro disparan la formación de hinchazón y fluido, y las células nerviosas dañadas comienzan a derramar el neurotransmisor llamado glutamato, que pronto se puede acumular a niveles que son tóxicos para las neuronas vecinas.

5) Rehabilitación de apoplejía- Como se usa aquí, la rehabilitación de la apoplejía se define como la intervención que resulta en la recuperación de funciones que se han perdido debido a la apoplejía.

6) Apoplejía- Como se define aquí, una apoplejía ocurre cuando un coágulo de sangre bloquea un vaso sanguíneo o una arteria, o cuando un vaso sanguíneo se rompe, interrumpiendo el flujo de sangre a un área del cerebro. Cuando ocurre el ataque, mata células cerebrales en el área inmediata. Los doctores llaman esta área de células muertas un infarto. Estas células generalmente mueren dentro de los minutos a unas pocas horas después de que el ataque empieza. En la apoplejía, las medidas de desmielinización tales como la tasa de transferencia de magnetización (MTR) está estrechamente relacionada con el daño axonal que se correlaciona con el déficit motor (Pendlebury et al, 2000).

7) Alquilo o alquileno- A menos que se diga o se indique algo diferente, el término "Alquilo" o "alquileno" significa un grupo de alquil o alquileno de cadena lineal o ramificada, como sea apropiado para la fórmula, especificado por la cantidad de carbonos en el alquilo, por ejemplo, C₁-C₆alquilo significa un alquilo o alquileno de cadena lineal o ramificada de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis carbonos, como

sea el caso, o cualquier variación de ellas, por ejemplo, pero no limitados a C1-2, C1-3, C1-4, C1-5, C-2-3, C2-4, C2-5, C2-C6, C3-C4, C3-5, C3-6, C4-5, C4-6, C5-6, etc.

8) **C₁-C₆alcoxi**- A menos que se diga o se indique algo diferente, el término C₁-C₆alcoxi denota un grupo alcoxi ramificado o recto que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Ejemplos de esto incluyen metoxi, etoxi, n-proxi, isoproxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, t-butoxi y hexoxi de cadena lineal y ramificada.

9) **Halógeno**- A menos que se diga o se indique algo diferente, el término halógeno significará fluor, cloro, bromo o yodo.

10) **Ácido C₁-C₆alcanoico**- A menos que se diga o se indique algo diferente, el término ácido C₁-C₆alcanoico significa un ácido carboxílico en el que el grupo carboxil está unido a hidrógeno o a un grupo alquilo de entre 1 y 5 átomos de carbono.

11) **C₁-C₆alcanoil**- El término C₁-C₆alcanoil significará un grupo obtenido quitando un grupo hidroxil del grupo carboxil de un ácido C₁-C₆alcanoico, y así incluye por ejemplo formil, acetil, y similares. Los términos alcanoil, alquenoil y alquinoil significarán grupos obtenidos quitando un grupo hidroxil del grupo carboxil de ácido alcanoico, ácido alquenoico y ácido alquinoico, respectivamente. Así, por ejemplo, el grupo linoleil derivado del ácido linoleico es un ejemplo del término alquenoil como se define anteriormente.

12) **"Sales farmacéuticamente aceptables"** significa una sal de adición ácida o una sal de adición básica que es compatible con el tratamiento de pacientes para el uso propuesto.

13) "Sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable" es cualquier sal de adición ácida orgánica o inorgánica de los compuestos base representados por la fórmula I o cualquiera de sus productos intermedios. Ácidos inorgánicos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen ácido hidrocblórico, hidrobrómico, sulfúrico y fosfórico y sales metálicas ácidas tales como ortofosfato monohidrógeno de sodio y sulfato hidrógeno de potasio. Ácidos orgánicos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen ácidos mono-, di- y tri carboxílicos. Ilustrativos de estos ácidos son, por ejemplo, ácido acético, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, glutárico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maléico, hidroximaléico, benzoico, hidroxibenzoico, fenilacético, cinnámico, salicílico, 2-fenoxibenzoico, p-toluenosulfónico y ácidos sulfónicos como ácido metanosulfónico y ácido hidroxietanosulfónico. Las sales mono- y di-ácidas se pueden formar, y tales sales pueden existir en forma hidratada, solvatada o substancialmente anhidra. En general, las sales de adición ácida de estos compuestos son más solubles en agua y varios solventes hidrofílicos orgánicos y que en comparación con sus formas base libres, generalmente demuestran puntos de fusión más altos.

14) "Sales de adición básica farmacéuticamente aceptables" significa sales de adición no tóxicas orgánicas o inorgánicas de los compuestos de la Fórmula (I) o cualquiera de sus productos intermedios. Ejemplos son hidróxidos metálicos de alcalí o alcalinos tales como hidróxidos de sodio, potasio, calcio, magnesio o bario; amoníaco y aminas orgánicas alifática, alicíclica o aromática tales como metilamina, trimetilamina y picolina. Los criterios de selección de la sal apropiada será conocido por los versados en el arte.

15) "Estereoisómeros" es un término general para todos los isómeros de las moléculas individuales que se diferencian únicamente en la orientación de sus átomos en el espacio. Incluye los isómeros de imagen de espejo (enantiómeros),

isómeros geométricos (cis/trans), e isómeros de compuestos con más de un centro quiral que no son imágenes de espejo uno de otro (diastereoisómeros).

16) "Paciente" significa un animal de sangre caliente, como por ejemplo rata, ratones, perros, gatos, cobayos, y primates tales como los humanos.

17) "Tratar" o "tratamiento" significa aliviar síntomas, eliminar la causa de los síntomas ya sea temporal o permanentemente, o prevenir o disminuir la aparición de síntomas de los trastornos o condiciones mencionados.

18) "Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad del compuesto que es eficaz en el tratamiento del trastorno, enfermedad o condición nombrado.

19) "Vehículo farmacéuticamente aceptable" es un solvente, dispersante, excipiente, adyuvante u otro material no tóxico que se mezcla con el ingrediente activo para permitir la formación de una composición farmacéutica, esto es, un dosificación capaz de administrarse al paciente. Un ejemplo de tal vehículo es un aceite farmacéuticamente aceptable típicamente usado para administración parenteral.

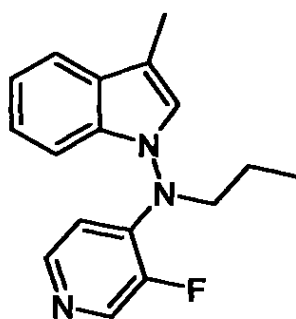
20) "Dolor neuropático" significa dolor que resulta del daño del sistema nervioso. El daño nervioso puede ser identificado o no identificado. Ejemplos de Dolor Neuropático incluye la neuralgia post-herpética, la neuropatía diabética dolorosa, el dolor de miembro fantasma y el dolor central post infarto.

21) "Irritación y Disfunción de la Vejiga" significa condiciones tales como cistitis y vejiga excesivamente activa. La vejiga excesivamente activa es una condición médica precisa caracterizada por síntomas que incluyen frecuencia urinaria, urgencia, e incontinencia impulsiva, la pérdida accidental de orina que ocurre después de un fuerte impulso repentino de orinar. El diagnóstico de la vejiga

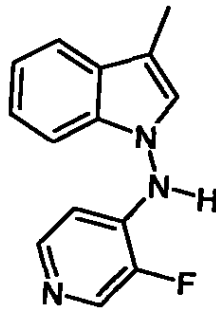
excesivamente activa se hace en ausencia de etiologías patológicas locales o relacionadas con el metabolismo, con síntomas atribuibles a contracciones involuntarias de la vejiga debido a exceso de actividad del músculo detrusor. Cystitis Intrstia (IC) es una condición inflamatoria crónica de la pared de la vejiga, que frecuentemente pasa sin diagnóstico.

Los compuestos de la fórmula I pueden eficazmente mejorar la velocidad y el grado de recuperación en lesión aguda de la médula espinal y en lesión de la médula espinal de larga duración. Estos tienen propiedades consistentes con el bloqueo del canal de sodio dependiente del uso y el bloqueo del canal de potasio dependiente del voltaje *in vivo*. Ellos proporcionan una terapia más segura que el 4-AP. Particularmente preferidos son compuestos en los que R es hidrógeno, halógeno, trifluorometil o C₁-C₆alquilo; R₁ es hidrógeno o C₁-C₆alquilo; R₂ es hidrógeno o C₁-C₆alquilo; R₃ es hidrógeno, C₁-C₆alquilo ó halógeno; y p es 0. Compuestos preferidos adicionales son aquellos en los que el grupo amino está unido a la posición 4 del grupo piridina.

Aún más preferidos particularmente son los compuestos de fórmulas II [también conocidos aquí como HP 184 o N-(3-fluoro.4.piridinil)-N-propil-3-metil-1H-indola-1-amina] y II (también conocida aquí como "8183").



II



III

HP 184 es tolerada muy bien en concentraciones cerebrales micromolares una hora después de administración ip de 30 mg/kg de HP 184 en ratas (Smith et al, 1996).

La combinación única de bloqueo de canal de sodio dependiente del uso y bloqueo de canal de potasio dependiente del voltaje también diferencia los compuestos de la presente invención de los bloqueadores de canal de sodio "puros" tales como la carbamazepina y el fenitoin. Estos agentes han sido usados exitosamente para aliviar síntomas "positivos" de la MS (ataque tónico doloroso y disestesia). Sin embargo, éstos empeoran los síntomas negativos (parálisis e hupestesia) (Sakurai y Kanazawa, 1999). Los compuestos de la presente invención intensifican la función neural debido al hecho de que bloquean los canales de potasio. Esto ayuda en la recuperación funcional. En el momento, se cree que los bloqueadores de canal de sodio son útiles en el tratamiento de síntomas dolorosos y/o como agentes neuroprotectores. Sin embargo, no se esperaba que mejoren los esfuerzos de rehabilitación.

Para el tratamiento de un paciente afectado por una condición o trastorno descrito anteriormente, se puede administrar un compuesto de la fórmula (I) en cualquier

forma o modo que haga que el compuesto sea biodisponible en cantidades terapéuticamente eficaces, incluyendo oralmente, sublingualmente, bucalmente, subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente, transdérmicamente, intranasalmente, rectalmente, topicalmente y formas similares. Una persona versada en el arte de preparar formulaciones puede determinar la forma y modo apropiados de administración, dependiendo de las características particulares del compuesto escogido para la condición o enfermedad que se va a tratar, la etapa de la enfermedad, la condición del paciente y otras circunstancias relevantes. Por ejemplo, ver Pharmaceutical Sciences de Remington, 18ª Edición, Mack Publishing Co. (1990), incorporado aquí por referencia.

Los compuestos de la fórmula I se pueden administrar solos o en forma de una composición farmacéutica en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables, cuya proporción y naturaleza son determinadas por la solubilidad y propiedades químicas del compuesto escogido, la ruta de administración elegida, la práctica farmacéutica estándar y otros criterios relevantes.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar oralmente, por ejemplo, en forma de tabletas, pastillas, cápsulas, elíxires, suspensiones, soluciones, jarabes, obleas, gomas de mascar y similares y pueden contener uno o más de los siguientes coadyuvantes: adherentes como celulosa microcristalina, alquitira de goma o gelatina; excipientes como almidón o lactosa, agentes desintegrantes como ácido algínico, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes como estearato de magnesio o Sterotex; deslizantes como el dióxido de silicona coloidal; y agentes endulzantes como sucrosa o sacarina se pueden añadir o un agente saborizante como menta, metil salicilato o saborizante de naranja. Cuando la forma farmacéutica es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido como el glicol polietileno o aceite graso. Otras formas farmacéuticas pueden contener otros varios materiales que modifican la forma física de la presentación, por ejemplo, como cubiertas. Así,

las tabletas o las píldoras pueden ir cubiertas con azúcar, laca, u otros agentes revestidores entéricos. Un jarabe puede contener, además de los presentes compuestos, sucrosa como agente endulzante y ciertos preservativos, tintes y colorantes y sabores.

Los compuestos de la Fórmula (I) de esta invención también se pueden administrar topicalmente, y cuando se hace así, el vehículo puede convenientemente comprender una solución, ungüento o base de gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de petrolato, lanolina, glicoles politenos, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes como agua y alcohol, y emulsificantes y estabilizantes.

Las soluciones o suspensiones también pueden incluir uno o más de los siguientes coadyuvantes: diluyentes estériles como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, glicoles politenos, glicerina, glicol propileno, u otros solventes sintéticos; agentes anti-bacteriales como benzil alcohol, o metil parabeno; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelatantes como ácido etileno diaminetetraacético ; amortiguadores como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral se puede incluir en ampolletas, jeringas desechables o frascos de dosis múltiples.

Los ésteres altamente lipofílicos, amidas y carbamatos de la presente invención tienen una capacidad de liberación sostenida en mamíferos durante un periodo de varios días o entre una y cuatro semanas cuando se formula y administra como preparaciones depósito, como por ejemplo, cuando se inyecta en un aceite farmacéuticamente aceptable y apropiadamente seleccionado. Los aceites preferidos son de origen vegetal como el aceite de jengibre, el aceite de semilla de algodón, el aceite de maíz, el aceite de coco, el aceite de soya, el aceite de

oliva y similares, o son ésteres sintéticos de ácidos grasos y alcoholes polifuncionales como el glicerol o el propilenglicol.

Las composiciones depósito de la presente invención se preparan disolviendo un carbamato, amida o éster altamente lipofílico, de la presente invención en un aceite farmacéuticamente aceptable en condiciones estériles. El aceite se escoge de manera que se obtenga una liberación del ingrediente activo durante el periodo de tiempo deseado. El aceite apropiado se puede determinar fácilmente consultando las autoridades, o sin indebida experimentación por alguien versado en el arte.

El rango de presentaciones en el que los compuestos de la Fórmula I exhiben su habilidad para actuar terapéuticamente puede variar dependiendo de la enfermedad o condición específica que se está tratando y su gravedad, la formulación, otros estados subyacentes de la enfermedad de la que sufre el paciente, y otras medicaciones que se puedan estar administrando al tiempo al paciente. Generalmente, los compuestos de la Fórmula I exhibirán sus actividades terapéuticas en presentaciones entre aproximadamente 0.001 mg/kg del peso corporal del paciente/día y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente/día.

Los siguientes ejemplos tienen propósito ilustrativo y no pretenden limitar el alcance de la invención en ninguna forma.

EJEMPLO UNO

EVIDENCIA IN VIVO CONSISTENTE CON EL BLOQUEO DE CANAL DE SODIO DEPENDIENTE DEL VOLTAJE

Métodos: El procedimiento experimental se basó en el método de Bachauß et al (1992). Lo ratones machos CD-1 que pesaban 35-40 g se anestesiaron con hidrato cloral (400mg/kg). Bajo un microscopio de operaciones, se hizo una incisión vertical de 3mm en la piel, 2mm detrás de la órbita derecha. El músculo temporal se apartó y se realizó una pequeña craneotomía para exponer la dura. Se hizo una incisión en la dura y se apartó y se expuso la parte distal de la arteria carótida media derecha. Se ocluyó la arteria contra la corriente a la bifurcación principal mediante electrocoagulación bipolar con fórceps finos. Se midió el volumen del infarto se midió 24 horas más tarde usando 2% de solución de cloruro de trifeniltetrazolio. En este paradigma experimental, HP 184 se administró oralmente a ratones sin ayuno (10 por grupo) una hora antes de la oclusión. La reducción del volumen del infarto se basó en comparación con 1% ácido acético, vehículo, ratones tratados. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Actividad neuroprotectora de HP 184 en el modelo de apoplejía pMCAO de ratón

Dosis (mg/kg, po)	Tiempo (min)	% reducción volumen infarto media sem
1	-60	21±3
10	-60	32±11*
10	-60	40±2.5**

*=p<0.05; **=p<0.01

La neuroprotección observada en un modelo de oclusión permanente de la arteria carótida media de un ratón (pMCAO) es consistente con el bloqueo in vivo del canal de sodio dependiente del voltaje en esta dosis y tiempo.

EJEMPLO DOS

EFFECTO DE HP 184 SOBRE EL EDEMA DESPUÉS DE LESION CEREBRAL FOTOTROMBOTICA EN LA RATA

Fundamento/Objetivo:

La apoplejía tromboembólica es la tercera causa de muerte en el mundo occidental. Es causada por un coágulo de sangre o trombo en desintegración ya sea generado dentro de la circulación cerebral o en formación en el corazón o en los grandes vasos y conducido en la circulación cerebral. Entonces el flujo de sangre es interrumpido y se desarrolla una lesión isquémica, con edema, necrosis y apoptosis de tejido. El edema es perjudicial porque comprime el cerebro, promoviendo la isquemia, y también lisis celular y lesión mecánica. El tratamiento con HP 184, un bloqueador conjunto de Na^+/K^+ , fue estudiado por sus efectos en este edema cerebral.

Método: Ratas macho Sprague Dawley (180 – 200 g bw) fueron anestesiadas con hidrato cloral (400 mg/kg ip) y se colocaron en un aparato estereotáxico. Se abrió la piel para mostrar el cráneo y se colocó una luz fría (Bioclock 150W) en contacto con el lado derecho del cráneo delante de lambda. Se administró intravenosamente tinte rosa de bengala (10 mg/kg iv en sol. salina) y comenzó inmediatamente la iluminación del cráneo y continuó por 5 minutos. Entonces se suturó la piel cerrada sobre el cráneo y el animal volvió a su jaula. Veinticuatro horas después de la lesión fototrombótica los animales recibieron HP 184 hecho en entre 1% en agua por vía intravenosa a 0,10 o 20 mg/kg de peso corporal en un volumen de 5 ml/kg. Una hora más tarde, se mataron los animales mediante decapitación y se retiraron los cerebros (ver apéndice para protocolo). Se tomaron muestras centrales en el sitio de la lesión, y contralateral a la lesión, usando un taladro de corcho de 6 mm. Se determinó el contenido de agua mediante peso húmedo del tejido/peso seco del tejido y el edema expresado como % de exceso de agua en la muestra lesionada comparado con la muestra del hemisferio contralateral de cada rata.

Resultados – Mostrados en la Tabla 2

Tabla 2

Tratamiento a las 24 h después de la lesión	n	Edema (% exceso de agua) a las 25 h después de la lesión
Vehículo	26	4.10±0.12
HP 184 a 10 mg/kg iv	12	3.61±0.23 ns
HP 184 a 20 mg/kg iv	13	3.20±0.27**

Estad.: ANOVA más Tukey-Kramer **=p<0.001

HP 184 demostró una significativa (22%) reducción del edema en la corteza cerebral derecha una hora después de la administración intravenosa a 20mg/kg y 25 horas después de la lesión fototrombótica.

EJEMPLO TRES

EFFECTO DE HP 184 EN EL TAMAÑO DE LA LESION Y EN LA FUNCION NEUROLÓGICA DESPUÉS DE ISQUEMIA FOCAL CEREBRAL TRANSITORIA EN RATAS

Fundamento/ Objetivo: En este estudio se administró HP 184 1 hora después de del ataque de isquemia en un modelo de isquemia cerebral local transitorio en ratas. Los parámetros medidos fueron tamaño de la lesión y función neurológica.

Métodos: Ratas macho Sprague-Dawley (Iffa Credo, Francia) que pesaban entre 220-240 g se anestesiaron con halotan 81.4%) en una mezcla óxido nitroso-oxígeno (70:30). Se aislaron las dos arterias carótidas comunes (CCAs). La arteria

cerebral media izquierda (MCA) expuesta mediante una craneotomía temporal fue ocluida con un microclip, y simultáneamente las CCAs fueron ocluidas por 1 hora. Tanto la temperatura corporal como la cerebral se mantuvieron a normotermia. Después de la cirugía, los animales fueron devueltos a sus jaulas en una habitación calentada a 24-26°C.

Se administró HP 184, disuelto en aprox 1% (en agua estéril inyectable) a 10 y 20mg/kg intravenosa después del ataque de isquemia, y las ratas control recibieron el vehículo de acuerdo con el mismo protocolo. 24 horas después de la isquemia, se realizó a ciegas una función neurológica usando una escala de calificación de 9 puntos.

ESCALA DE CALIFICACION USADA PARA LA FUNCION NEUROLOGICA

Item		Puntaje normal	Déficit
Reacciones de colocación			
Pata colgando	pata delantera izquierda	1	0
	Izquierda	1	0
Visual		1	0
Reflejo de agarrar	pata delantera izquierda	1	0
	Izquierda	1	0
Reflejo de enderezar			
Cabeza inclinada	lado izquierdo	1	0
	Derecho	1	0
Posturas anormales		ausentes	ausentes
Tórax torcido		1	0
Flexión de pata delantera izquierda		1	0
Calificación neurológica global		9	

Después se mataron las ratas y se retiró el cerebro. Se cortaron secciones frescas con una matriz cerebral y se tiñeron con cloruro trifeníl tetrazolio 2% a 37°C por 5 minutos. Las secciones se almacenaron después en 10% formalina a 4°C por 24 horas. Se midieron las áreas de infarto con un analizador de imagen (Leica Q500).

Resultados: La isquemia indujo el desarrollo de lesiones cerebrales en la corteza y el estrato (ver Fig 1 que ilustra el efecto de HP 184 en el daño cerebral a 10 y 20 mg/kg bolo intravenoso 1 hora después de Oclusión de MCA). HP 184 a 10 mg/kg intravenoso redujo significativamente las lesiones cerebrales en 41% ($p < 0.05$). Esta reducción fue significativa en la corteza (-45%, $p < 0.05$).

EJEMPLO CUATRO MEDICION DE BLOQUEO DE CANAL DE POTASIO

Métodos

Se cultivaron células PC12 (ATCC, Rockville, MD) en medios Eagle modificado de Dulbecco complementados con 10% de suero fetal bovino (GIBCO BRL Grand Island, NY). Las corrientes del canal de potasio se midieron usando protocolos electrofisiológicos estándar de grapa de parche como se detalló previamente (Rampe et al, 1998).

Resultados y Discusión

Las corrientes de canal de potasio fueron producidas por 200 pulsos de grapa de 200 msec a + mV de un potencial de soporte de -80 mV. Este protocolo resultó en una corriente sostenida dirigida hacia fuera. La aplicación de HP 184 (10 μ M) redujo la amplitud de esta corriente y aumentó la velocidad de disminución de la corriente. Cuando se midió la corriente al final del pulso, HP 184 redujo la amplitud de la corriente en un $75 \pm 4\%$ ($n=4$). Los resultados son consistentes con la noción

de que HP 184 actúa como un antagonista de canales K^+ dependientes de voltaje, bloqueando un estado activado.

EJEMPLO CINCO

EVIDENCIA IN VIVO DE MEJORAMIENTO DE FUNCION MUSCULAR

Objetivo: Se ha reportado que el tinte inorgánico rojo rutenio (RuR) bloquea la corriente Ca^{+2} dependiente del voltaje en varios tipos de células, incluyendo las neuronas sensoriales del ratón (Duchen, 1992), sinaptosomas y preparaciones neuromusculares (Hamilton y Lundy, 1995; Tapi y Velasco, 1997). Además, RuR bloquea la liberación de neurotransmisores en sinaptosomas cerebrales (Meza-Ruiz y Tapia, 1978; Tapia y Meza-Ruiz, 1977) y uniones neuromusculares (Alnaes y Rahamimoff, 1975; Person y Jun, 1979). La administración intraperitoneal (ip) in vivo de RuR causa parálisis flácida en ratones (Tapia et al, 1976) y este efecto es antagonizado por 4-aminopiridina (4-AP), un bloqueador de canal K^+ dependiente del voltaje (Tapia, 1982). Tapia y Velasco (1997) han revisado los efectos de RuR in vivo e in vitro, y sugieren que el RuR interactúa con sitios Ca^{+2} localizados en la membrana de la terminación nerviosa. Estudios relacionados indican que RuR selectivamente bloquean canales Ca^{+2} tipo-N, y estos canales regulan el influjo de Ca^{+2} necesario para la liberación del neurotransmisor. Estos autores también sugieren que la administración intraperitoneal de RuR puede ser un modelo experimental del síndrome gravis miasténico de Eaton-Lambert, una enfermedad autoinmune caracterizada por bloqueo de entrada de Ca^{+2} y de liberación de Ach debido a anticuerpos que se unen al canal Ca^{+2} tipo-N. Consistente con esta posibilidad, se ha reportado que 4-AP mejora la debilidad muscular y restaura la transmisión neuromuscular en pacientes (Lundh et al, 1977a; 1977b; 1979; McEvoy et al, 1989; Aisen et al, 1995).

La habilidad del 4-aminopiridina (4-AP) y de la guanidina de antagonizar la parálisis flácida inducida por RuR se debe posiblemente a su habilidad para

facilitar la liberación de neurotransmisores (Lundh, 1978; Lundh y Thesleff, 1977; Tapia y Sitges, 1982). De cualquier forma, Tapia y colaboradores (Tapia y Sitges, 1982) han reportado que el RuR bloquea la liberación inducida por 4-AP en sinaptosomas.

In vivo, el HP 184 mejora la liberación de neurotransmisores por un mecanismo diferente que el de 4-AP. A altas concentraciones, 4-AP mejora la liberación estimulada eléctricamente y la espontánea, pero estos efectos son dependientes del calcio. En contraste, el HP 184 mejora la liberación espontánea de neurotransmisores independiente del calcio únicamente (Smith et al, 1993). También se ha planteado la hipótesis de que la liberación espontánea tiene un rol funcional in vivo (Smith et al, 1996).

El propósito del siguiente experimento era determinar si HO 184 y 4-AP podían antagonizar el efecto paralizante de RuR después de inyección conjunta.

Método y Resultados: Grupos de 4-5 ratones (CD-1; Charles River; 25-35 gramos) fueron inyectados separada pero simultáneamente ip con rojo rutenio y vehículo (1% ácido acético glacial), rojo rutenio y 4-AP, o rojo rutenio y HP 184. El compuesto conocido como "8183" también se examinó en este paradigma. Comenzando a 15 minutos después de las inyecciones, se colocaron los ratones cerca de un aparato "asta" y se registro su habilidad para sostener su propio peso corporal (es decir, de mantenerse en el asta y no caer). Los resultados se registraron como el número de ratones que pudieron sostener su propio peso corporal versus el número total de ratones examinados. Estos resultados se muestran en la Tabla 3. Todos los experimentos se realizaron entre 2 PM y 4:30 PM.

TABLA 3

Droga, dosis	Droga, dosis	10 min	30 min	45 min
RuR, 30 Mg/kg ip	Veh	29 de 89 (42%)	19 de 69 (27.5%)	18 de 64 (30.4%)
	0.3 mg/kg 4-AP	22 de 25 (88%)	13 de 25 (52%)	12 de 25 (48%)
	0.6 mg/kg 4-AP	12 de 14 (85.7%)	8 de 14 (57.1%)	8 de 14 (57.1%)
	30 mg/kg HP 184	15 de 15 (100%)	15 de 15 (100%)	15 de 15 (100%)
	10 mg/kg HP 184	14 de 15 (93.3%)	12 de 15 (80%)	15 de 15 (100%)
	30 mg/kg 8183	13 de 14 (92.8%)	13 de 14 (92.8%)	14 de 14 (100%)
	100 mg/kg DHP	11 de 20 (55%)	10 de 20 (50%)	10 de 20 (50%)
	30 mg/kg DHP	4 de 15 (26.7%)	3 de 15 (20%)	4 de 15 (26.7%)
	10 mg/kg RIL	9 de 15 (60%)	4 de 15 (26.7%)	4 de 15 (25.7%)

Conclusión:

Tanto el 4-AP (ip) como el HP 184 (ip) pueden antagonizar la parálisis flácida inducida por la administración ip de RuR. Esto implica que el HP 184 es capaz de mejorar la transmisión neuronal in vivo, posiblemente mediante bloqueo del canal K^+ . También es posible, como lo es para el 4-AP, que el HP 184 mejore la transmisión neuronal, pues los experimentos con cortes de cerebro in vitro sustentan un aumento en la liberación de neurotransmisores en el cerebro (Smith et al, 1993; 1996).

Previamente se mostró que dosis de los bloqueadores de canal de sodio difenilhidantoin (DHP) y riluzol (RIL) examinados en este paradigma experimental son neuroprotectores en modelos focales de isquemia (Rataud et al, 1994; O'Neill et al, 1997). Su falta de efecto en este modelo da más soporte a la interpretación de que la habilidad de HP 184 de antagonizar la parálisis flácida inducida por RuR probablemente no se debe al bloqueo del canal de sodio in vivo. Esto se sugiere también clínicamente. Los síntomas negativos de la MS (pérdida de movimiento) con frecuencia son empeorados por los bloqueadores de canal de sodio (Sakurai y Kanazawa, 1999).

EJEMPLO SEIS

MODELOS DE ENFERMEDAD DE COMPRESIÓN DE LA MEDULA ESPINAL

Fundamento y Objetivo: Gruner & Yee (1999) mostraron que, 25 días después del daño de la médula espinal, el 4-AP mejoraba la consecuente lesión gradual de la médula espinal del mMEP en ratas. Usando procedimientos idénticos, se midieron los comportamientos funcionales. Se ha mostrado que estos comportamientos se correlacionan con mMEP mínimo. El objetivo de estos experimentos tenía dos aspectos:

- 1) determinar si HP 184 podía atenuar los impedimentos motores de moderada intensidad inducidos por médula espinal comprimida si se daba agudamente y comparar su eficacia con el succinato metilprednisolone (MPSS), y
- 2) determinar si HP 184 podía mejorar la función motora en ratas con lesión en la médula espinal de menor intensidad de larga duración (25 días), y comparar su efecto con la 4-aminopiridina.

Tratamiento Agudo – administración ip

Se expusieron las médulas espinales de ratas hembras a laminectomía (sham, n=12) o se comprimieron a un diámetro de 1.4 mm (5 grupos, n=12 cada uno). El diámetro normal de la médula espinal es aproximadamente 2.5mm. Esta compresión representa una lesión moderada caracterizada por cifras de caminata a campo abierto iniciales de 1.5 – 2.5 en la Escala de Caminata a Campo Abierto. Las definiciones de la Escala de Caminata a Campo abierto (OFT) son las siguientes:

- 0.0 Ningún movimiento espontáneo
- 0.7 Ligero movimiento
- 1.0 Movimiento en la cadera y/o rodilla (no en el tobillo)
- 1.3 Movimiento activo en cadera y rodilla, no en tobillo
- 1.7 Movimiento cuestionable en el tobillo
- 2.0 Movimiento del miembro en las tres articulaciones principales
- 2.3 Intentos por sostenerse
- 2.7 Sostén en posición únicamente
- 3.0 Sostén activo, paso no coordinado
- 3.3 Tandas intermitentes de paso coordinado
- 3.7 Falta de control de tobillo o pie, camina sobre nudillos o superficie media del pie
- 4.0 Coordinación de miembros anteriores y posteriores al caminar
- 4.3 Mejora en soporte de postura en miembros posteriores, el abdomen no cae sobre el piso
- 4.7 Uno o dos dedos de las patas se arrastran, ligera inestabilidad al girar a toda velocidad
- 5.0 Caminata y base de apoyo normales, no hay pérdida de equilibrio al girar rápidamente, ningún dedo de la pata se arrastra

Tratamiento con droga

Dentro de los 15 minutos de la compresión (día 1), las ratas en los grupos designados HP 184 recibieron inyecciones ip de 20, 10, 5 o 0 mg/kg en 1% de vehículo de ácido acético glacial. Esta administración se repitió los días 2 y 3. Por otro lado, el MPSS se administró en 30 mg/kg a 15 minutos, 2 horas, 4 horas y 6 horas el día 1 después de la compresión. Este programa de dosificación de MPSS ha sido descrita como óptima en la literatura, y refleja la dosificación aplicada en humanos. MPSS es actualmente la única terapia de drogas aprobada para la lesión de médula espinal humana. La Figura 2 muestra las cifras de comportamiento (OFT) de los varios grupos de tratamiento con el tiempo. La cifra preoperatoria normal es 5. La velocidad y extensión de la mejoría fueron significativamente diferentes de los de las ratas tratadas con vehículo en los grupos de dosis de 20 y 5 mg/kg. Cada punto representa la media más 8-12 ratas.

Tratamiento Agudo – administración po

Nuevamente, se expusieron las médulas espinales de ratas hembras a laminectomía o se comprimieron a un diámetro de 1.4 mm. En los grupo con HP 184, se trató a las ratas oralmente 5-10 minutos antes de la compresión, y después una vez al día durante los días 2 y 3. MPSS se dosificó como se describió anteriormente. Las cifras de comportamiento (OFT) se muestran en la Figura 3. La cifra preoperatoria normal es 5.

La velocidad y extensión de mejoría mejoraron para todas las dosis, incluyendo el grupo de 10mg/kg, si se compara con el grupo tratado con el vehículo. Cada punto representa la media más 12 ratas.

EXPERIMENTO DE COMPRESIÓN CRÓNICA

Se expusieron las médulas espinales de ratas hembras a laminectomía o se comprimieron a un diámetro de 1.6 mm . Esto Representaba una lesión menor, y se designó para que resultara en cifras OFT de 4.0 después de 25 días sin tratamiento. Esto se escogió como un intento por reproducir el mismo grado de impedimiento menor descrito por Gruner y Yee (1999), quienes mostraron que mejorías inducidas por 4-AP en grabaciones potenciales en placa terminal miniatura de patas traseras. Este procedimiento y duración de daño sin tratamiento también ha mostrado resultados en la mesmielinación. Las cifras de comportamiento (OFT) se muestran en la Figura 4. La figura 4 muestra las medias y errores estándar de los grupos que usan las Definiciones para la Escala de Caminata en Campo Abierto descrita anteriormente.

En este experimento, las cifras OFT fueron ligeramente más altas (4.3-4.5), dejando sólo una pequeña ventana para mejoría. Usando cada rata como su control, se observó mejoría consistente después de una dosificación oral una vez al día de HP 184 los días 26, 27 y 28. Las mejoría consistente también se observó después d la ip una vez al día de 0.6 mg/kg de 4-AP. Las diferencias estadísticas se basaron en los cambios para cada rata individual (cada rata era su propio control) usando la prueba U Mann-Whitney. Todas las pruebas de comportamiento en día 1, día 2 y día 3 se realizaron 3 horas después de la cebadura. No se dio droga el día 3 (el primer día en que se empezó a dar droga fue el día 0). El análisis estadístico es el siguiente:

20 mg/kg- mejoría significativa a la hora 3 hasta el día 3 ($p=.002$) comparado con el control con vehículo

10 mg/kg- mejoría significativa a los 30 min y hora 3 hasta hora 12 ($p=.014$) comparado con el control con vehículo

105
- 37
155

3mg/kg- mejoría significativa a los 30 min hasta hora 12 al día 2 (p=.0027) comparado con el control con vehículo

4-AP- mejoría significativa a los 90 min hasta hora 3 y hora 12 hasta día 2 (p=.0027) comparado con control con vehículo

La Tabla 4 ilustra los cambios en cifras para cada grupo desde la pre-dosificación hasta 3 horas después de la tercera dosis diaria consecutiva.

Tabla 4

	Compresión con vehículo	Compresión con 4-AP	Compresión con 20 HP	Compresión con 10 HP	Compresión con 3 HP	Laminec Sin compresión
Antes de la dosis	4.52 ± 0.04	4.43± 0.03	4.54± 0.02	4.36± 0.01	4.32± 0.05	4.87±
3 horas después de la última dosis	4.53± 0.03	4.53± 0.02	4.60± 0.02	4.44± 0.03	4.47± 0.04	4.87± 0.01

La Figura 5 muestra los cambios en cifras, normalizadas para cada rata. La gráfica muestra el cambio observado después de tres días consecutivos de dosificación (desde la pre-dosificación hasta tres horas después de la tercera dosis diaria consecutiva) con 0.6 mg/kg de 4-AP (i.p.), 20 o 10 o 3 mg/kg (p.o.). Laminectomía se refiere a un grupo sustituto. La media ± sem para cada grupo (n=12) se muestra en la figura 5.

EFICACIA EN LESIONES DE MEDULA ESPINAL A LARGO PLAZO

Treinta y cinco días después de una lesión de grado moderado de la médula espinal, la administración oral de 3 mg/kg de HP 189 (po) mejora la recuperación motora después de una sola dosis, y la dosificación diaria por 4 días más resultó en mejoría continua y sostenida con base en las definiciones para la prueba De Caminata a Campo Abierto descrita anteriormente. 4-AP, a 0.6 mg/kg (ip) fue similarmente eficaz. Una representación tabulada de los resultados de los dos estudios de lesión crónica en la médula espinal (las drogas administradas primero 25 días después de una compresión leve de la médula espinal y 35 días después de una compresión moderada de la médula espinal) se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5

Tratamiento	Día 25 (leve) antes	Día 28 (leve) 3 horas después de última dosis	Delta	% mejoría posible (cifra más alta=5)
Control	4.52 ± .037	4.53 ± .026	.01	2%
4-AP (0.6mpk, ip)	4.43 ± .030	4.53 ± .023	.10	17.5%
HP 184 (3mpk, po)	4.32 ± .016	4.47 ± .035	.15	22.0%
Tratamiento	Día 25 (moderado) antes	Día 39 (moderado) 3 hrs después de última dosis	Delta	% mejoría posible
Control	4.00 ± .074	3.99 ± .057	-.01	-2%
4-AP (0.6mpk, ip)	3.95 ± .084	4.17 ± .047	.22	22.1%*
HP 184 (3mpk, po)	3.89 ± .054	4.17 ± .058	.274	24.8%*

Como se muestra anteriormente, HP 184 a 3 mg/kg/día mediante cebadura oral de 35 a 41 días después de lesión de compresión moderada produjo mejoría significativa. Se notó en este estudio que hubo más mielina en el sitio de la lesión en las médulas espinales lesionadas de las ratas que recibieron HP 184. Esta información proporciona evidencia consistente con la afirmación de que HP 184 está mejorando la remielinación o reduciendo un proceso de desmielinación en curso.

Estudios adicionales se realizaron para determinar la dosis eficaz más baja de HP 184 en el paradigma de compresión crónica moderada (35 días después de la lesión) en un diseño doble de placebo a ciegas y control positivo. Los efectos de HP 184 observados previamente a 3mg/kg, po, fueron confirmados usando 4-AP (0.6mg/kg, ip) como un control positivo. Además, el efecto de todos los tratamientos sobre el descoloramiento de mielina se examinó histológicamente.

(1) Evaluación del Comportamiento

Ciento cincuenta ratas hembras adultas, entre 250-300g de peso, obtenidas en Charles River se alojaron en las Instalaciones Centrales para Animales (CAF) del Centro de Ciencias de la Salud (HSC) de la Universidad McMaster durante al menos una semana. Durante ese tiempo, se expusieron a las pruebas de desempeño descritas más adelante, para asegurar que se familiarizaran con ellas. Se manipuló las ratas diariamente por dos semanas antes de la cirugía.

Se anestesiaron las ratas usando isoflurano (3-5%): O₂ (1L/min) en una sala quirúrgica debidamente equipada en el CAF. Se administró temgésico (0.03 mg/kg de peso corporal, subcutáneamente (SQ) antes de la cirugía para aliviar el dolor. Se estrujaron (comprimieron) las médulas espinales con unos fórceps modificados de 3.5 mm de anchos (Blight 1991, procedimiento revisado por laboratorio Rathbone). Se cerraron los fórceps a 1.4 mm por 15 segundos, lo que produjo un

nivel de lesión equivalente a un resultado de nivel mediano (moderado) en la escala Gruner (1996). La lesión por compresión en lo demás se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Blight (1991).

Se observaron los animales para determinar los comportamientos de dolor, la presencia de infecciones del tracto urinario o retención urinaria. Se trató el dolor con Tylenol (0.8 mg/10gm de peso corporal oralmente).

Para evitar la infección urinaria, Se les dio Septra (Trimetropina-Sulfametoxazol) oralmente (4.5 ml en 300 ml de agua) 1 día antes y 5 días después de la operación, y fueron tratadas con expresión manual de vejiga. En el caso de las infecciones, es decir, cualquier infección del tracto urinario, señalada por orina turbia o sangrosa, se inyectó subcutáneamente (SQ) Baytril (enrofloxacin, 7 mg/kg de peso corporal) dos veces al día.

Se evaluaron los cambios en el comportamiento locomotor y los reflejos segmentales hasta 5 semanas después de la lesión. Se sometieron a prueba los animales en tarea de caminata en campo abierto, colocación de miembro posterior y en orientación de pata. Los animales se evaluaron los días 2, 7, 14, 21, 28 y 35 después de la cirugía. Al día 35 después de la cirugía, no ocurre casi ninguna recuperación espontánea adicional. Por lo tanto, el tratamiento comenzó el día 35.

Se disolvió HP 184 en agua de ósmosis-inversa desionizada esterilizada (por autoclave) acidificada con ácido acético glacial (0.1 ml de ácido por 10 ml de agua). Se disolvió 4-AP (Sigma, peso molecular 94.12; Jankowska E. Et al., 1982; Gruner et al., 1999) en solución salina fisiológica (0.6 mg/kg de peso corporal) y se administró por inyección i.p. Un grupo de ratas (control-1 con vehículo) recibió por vehículo de cebadura oral. Se hizo la prueba de comportamiento inmediatamente antes de recibir la cebadura y 3 horas después. Luego, se sacrificaron las ratas el día 35. Todas las otras ratas recibieron HP 184 por cebadura oral (0.3, 1, o 3

mg/kg de peso corporal dependiendo del grupo) o 4-AP (0.6 mg/kg i.p.) o vehículo (control-2 con vehículo) una vez al día los días 35 a 42 después de la cirugía. Estos días se hicieron pruebas de comportamiento inmediatamente antes de recibir la cebadura a las 3 y 24 horas después. Luego, se perfusionaron las ratas el día 43 después de la última prueba de comportamiento.

Se hizo grabación en video de la prueba de comportamiento usando Hi-8 los días 35 a 43 después de la cirugía.

Se realizaron análisis estadísticos en un computador Macintosh usando GB-Stat ppc 6.5.2. Las cifras del comportamiento se analizaron mediante el análisis de variación no paramétrica de Kruskal-Wallis. (ANOVA). Se hicieron comparaciones post hoc usando pruebas Mann-Whitney U.

Se evaluó la recuperación general de la habilidad locomotora a campo abierto mediante las cifras medias OFT de cada grupo, que se muestran en las Figuras 6a y 6b. Estos resultados muestran que el desempeño de los animales tratados con HP 184 o 4-AP fue significativamente diferente del de los animales de control que recibieron el vehículo. El ANOVA para diferentes mediciones muestra el efecto del tratamiento ($p < 0.01$) los días 35-42.

Los resultados muestran que 4-AP y HP 184 tienen efectos benéficos, mejorando las pruebas de comportamiento después de compresión moderada crónica de la médula espinal. Aunque las tres concentraciones de HP 184 tuvieron efectos benéficos, los 3 mg/kg de HP 184 produjeron la mejor recuperación de la función locomotora confirmando así los efectos del HP 184 observados previamente con esa dosis. Estos resultados también indican que la concentración más baja de HP 184 (0.3 mg/kg) puede no ser la dosis menos eficaz de HP 184 en este paradigma.

Estudio histológico de Médulas espinales

Un estudio para probar si el tratamiento con HP 184 afectaba la cantidad de mielina en las ratas con lesión moderada de largo término por compresión de médula espinal cuando se les administraba mucho tiempo después de la lesión en la médula espinal.

Se usaron para este estudio médulas espinales de ratas descritas anteriormente en la evaluación.

El día 21 después de la operación, los sujetos experimentales se anestesiaron profundamente con pentobarbital de sodio (50-60 mg/kg de peso corporal, i.p.) y se perfundieron transcardialmente – primero con 100 mL 0.05M de salina amortiguada de fosfato (PBS) que contenía 0.1 de heparin, seguido de 300-500 mL de 4% de paraformaldehído (PFA). Se sacaron los segmentos T9 a L1 de las médulas espinales, después se crio-protegieron en 30% de solución sucrosa y se congelaron a -70°C en 10.24% de alcohol polivinilo y 4.26% de glicol polietileno.

Un segmento de cada médula incluyendo el sitio de la lesión más 10 mm rostral y caudal al sitio de la lesión se fijaron en medio Tissue Tek. Se cortaron longitudinalmente secciones seriadas a intervalos de 20 μm en un criostato. Cada tercera sección se tiñó con azul rápido luxol para mielina. La evaluación se realizaron observadores desconocedores del tratamiento, sobre diapositivas codificadas. Las secciones se examinaron bajo un microscopio de luz para ver la extensión de la desmielinación (el área sin tinte azul rápido luxol).

Para determinar el área de la médula con máxima desmielinación, se dieron valores numéricos a toda la sección sobre fotografías usando un microscopio Zeiss. La extensión de la desmielinación se midió en el centro de la lesión usando

un programa de análisis de imagen computarizada Bioquant BQ-TCW98 por parte de un investigador que desconocía el grupo de tratamiento.

Se realizó análisis estadístico en un computador Macintosh usando GB-Stat ppc 65.2. Los resultados histológicos se analizaron mediante el análisis de variación no paramétrica Kruskal-Wallis (ANOVA). Las comparaciones post hoc se hicieron usando pruebas Mann-Whitney U.

La extensión de la desmielinación de los seis grupos experimentales (0.3, 1, o 3mg/kg de peso corporal dependiendo del grupo o 4-AP 0.6 mg/kg o control con vehículo 1 y 2) se muestra en la figura 7. Las barras representan el número de imágenes de área desmielinadas en el centro de compresión. (** $P < 0.001$, * $P < 0.05$, análisis de variación no paramétrica Kruskal-Wallis (ANOVA)). Los resultados cuantitativos muestran que las médulas de animales tratados con HP 184 o 4-AP tenían áreas mielinadas significativamente mayores que las de los control con salina. Esto es, las médulas de animales que recibieron inyecciones de vehículo tenían áreas desmielinadas considerablemente mayores que la de los animales tratados con HP 184 o 4-AP.

El análisis histológico mostró que HP 184 (en todas las tres concentraciones) y 4-AP tienen efectos benéficos sobre la mielinación, lo que era consistente con los resultados de pruebas de comportamiento. De esos grupos, los animales tratados con 3 mg/kg de HP 184 mostraron la menor desmielinación. Por lo tanto, 4-AP o HP 184 parecen capaces de mejorar la remielinación en una etapa mucho después de la lesión en la médula espinal. Es improbable que los datos simplemente representen una reducción en la velocidad de pérdida de mielina, pues no hay diferencia en la extensión de la desmielinación en los dos grupos de control, control 1 y control-2, evaluados al principio y al final del experimento.

EJEMPLO 7

EL EFECTO DE h-184 INTRAVENOSA EN LA IRRITACIÓN DE LA VEJIGA EN LA RATA

Este experimento muestra el efecto de HP 184 intravenosos en el modelo KCI reseñado por Frase et al (2001). Fraser et al combinaron tratamiento de sulfato de protamina, que se cree que destruye la función barrera de la célula paraguas urotelial, y concentraciones de orina fisiológica de KCl (500 nM). Los efectos de HP-184 intravenosos se compararon con el vehículo solo (n=4/grupo) en un estudio de respuesta a dosis acumulativo en ratas anestesiadas con uretano con irritación aguda de la vejiga. La cistometría abierta continua, que mide el llenado y el vaciado de la vejiga durante infusión continua, se utilizó para determinar el efecto de la droga en la irritación de la vejiga. Cuando la vejiga está irritada, se contrae más frecuentemente durante la misma velocidad de llenado debido a la sensibilización de los nervios aferentes C-fibra. La figura 8 ilustra la disminución dependiente de la dosis en la frecuencia de contracción de la vejiga desde los valores de irritación pre-administración a los efectos del vehículo solo. El Análisis de la Variación de Mediciones Repetidas indica que mientras el vehículo solo no tuvo efecto, HP-184 disminuyó significativamente la frecuencia de contracción de la vejiga en vejigas irritadas en un forma dependiente de la dosis ($P=0.0019$).

EJEMPLO 8

EL EFECTO DE HP 184 SOBRE LA NO PRODUCCIÓN EN RATONES

Se les inyectó a ratones 30 mg/kg de HP 184 (ip) 30 minutos antes de LPS (3mg/kg, ip). Se sacrificaron los ratones 5 horas después de la inyección de LPS, y se recolectó el plasma. Los niveles de nitrato se determinaron mediante el ensayo de Griess. Los grupos estaban compuestos de 9-10 ratones cada uno. Como se muestra gráficamente en la figura 9, el HP 184 reprime la falta de producción.

Después de ANOVA de una dirección, sólo se encontró que el tratamiento con LPS era significativamente diferente ($p < 0.01$) del tratamiento con vehículo.

EJEMPLO 9

HP 184 EN UN MODELO DE DOLOR NEUROPATICO

Ratas machos adulas Sprague-Dawley recibieron constricción unilateral del nervio L6 para producir lesión de nervio crónica. Después de la recuperación de la cirugía (3-7 días después de la operación) se hizo prueba en los animales respecto al umbral de retiro de la pata ante estímulos mecánicos aplicados a la pata lesionada. Esto se determinó mediante la aplicación de monofilamentos von Frey calibrados a la superficie plantar de cada pata trasera. Sólo los animales con un 50% de disminución en el umbral de retiro en la pata ligada se usaron en el estudio, y se asignaron al azar a los 6 grupos: tres grupos recibieron una de tres dosis de HP 184 (0.3, 3 y 20 mg/kg, po), un cuarto grupo recibió una sola dosis de otro compuesto llamado MDL (10 mg/kg, ip), un quinto grupo recibió gabapentino (90 mg/kg, sc), y un sexto grupo recibió solo vehículo. La prueba de comportamiento ocurrió 45 minutos después del gabapentin (90 mg/kg), sc, y tres horas después del HP 184, MDL y el vehículo. Se calculó una diferencia de cifras entre el umbral de retiro de la pata ligada y la no ligada para cada animal, y estas diferencias se sometieron a ANOVA con el grupo como factor principal. Los resultados se muestran en la Figura 10. La gráfica muestra la diferencia Media ($\pm$ SEM) menos el umbral de retiro de la pata derecha (normal) antes y después de la administración de la droga (fase aguda del estudio). El análisis estadístico revela una atenuación de respuesta a la dosis de la hiperglasia mecánica de ligadura L5 por HP 184 20 mg/kg y una clara inversión de hiperglasia por gabapentin 90 mg/kg. El análisis fue entre/dentro de medidas repetidas de ANOVA. Esto fue seguido por una comparación post-hoc (LSD) en el término de tiempo de interacción del grupo X para examinar valores pre- versus post droga de umbral de retiro.

Grupo: $F(5,43) = 8.18, p < 0.001$

Tiempo: $F(1,43) = 47.34, p < 0.001$

Tiempo de grupo X: $F(5,43) = 9.25, p < 0.001$

En animales tratados con vehículo, hay gran diferencia en umbrales de retiro mecánico entre las dos patas.

REFERENCIAS

- Agoston S, Bowman WC, Houwertjes MC, Rodger IW, Savage AO. Direct action of 4-aminopyridine on the contractility of a fast- contracting muscle in the cat. Clin Exp Pharm Physiol 1982; 9: 21-34.
- Aisen ML, Sevilla D, Gibson G, Kutt H, Blau A, Edelstein L, Hatch J and Blass J (1995) 3,4-Diaminopyridine as a treatment for amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci. 129:21-24.
- Alnaes E and Rahaminoff R (1975) On the role of mitochondria in transmitter release from motor nerve terminals. J. Physiol (Lond) 248:285-306.
- Backhaus C, Karkoutly C, Welsch M, and Kriegstein J (1992): A mouse model of focal cerebral ischemia for screening neuroprotective drug effects. J Pharmacological Meth. 27:27-32.
- Ball AP, Hpkinson RB, Farrell ID (1979): Human botulism caused by Clostridium Botulinum type E: the Birmingham outbreak Q.J. Med. 48-473-491.

Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS, Shah BR. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J. Neurotrauma*, 9:197-217, 1992.

- 5 Bennett GJ and Xie YK (1998) A peripheral mononeuropathy in rat produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 33:87-107.

Bever CT (1996) Aminopyridines in *Handbook of Multiple Sclerosis*, ed SD Lick, Marcel Dekker, pp 429-42.

- 10 Bever CT, Jr., Young D, Anderson PA, Krumholz A, Conway K, Leslie J, Eddington N, Plaisance KI, Panitch HS, Dhib-Jalbut S. The effects of 4-aminopyridine in multiple sclerosis patients: results of a randomized, placebo-controlled, double-blind, concentration-controlled, crossover trial. *Neurol* 1994; 44: 1054-1059.

Blight AR and DeCrescito V. Morphometric analysis of experimental spinal cord injury in the cat: the relation of injury intensity to survival of myelinated axons. *Neuroscience* 1986; 19:321-41.

- 15 Blight AR. Morphology of chronic spinal cord injury in the cat: Analysis of myelinated axons by line-sampling. *Neuroscience*, 10:521-543, 1983.

Blight AR. Morphometric analysis of a model of spinal cord injury in guinea pigs, with behavioral evidence of delayed secondary pathology. *J Neurol Sci*, 103: 156-171, 1991.

- 20 Bostock H, Sherratt RM, Sears TA. Overcoming conduction failure in demyelinated nerve fibres by prolonging action potentials. *Nature* 1978; 274: 385-387.

Bostock H, Sears TA, Sherratt RM. The effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium ions on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *J Physiol(Lond)* 1981; 313: 301-315.

- 25 Bunge RP, Puckett WR, Bercerra JL, Marcillo A, Quencer RM. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal

demyelination. In: Seil FJ, ed. *Advances in neurology*, vol 59, New York: Raven Press, 1993:75-89.

Davis FA, Stefoski D, Rush J. Orally administered 4-aminopyridine improves clinical signs in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1990; 27: 186-192.

5

Duchen, MR (1992) Ca²⁺-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *Biochem J.* 283:41-50.

10

Eder C (1998) Ion channels in microglia (brain macrophages) *Am. J. Physiol.* 275 (Cell Physiol. 44):C327-C342.

15

Fraser MO, Chuang Y, Lavelle JP, Yoshimura N, de Groat WC, Chancellor MB (2001) a reliable, nondestructive animal model for interstitial cystitis: intravesical low-dose protamine sulfate combine with physiological concentrations of potassium chloride. *Urology* 57(Suppl 1): 112

Gruner JA and Yee AK (1999) 4-Aminopyridine enhances motor evoked potentials following graded spinal cord compression injury in rats. *Brain Res.* 816:446-56.

Gruner JA, Wade CK, Menna G and Stokes BT. Myoelectric evoked potentials

20

Versus locomotor recovery in chronic spinal cord injured rats. *J. neurotrauma*, 10:327-347, 1993.

Gruner JA, Yee AK, Blight AR. Histological and functional evaluation of experimental spinal cord injury: evidence of a stepwise response to graded compression. *Brain Res.*, 729:90-101, 1996.

25

Gruner JA, Yee AK. 4-Aminopyridine enhances motor evoked potentials following graded spinal cord compression injury in rats. *Brain Res.* Jan 23; 816(2):446-56, 1999.

Hamilton, MG and Lundy PM (1995) Effect of ruthenium red on voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *JPET* 273:940-947.

Hayes KC, Blight AR, Potter PJ, Allatt RD, Hsieh JT, Wolfe DL, Lam S, Hamilton JT. Preclinical trial of 4-aminopyridine in patients with chronic spinal cord injury. Paraplegia 1993; 31: 216-224.

- 5 Hayes KC, Potter PJ, Wolfe DL, Hsieh JT, Delaney GA, Blight AR. 4-Aminopyridine-sensitive neurologic deficits in patients with spinal cord injury. J Neurotrauma 1994; 11: 433-446.

Hirsh JK, Quandt FN. Aminopyridine block of potassium channels in mouse neuroblastoma cells. J Pharmacol Exp Ther 1993; 267: 604-611.

- 10 Hockfield S. Carlson S, Evans C, et al. Selected methods for antibody and nucleic acid probes. USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press, p. 125-130, 1993.

Jankowska. E, Lundberg A., Rudomin P. and Sykova E. Effects of 4-Aminopyridine on synaptic transmission in the cat spinal cord. Brain Research, 240:117-129,1982.

- 15 Jones RE, Heron JR, Foster DH, Snelgar RS, Mason RJ. Effects of 4-aminopyridine in patients with multiple sclerosis. J Neurol Sci 1983; 60: 353-362.

Kerasidis H, Wrathall JR and Gale K. Behavioral assessment of functional deficit in rats with contusive spinal cord injury. J. Neurosci. Methods, 20:167-179,1987.

- 20 Lowry MAR, Goldbert JI and Belosevic M (1998) Induction of nitric oxide (NO) synthesis in murine macrophages requires potassium channel activity. Clin Exp Immunol 111:597-603.

Lundh H (1978) Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. Brain Res. 153:307-318.

- 25 Lundh H and Thesleff S (1977) The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter from motor nerve terminals. Eur. J. Pharmacol. 42:411-12.

Lundh H, Nilsson O, Rosen I. 4-aminopyridine—a new drug tested in the treatment of Eaton- Lambert syndrome. J Neurol Neurosurg Psychiat 1977; 40: 1109-1112.

Lundh H, Leander S, Thesleff S (1977): Antagonism of the paralysis produced by botulinum toxin in the rat. *J. Neurol. Sci.* 32:29-43.

Kim SH and Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-363

- 5 Madge DJ (1998): Sodium channels: recent developments and therapeutic potential, In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Volume 33 (Bristol JA Editor in chief, Academic Press, San Diego), pp 51-60.

McEvoy KM, Windebank AJ, Daube JR and Low P (1989): 3,4-Diaminopyridine in the treatment of Lambert-Eaton myasthenic syndrome (*N. Engl. J. Med.* 321:1567-71.

- 10 McIlly LM, Halley F, Souness JE McKenna J, Benning V, Birrell M, Burton B, Belvisi M, Collis A, Constan A, Foster M, Hele D, Jayyosi Z, Kelley M, Maslen C, Miller G, Ouldelhkim MC, Page K, Phipps S, Pollock K, Porter B, Ratcliffe AJ, Redford EJ, Webber S, Slater B, Thybaud V, Wilsher N (2001) The discovery of RPR 200765A, a p38 MAP kinase inhibitor displaying a good oral anti-arthritic efficacy. *Bioorg Med*
15 *Chem* 9:537-54.

Meza-Ruiz G and Tapia R (1978) [³H]GABA release in synaptosomal fractions after intracranial administration of ruthenium red. *Brain Res.* 154:163-166.

- 20 O'Neill MJ, Bath CP, Dell CP, Hicks CA, Gilmore J, Ambler SJ, Ward MA, Bleakman D (1997): Effects of Ca²⁺ and Na⁺ channel inhibitors in vitro and in global cerebral ischaemia in vivo. *Eur J Pharmacol* 332(2):121-31 RIL 10 mg/kg reference

- Pendlebury ST, Lee MA, Blamire AM, Styles P, and Matthews PM (2000) Correlating magnetic resonance imaging markers of axonal injury and demyelination in motor
25 impairment secondary to stroke and multiple sclerosis. *Magn. Reson. Imaging* 18:369-78.

- Person RJ and Kuhn JA (1979) Depression of spontaneous and ionophore-induced transmitter release by ruthenium red at the neuromuscular junction. *Brain Res. Bull*
30 4:669-674.

- Potter PJ, Hayes KC, Hsieh JT, Delaney GA, Segal JL. Sustained improvements in neurological function in spinal cord injured patients treated with oral 4-aminopyridine: three cases. *Spinal Cord* 1998a; 36:147-155.
- 5 Potter PJ, Hayes KC, Segal JL Hsieh JT, Brunnemann SR, Delaney GA, Tierney DS and Mason D (1998b): Randomized double-blind crossover trial of fampridine-SR (sustained release 4-aminopyridine) in patients with incomplete spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 15:837-49.
- Pyo H, Chung S, Jou I, Gwag B and Joe EH (1997) Expression and function of
10 outward K⁺ channels induces by lipopolysaccharide in microglia. *Mol Cells* 7:610-614.
- Qiao J, Hayes KC, Hsieh JT, Potter PJ, and Delaney GA (1997): Effects of 4-aminopyridine on motor evoked potentials with spinal cord injury. *J Neurotrauma* 14:135-49.
- 15 Rampe, D., Murawsky, M.K., Grau, J. and Lewis, E.W. The antipsychotic agent sertindole is a high affinity antagonist of the human cardiac potassium channel HERG. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 788-793, 1998.
- Rataud J, Bebamot F, Mary V, Pratt J and Stutzmann JM (1994): Comparative study
20 of voltage-sensitive sodium channel blockers in focal ischaemia and electric convulsions in rodents. *Neuro Sci Lett.* 172:19-23.
- Sakurai M and Kanazawa I (1999) Positive symptoms in multiple sclerosis: their
25 treatment with sodium channel blockers, lidocain and mexiletine. *J Neurol. Sci.* 162:162-168.
- Saruhashi Y and Young W. Effect of mianserin on locomotory function after thoracic spinal cord hemisection in rats. *Expl Neurol.*, 129:207-216, 1994
- Savage AO. A comparison of the effects of 4-dimethylaminopyridine and 4-aminopyridine on isolated cardiac and skeletal muscle preparations. *Arch Internat*
30 *Pharmacodynam Therapie* 1985; 273: 262-276.

Schwid SR, Petrie MD, McDermott MP, Tierney DS, Mason DH and Goodman AD (1997): Quantitative assessment of sustained release 4-aminopyridine for symptomatic relief of multiple sclerosis. *Neurology* 48:817-21.

5 Segal JL, Pathak MS, Hernandez JP, Himber PL, Brunnemann SR and Charter RS (1999) : Safety and efficacy of 4-aminopyridine in humans with spinal cord injury : A long-term, Controlled Trial. *Pharmacotherapy* 19:713-723.

Seltzer Z, Dubner R and Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-218.

10 Sherratt RM, Bostock H, Sears TA. Effects of 4-aminopyridine on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *Nature* 1980; 283: 570-572.

Shi R, Blight AR. Differential effects of low and high concentrations of 4-aminopyridine on axonal conduction in normal and injured spinal cord. *Neurosci* 1997; 77: 553-562.

15 Smith, C.P., A.T. Woods, Corbett, R., S.M. Chesson, G.M. Bores, W.W. Petko, J.E. Roehr and S. Kongsamut. Serotonergic activity of HP 184: Does spontaneous release have a role? *Neurochemical Research* 21:573-583, 1996.

20 Smith, C.P., L.R. Brougham, F.P. Huger, L. Davis, J.T. Klein and R.C. Effland. HP 184 [N-(n-propyl)-N-(3-fluoro-4-pyridinyl)-1H-3-methylindol-1-amine hydrochloride]: *In vitro* spontaneous release of acetylcholine (ACh) and norepinephrine (NE). *Drug Dev. Res.* 30:203-212, 1993.

Stefoski D, Davis FA, Faut M, Schauf CL. 4-Aminopyridine improves clinical signs in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1987; 21: 71-77.

25 Sweitzer SM, Colburn RW, Rutkowski M and DeLeo JA (1999) Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1 β expression that correlates with pain behavior in the rat. *Brain Res.* 829:209-221.

Tang L and Kongsamut S (1996) Frequency-dependent inhibition of neurotransmitter release by besipirdine and HP 184. *Eur J Pharmacol* 300:71-74.

Tang, L., Huger, F.P., Klein, J.T., Davis, L., Martin, L., Shimshock, S., Effland, R.C., Smith, C.P. and Kongsamut, S. (1998) 4-Aminopyridine derivatives: A family of novel modulators of voltage-dependent sodium-channels. *Drug Dev. Res.*, 44:8-13.

5

Tang L., C.P. Smith and S. Kongsamut. Besipirdine inhibits effects of veratridine at the voltage dependent sodium channel. *Br J. Pharmacol* 116:2468-2472, 1995.

10

Tapia R and Velasco I (1997) Ruthenium red as a tool to study calcium channels, neuronal death and the function of neural pathways. *Neurochem Int* 30:137-147.

Tapia R and Meza-Ruiz G (1977) Inhibition by ruthenium red of the calcium-dependent release of [3H]GABA in synaptosomal fractions. *Brain Res.* 126:160-166.

15

Tapia R, Meza-Ruiz G, Duran L and Drucker-Colin RD (1976) Convulsions or flaccid paralysis induced by ruthenium red depending on route of administration. *Brain Res.* 116:101-109.

20

Tapia R and Stiges M (1982) Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250:291-9.

Tapia R (1982) Antagonism of the ruthenium red-induced paralysis in mice by 4-aminopyridine, guanidine and lanthanum. *Neurosci Lett* 35:615-623.

25

Targ EF, Kocsis JD. 4-Aminopyridine leads to restoration of conduction in demyelinated rat sciatic nerve. *Brain Res* 1985; 328: 358-361.

Targ EF, Kocsis JD. Action potential characteristics of demyelinated rat sciatic nerve following application of 4-aminopyridine. *Brain Res* 1986; 363: 1-9.

30

van Diemen HA, Polman CH, van Dongen TM, van Loenen AC, Nauta JJ, van Walbeek HK, Koetsier JC. The effect of 4-aminopyridine on clinical signs in multiple sclerosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind, cross-over study. *Ann Neurol* 1992; 32: 123-130.

van Diemen HA, Polman CH, van Dongen MM, Nauta JJ, Strijers RL, van Loenen AC, Bertelsmann FW, Koetsier JC. 4-Aminopyridine induces functional improvement in multiple sclerosis patients: a neurophysiological study. J Neurol Sci 1993; 116: 220-226.

- 5 Yamaguchi S and Rogawski MA (1992): Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice. Epilepsy Res. 11:9-16.

Patents:

- 10 Effland RC, Klein JT, Davis KL Olsen GE; U.S. Patent No. 4,970,218 entitled "N-(Pyridinyl)-1H-indol-1-amines".

Hansebout RR and Blight AR; U.S. Patent No. 5,545,648 entitled "Use of 4-aminopyridine in the reduction of chronic pain and spasticity in a spinal cord injured patient".

15

Hansebout RR and Blight AR; WO 94/14439 entitled "The use of 4-aminopyridine in the treatment of a neurological condition".

- 20 Huger, F.P., Kongsamut, S., C.P. Smith & L. Tang. US Patent No. 5,776,955 entitled "Use of unsubstituted and substituted N-(pyrrol-1-yl) pyridinamines as anticonvulsant agents".

- 25 Kongsamut, S., C.P. Smith & A.T. Woods; U.S. Patent No. 5,356,910 entitled "Use of N-(Pyridinyl)-1H-indol-1-amines for the Treatment of Obsessive Compulsive Disorder".

- Kongsamut, S., C.P. Smith & A.T. Woods; US Patent No. 5,356,910 entitled "Use of N-(Pyridinyl)-1H-indol-1-amines for the preparation of a medicament for the treatment of obsessive-compulsive disorders".

30

Masterson JG and Myers M; US Patent No. 5,370,879 entitled "Formulations and their use in the treatment of neurological diseases".

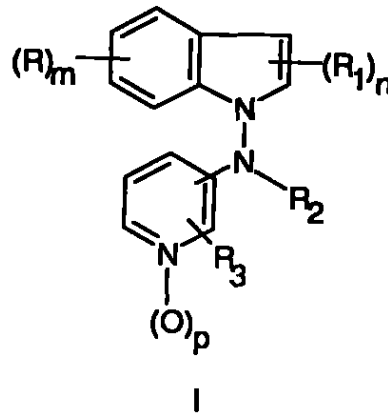
Masterson JG and Myers M; US Patent No. 5,580,580 entitled "Formulations and their use in the treatment of neurological diseases".

5 Masterson JG and Myers M; US Patent No. 5,540,938 entitled "Formulations and their use in the treatment of neurological diseases".

Wurtman RJ and Buyukysal R; WO 89/09600 entitled "Method and composition for treating neurological disorders".

REIVINDICAMOS

1. Un método de tratamiento de Enfermedades Desmielinantes, método que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula I



en donde

m es 0, 1 ó 2;

n es 0, 1 ó 2;

p es 0 ó 1;

cada R es independientemente hidrógeno, halógeno, trifluorometil, C₁-C₆alquilo, C₁-C₆alcoxi, benziloxi, hidroxil, nitro ó amino;

cada R₁ es independientemente hidrógeno, C₁-C₆alquilo, C₁-C₆alquenilo, C₁-C₆alcanoil, halógeno, ciano, -C(=O)C₁-C₆alquilo, C₁-C₆alquilenocn, C₁-C₆alquilenonR'R'' en donde R' y R'' son cada uno independientemente hidrógeno o C₁-C₆alquilo, C₁-C₆alquilenoc(=O)C₁-C₆alquilo, ó -CH(OH)R₄ en donde R₄ es hidrógeno ó C₁-C₆alquilo;

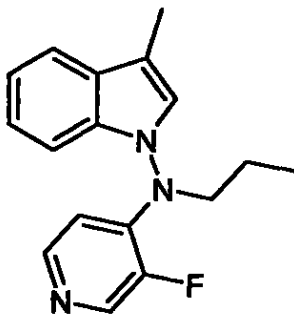
R₂ es hidrógeno, C₁-C₆alquilo opcionalmente sustituido por halógeno, hidroxil ó benziloxi, C₁-C₆alquenilo, C₁-C₆alquinilo, -CO₂C₁-C₆alquilo, ó -R₅-NR'R'' en donde R₅ es C₁-C₆alquilenilo, C₁-C₆alquenilenilo ó C₁-C₆alquinilenilo

y R' y R'' son cada uno independientemente hidrógeno, C₁-C₆alquilo o alternativamente el grupo -NR'R'' como un todo es 1-pirrolidinil; y R₃ es hidrógeno, nitro, amino, halógeno, C₁-C₆alcoxi, hidroxilo o C₁-C₆alquilo o una sal farmacéuticamente aceptable de ellos.

2. El método de la reivindicación 1 en donde R es hidrógeno, trifluorometil, o C₁-C₆alquilo; R₁ es hidrógeno o C₁-C₆alquilo; R₂ es hidrógeno o C₁-C₆alquilo; R₃ es hidrógeno, C₁-C₆alquilo o halógeno; y p es 0.

3. El método de la reivindicación 1 en donde la Enfermedad Desmielinizante es esclerosis múltiple.

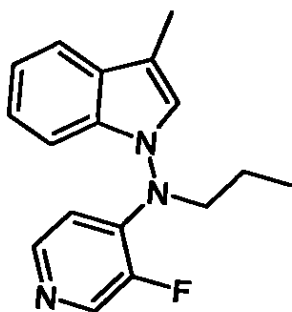
4. El método de la reivindicación 2 en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula



5. El método de la reivindicación 4 en donde la Enfermedad Desmielinizante es esclerosis múltiple.

6. Un método de tratar las Condiciones Desmielinizantes, método que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la fórmula I.

7. El método de la reivindicación 6 en donde R' es hidrógeno, halógeno, trifluorometil, o C₁-C₆alquilo; R₁ es hidrógeno o C₁-C₆alquilo; R₂ es hidrógeno o C₁-C₆alquilo; R₃ es hidrógeno, C₁-C₆alquilo o halógeno; y p es 0.
8. El método de la reivindicación 6 en donde la Condición Desmielinizante es Lesión de la Médula Espinal.
9. El método de la reivindicación 6 en donde la Condición Desmielinizante es Lesión Cerebral Traumática.
10. El método de la reivindicación 6 en donde la Condición Desmielinizante es Apoplejía.
11. El método de la reivindicación 7 en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula



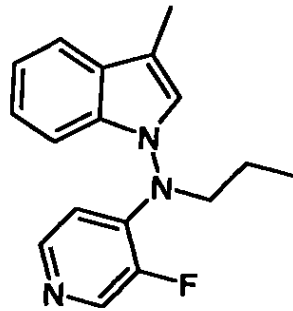
12. El método de la reivindicación 11 en donde la Condición Desmielinizante es Lesión de la Médula Espinal.
13. El método de la reivindicación 11 en donde la Condición Desmielinizante es Lesión Cerebral Traumática.

14. El método de la reivindicación 11 en donde la Condición Desmielinizante es Apoplejía.

15. Un método de Rehabilitación de la Apoplejía, método que comprende administrar a un paciente que los necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la reivindicación 1.

16. El método de la reivindicación 14 en donde R es hidrógeno, halógeno, trifluorometil, o C₁-C₆alquilo; R₁ es hidrógeno o C₁-C₆alquilo; R₂ es hidrógeno o C₁-C₆alquilo; R₃ es hidrógeno, C₁-C₆alquilo o halógeno; y p es 0.

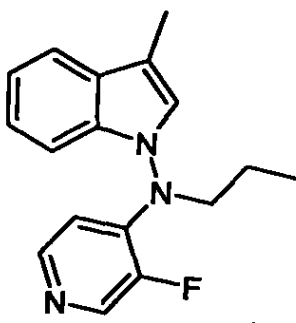
17. El método de la reivindicación 16 en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula



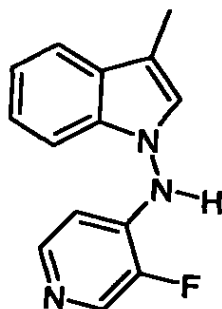
18. Un método para bloquear el canal de potasio en un paciente que lo necesite administrándole a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la reivindicación 1.

19. El método de la reivindicación 18 en donde R es hidrógeno, halógeno, trifluorometil, o C₁-C₆alquilo; R₁ es hidrógeno o C₁-C₆alquilo; R₂ es hidrógeno o C₁-C₆alquilo; R₃ es hidrógeno, C₁-C₆alquilo o halógeno; y p es 0.

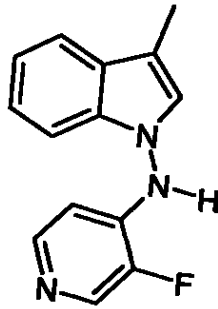
20. El método de la reivindicación 19 en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula



21. El método de la reivindicación 2 en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula



22. El método de la reivindicación 7 en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula



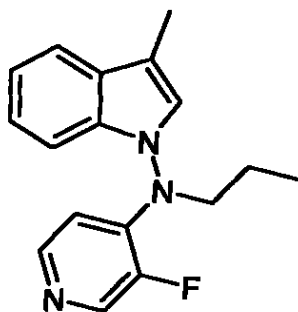
23. El método de la reivindicación 22 en donde la condición desmielinizante es Lesión de la Médula Espinal.

24. El método de la reivindicación 22 en donde la condición desmielinizante es Lesión Cerebral Traumática.

25. El método de la reivindicación 22 en donde la condición desmielinizante es Apoplejía.

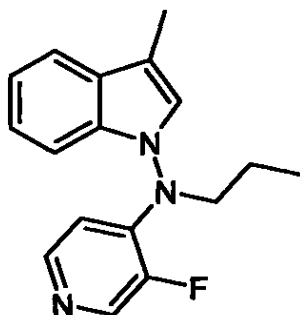
26. Un método para tratar el Dolor Neuropático, método que comprende administrar a un paciente que los necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la reivindicación 1.

27. El método de la reivindicación 26 en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula



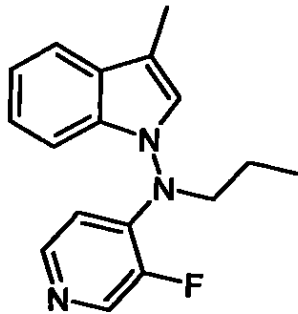
28. Un método para tratar la Irritación de la Vejiga, método que comprende administrar a un paciente que los necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la reivindicación 1.

29. El método de la reivindicación 28 en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula



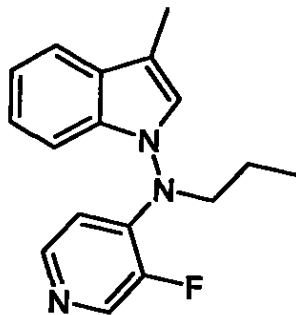
30. Un método para tratar la Vejiga Excesivamente Activa, método que comprende administrar a un paciente que los necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la reivindicación 1.

31. El método de la reivindicación 30 en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula



32. Un método para tratar el dolor inducido por quemokinesis, método que comprende administrar a un paciente que los necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la reivindicación 1.

33. El método de la reivindicación 32 en donde el compuesto tiene la siguiente fórmula



ABSTRACTO

N-(piridinil)-1H-indol-1-aminas de la fórmula I proporcionan una combinación única de propiedades bloqueadoras de los canales de sodio y de potasio. Estos compuestos son útiles para el tratamiento de Enfermedades y Condiciones Desmielinizantes como la Esclerosis Múltiple, la Lesión de la Médula Espinal, la Lesión Cerebral Traumática y la Apoplejía. Los compuestos también son útiles para la Rehabilitación de la Apoplejía, el tratamiento de la Irritación y Disfunción de la Vejiga, y el tratamiento del Dolor Neuropático y del Dolor Inducido por la Quemoquinesis.

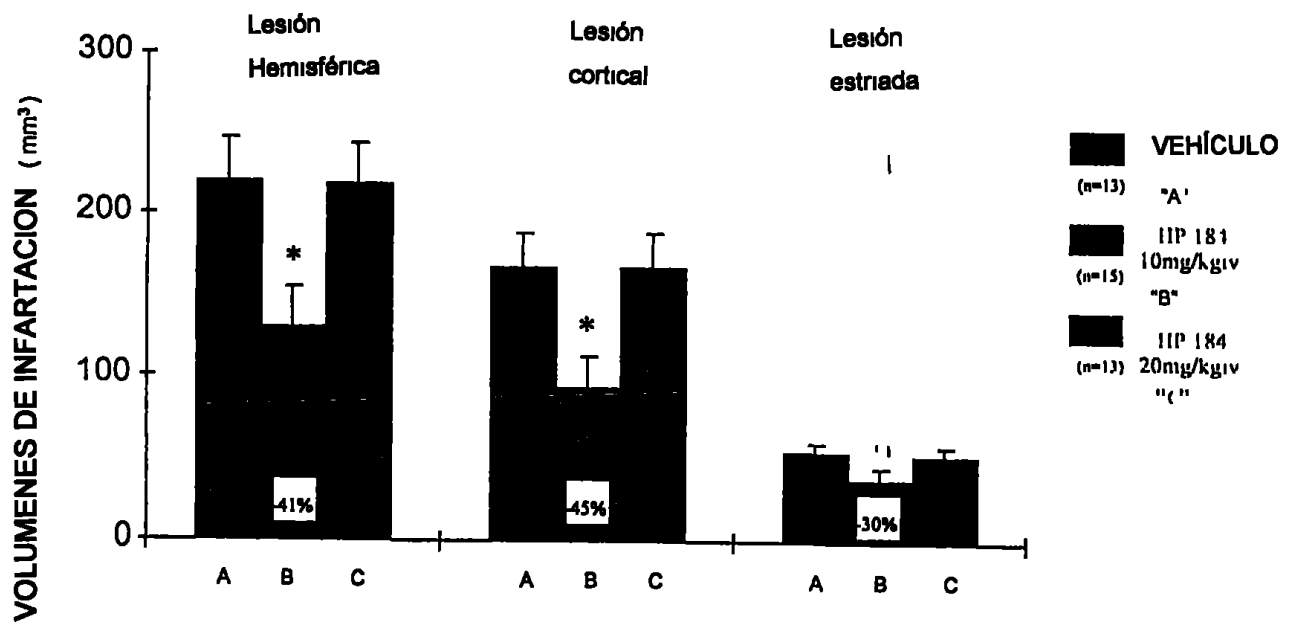


Fig 1

59

12/1

12/1

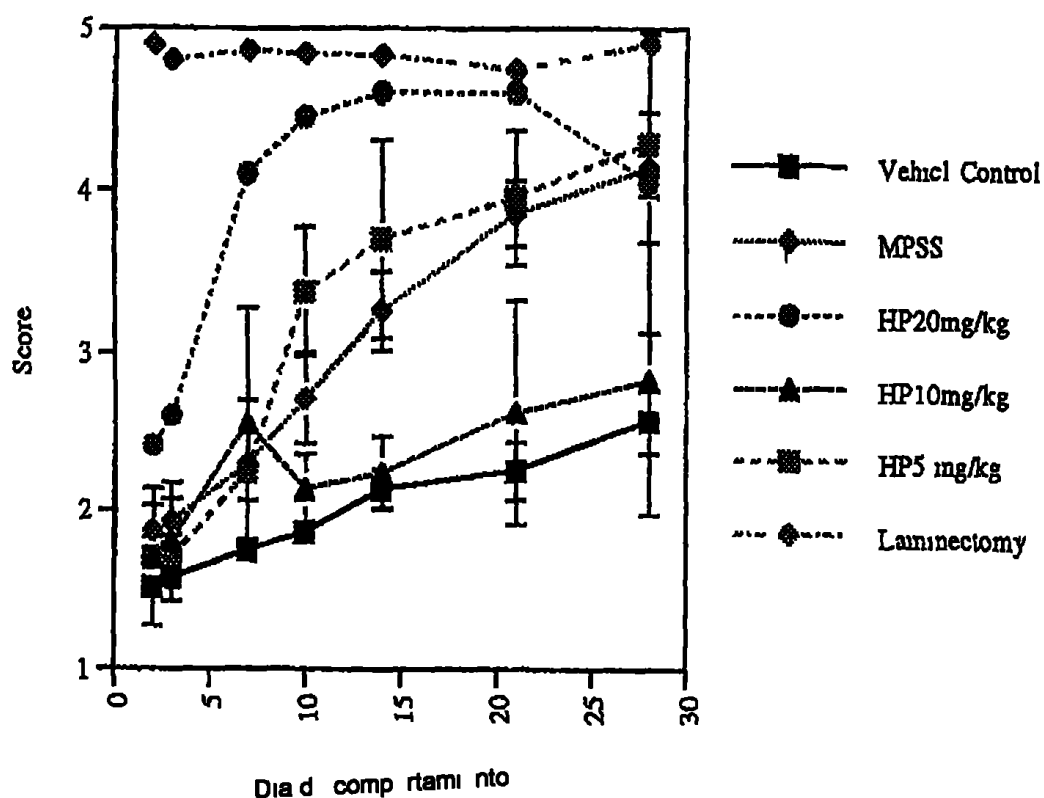


Fig 2

60

2/11

184

APR 19 2001

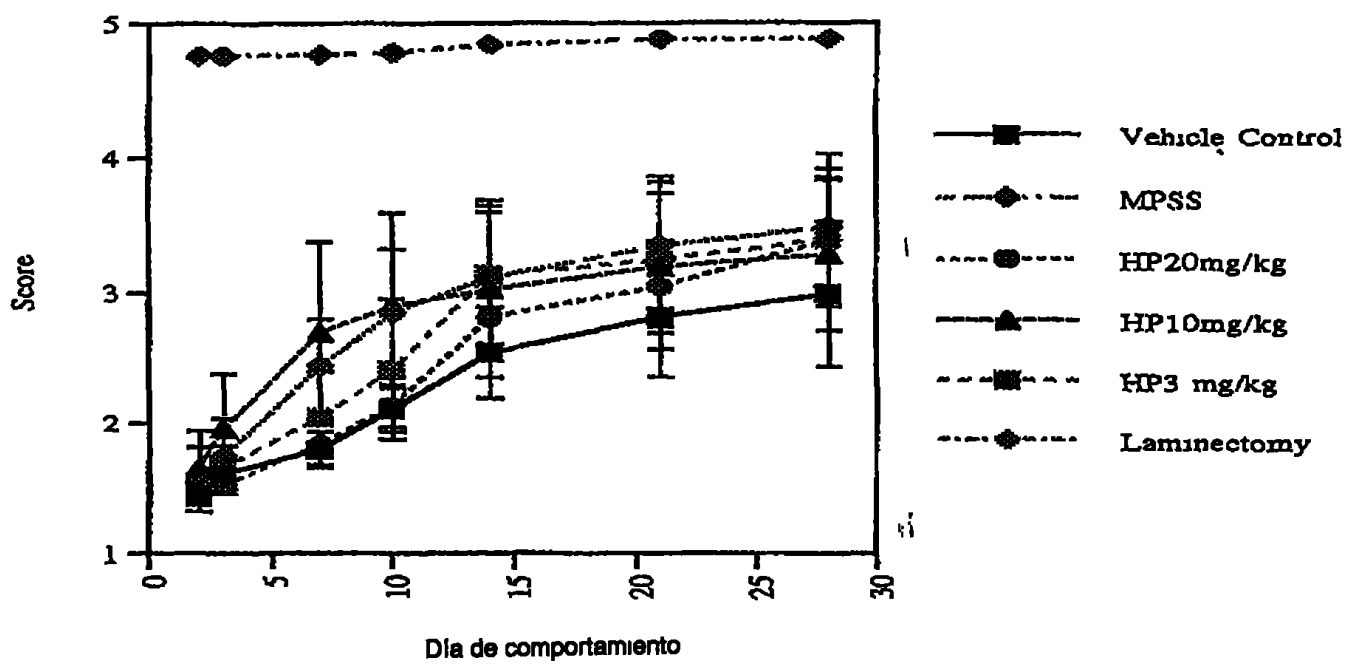


Fig 3

Prueba a Campo Abierto

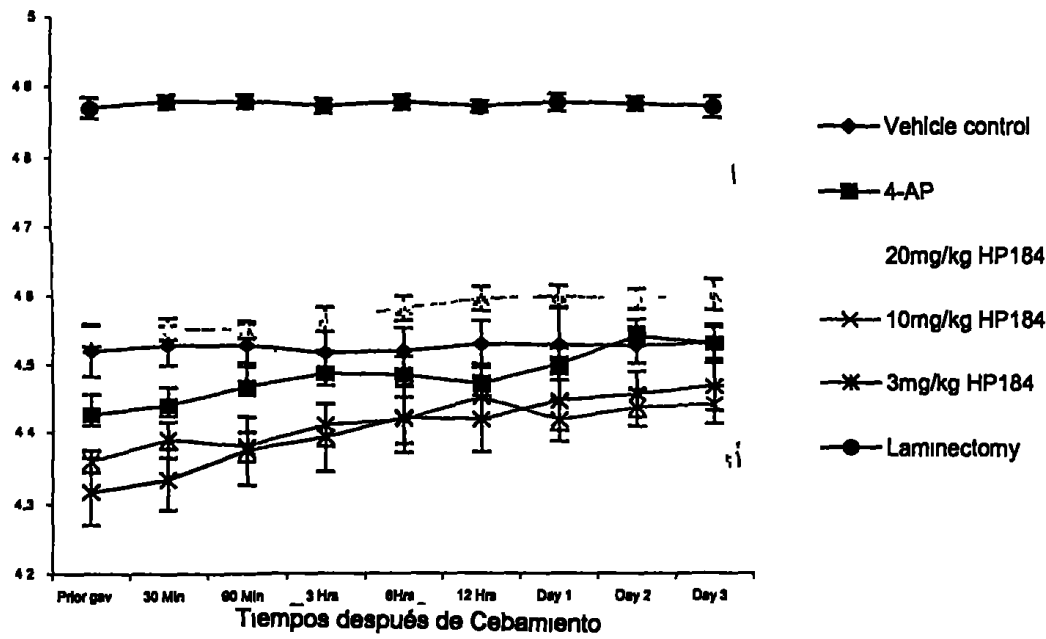


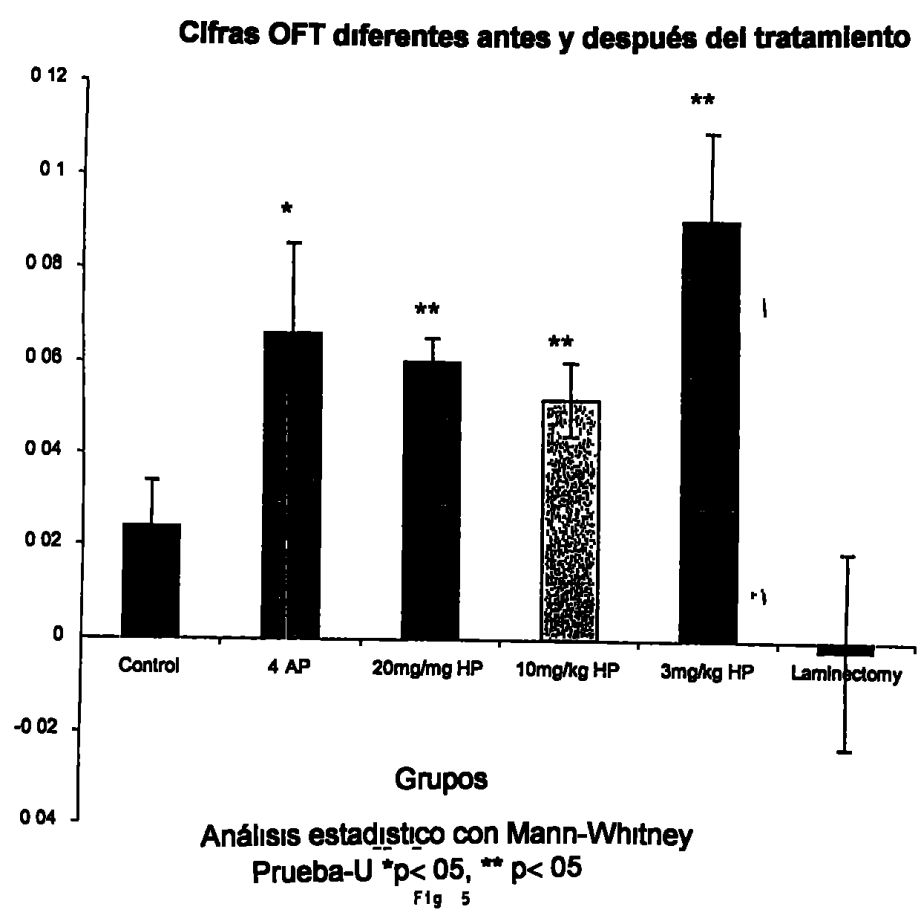
Fig 4

62

4/11

184 68

135
68



Comparación de HP 184 y 4-AP vs Vehículo (control)
En Pruebas en campo abierto (OFT) en Ratas con
Lesión moderada establecida en la Médula espinal,
OFT evaluado 3 hrs después de dosificación

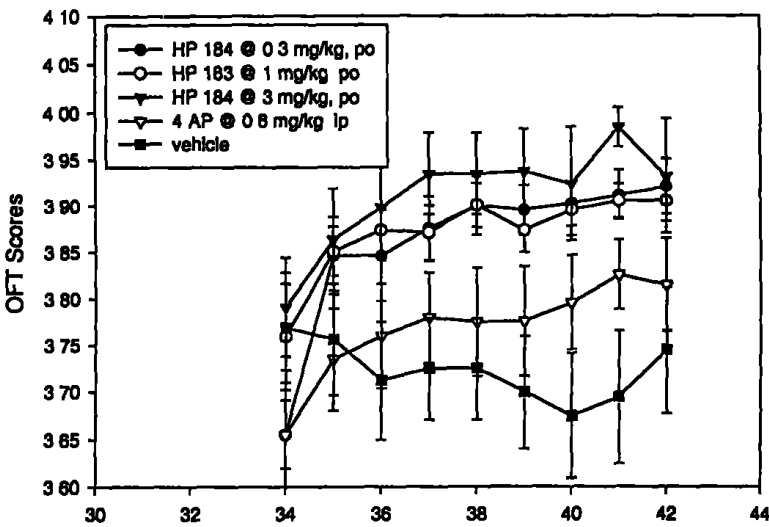


Fig 6

b9

11/9

et al

Cambios de cifras OFT, Normalizadas para cada rata

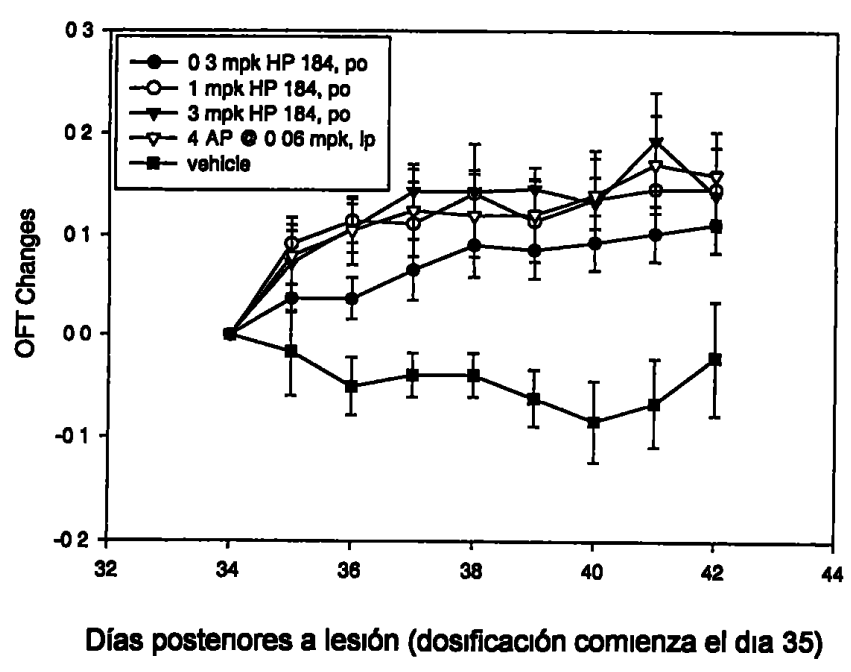


Fig 7

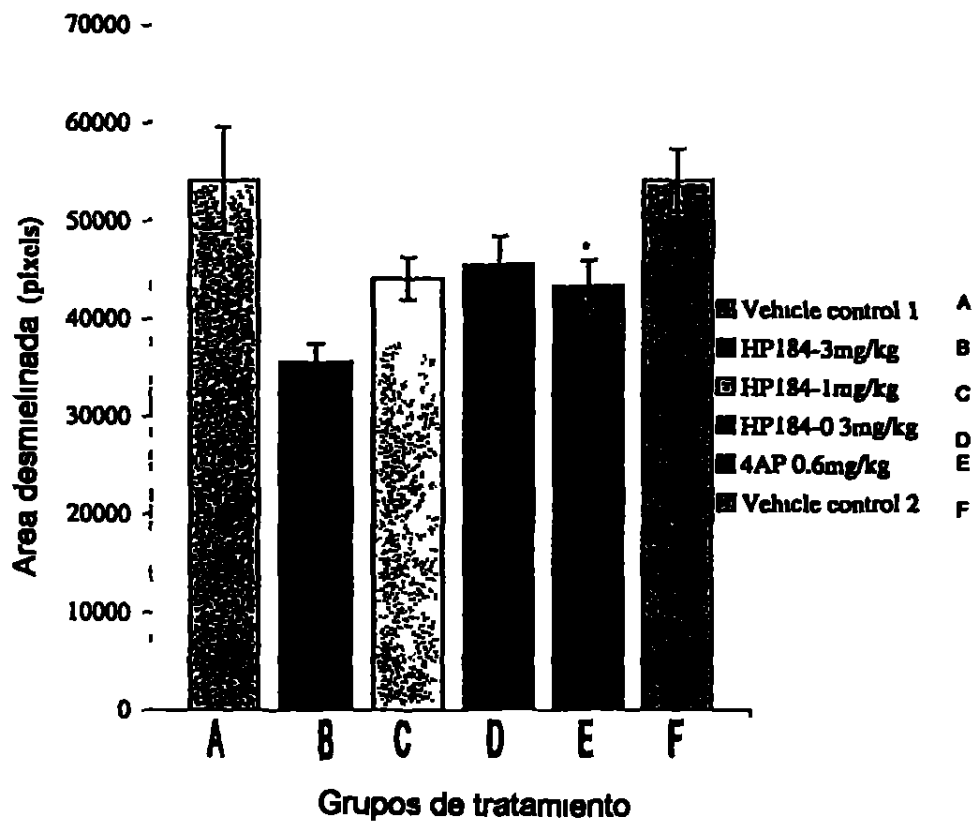


Fig 8

El Efecto de HP-184 Intravenoso
Sobre la Frecuencia de contracción
De la Vejiga después de Irritación
de la Vejiga (n=4/grupo)

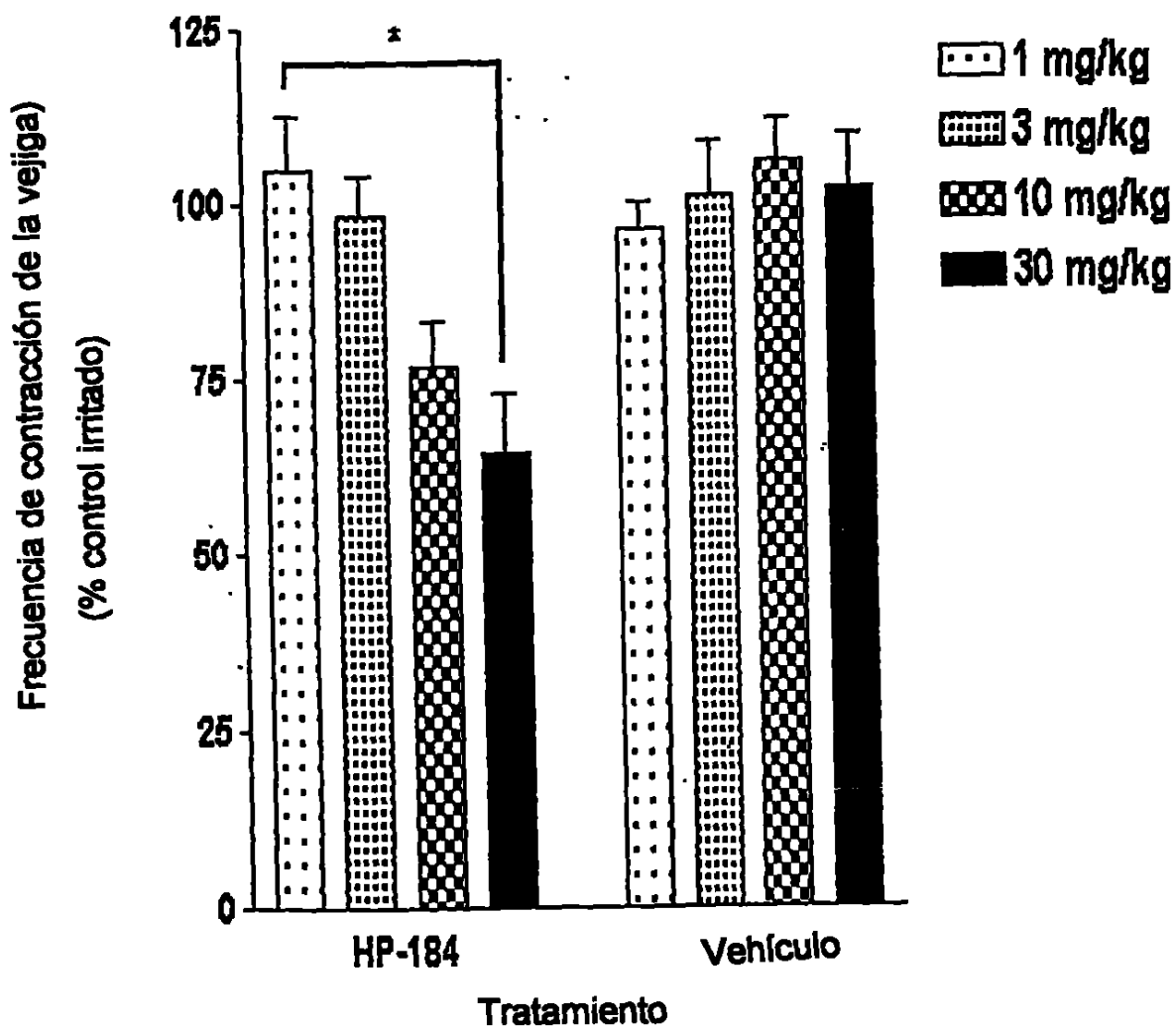


Fig. 9

145 74
192

68

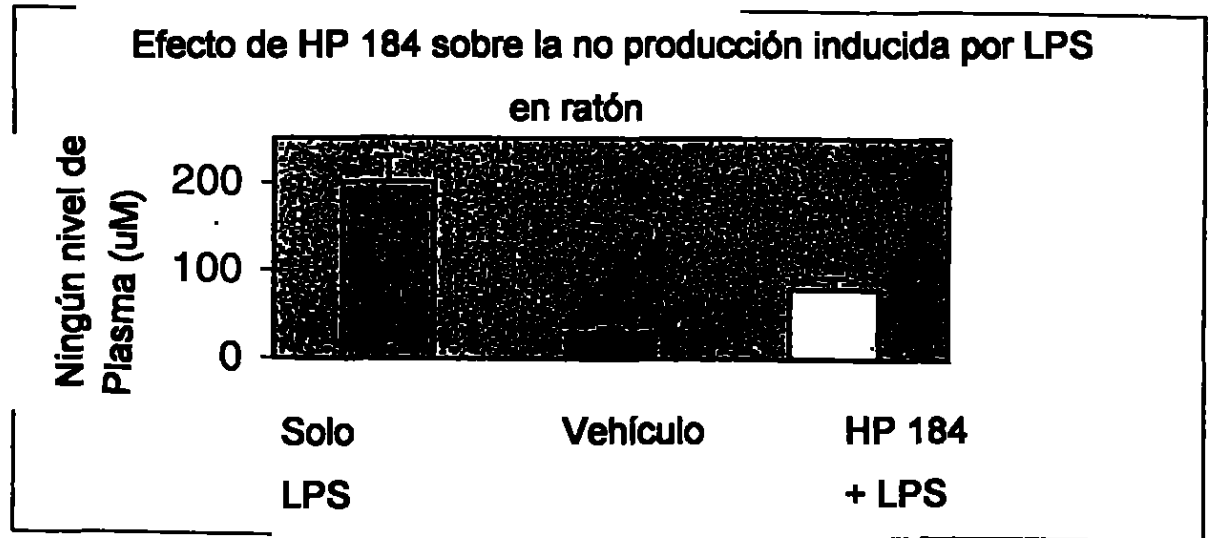


Fig. 10

14. 28
193

69

Umbral de retiro mecánico de la pata (pata izquierda-pata derecha, nM)

Tratamiento Agudo (dosis única)

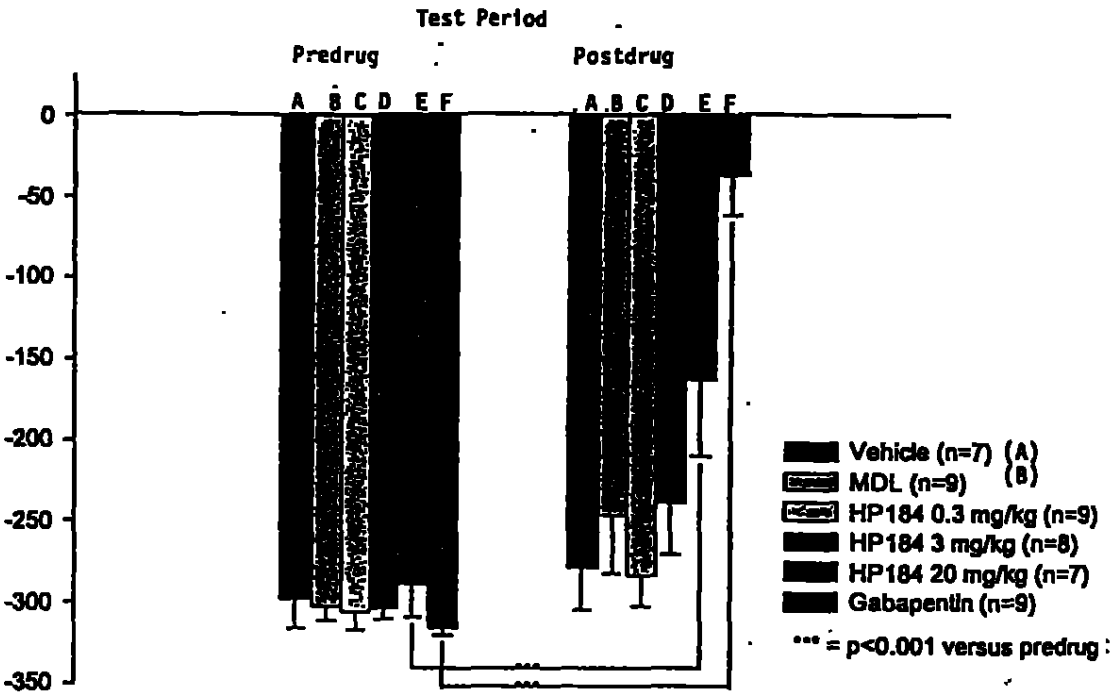


Fig. 11