

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 846**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/522** (2006.01)

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2008 E 08794174 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 2200616**

54 Título: **Inhibidores de MPO para el tratamiento de la enfermedad de Huntington y la atrofia multisistémica**

30 Prioridad:

**23.08.2007 US 957525 P**

**23.08.2007 US 957523 P**

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

**03.04.2013**

73 Titular/es:

**ASTRAZENECA AB (100.0%)**

**151 85 Södertälje , SE**

72 Inventor/es:

**ERIKSSON, HÅKAN y**

**POEWE, WERNER**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 399 846 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Inhibidores de MPO para el tratamiento de la enfermedad de Huntington y la atrofia multisistémica.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al uso de un inhibidor de la mieloperoxidasa (MPO) o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo para el tratamiento de la atrofia multisistémica (AMS). La presente invención se refiere además al uso de un inhibidor de la mieloperoxidasa (MPO) o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo para el tratamiento de la enfermedad de Huntington (EH).

**Antecedentes de la invención**

10 La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima que contiene un grupo hemo y que se encuentra predominantemente en los leucocitos polimorfonucleados (PMN). La MPO es un miembro de una familia de proteínas diferentes de peroxidases de mamíferos que también incluye la peroxidasa de eosinófilos, la peroxidasa tiroidea, la peroxidasa salival, la lactoperoxidasa, la prostaglandina H sintasa y otras. La enzima madura es un homodímero. Cada mitad de la molécula contiene un grupo hemo unido covalentemente que presenta unas propiedades espectrales inusuales que son responsables del color verde característico de la MPO. La escisión del puente disulfuro que une las dos mitades de la MPO produce la hemienzima que presenta propiedades espectrales y catalíticas que no se pueden distinguir de las de la enzima intacta. La enzima utiliza el peróxido de hidrógeno para oxidar el cloruro a ácido hipocloroso. También son sustratos fisiológicos de la MPO otros haluros y pseudohaluros (como el tiocianato).

15 Los PMN son de especial importancia para combatir infecciones. Son células que contienen MPO, cuya una acción microbicida está bien documentada. Los PMN engullen los microorganismos inespecíficamente mediante fagocitosis, y los incorporan en vacuolas, denominadas fagosomas, que se fusionan con los gránulos que contienen mieloperoxidasa para formar los fagolisosomas. En los fagolisosomas, la actividad enzimática de la mieloperoxidasa conduce a la formación del ácido hipocloroso, un compuesto bactericida de gran potencia. El ácido hipocloroso se oxida por sí solo, y reacciona con la mayor avidez con tioles y tioéteres, pero también convierte las aminas en cloraminas, y clora los aminoácidos aromáticos. Los macrófagos son células fagocíticas grandes que, al igual que los PMN, son capaces de fagocitar los microorganismos. Los macrófagos tienen la capacidad de generar peróxido de hidrógeno, y también producen mieloperoxidasa tras ser activados. La MPO y el peróxido de hidrógeno también se pueden liberar al exterior de las células, donde la reacción con el cloruro puede provocar daños al tejido adyacente.

20 La conexión de la actividad mieloperoxidasa con las enfermedades se ha demostrado en las enfermedades neurológicas con una respuesta neuroinflamatoria, entre ellas, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (EP).

25 Las células que expresan la MPO son muy abundantes en el torrente sanguíneo y en los tejidos que sufren inflamaciones. Más en particular, se ha documentado que durante la enfermedad se detectan en el SNC macrófagos, microglíocitos, astrocitos y/o neuronas que contienen MPO: la esclerosis múltiple (Nagra R. M. et al. *Journal of Neuroimmunology*, 1997; 78(1-2): 97-107; Marik C. et al. *Brain* 2007; 130: 2800-15; Gray E. et al., *Brain Pathology*. 2008; 18: 86-95), la enfermedad de Parkinson (Choi D-K. et al. *J. Neurosci* 2005; 25(28): 6594-600) y la enfermedad de Alzheimer (Reynolds W. F. et al. *Experimental Neurology*. 1999; 155: 31-41; Green P. S. et al. *Journal of Neurochemistry*. 2004; 90(3): 724-33). Se supone que algunos aspectos de una inflamación crónica en curso da lugar a una destrucción abrumadora en la que los agentes de las reacciones de la MPO desempeñan una función importante.

30 En los neutrófilos, la enzima se libera tanto al exterior de la célula como en los fagolisosomas (Hampton M. B., Kettle A. J., Winterbourn C. C. *Blood* 1998; 92(9): 3007-17). Un requisito necesario para la actividad de la MPO es la presencia de peróxido de hidrógeno, generado por la NADPH oxidasa, y una posterior dismutación en superóxido. La enzima oxidada es capaz de utilizar un amplio abanico de sustratos, de los cuales el cloruro es el más reconocido. A partir de esta reacción se forma el ácido hipocloroso (HOCl), un oxidante fuerte que no es un radical. El HOCl oxida con mucha eficacia los aminoácidos que contienen azufre, tales como la cisteína y la metionina (Peskin A. V., Winterbourn C. C. *Free Radical Biology and Medicine* 2001; 30(5): 572-9). También forma cloraminas con grupos amino, tanto en las proteínas como en otras biomoléculas (Peskin A. V. et al. *Free Radical Biology and Medicine* 2004, 37(10): 1622-30). Clora los fenoles (como la tirosina) (Hazen S. L. et al. *Mass Free Radical Biology and Medicine* 1997; 23(6): 909-16) y los enlaces insaturados de los lípidos (Albert C. J. et al. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(26): 23733-41), oxida centros de hierro (Rosen H., Klebanoff S. J. *Journal of Biological Chemistry* 1982; 257(22): 13731-354) y entrecruza las proteínas (Fu X., Mueller D. M., Heinecke J. W. *Biochemistry* 2002; 41(4): 1293-301). En la patente internacional WO 01/85146, en *J. Heterocyclic Chemistry*, 1992, 29, 343-354, en *J. Chem. Soc.*, 1962, 1863, en la patente internacional WO 03/089430 y en la patente internacional WO 2006/062465 se describen diferentes compuestos que son inhibidores de la MPO.

Atrofia multisistémica (AMS)

La atrofia multisistémica (AMS) es un trastorno neurodegenerativo que presenta afectación autónoma y disfunción motora de resultados del párkinson que no responde a L-dopa, a la ataxia cerebral y a los signos piramidales. Desde el punto de vista histológico, hay pérdida de neuronas en el cuerpo estriado, en la parte compacta de la sustancia negra, en el cerebelo, en la protuberancia, en la oliva bulbar y en la columna intermediolateral de la médula espinal. La enfermedad glial incluye astrogliosis, activación de los microglíocitos e inclusiones citoplásmicas oligodendrogiales que contienen  $\alpha$ -sinucleína. La neuroinflamación pronunciada con contribución de microglíocitos activados así como de cuerpos de inclusión citoplásmicos, que contienen proteínas modificadas por oxidación y agregadas, hace que resulte fascinante considerar que la actividad de la MPO contribuye significativamente en la neurodegeneración progresiva que caracteriza a la enfermedad de la AMS.

Se puede apoyar la inhibición de la MPO en las enfermedades de tipo AMS mediante la utilización de modelos preclínicos de enfermedad para la AMS, tales como ratones transgénicos que sobreexpresan en los oligodendroglíocitos la  $\alpha$ -sinucleína humana con o sin la adición de una toxina como el ácido 3-nitropropiónico.

Enfermedad de Huntington (EH)

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo progresivo hereditario caracterizado desde el punto de vista clínico por alteraciones motoras y psiquiátricas, y desde el punto de vista patológico por pérdida de neuronas y gliosis (astrocitosis reactiva) en particular en el cuerpo estriado y la corteza cerebral. La EH es un trastorno neurodegenerativo ocasionado por la expansión de la repetición CAG en el gen de la EH, que codifica la poliglutamina en la proteína huntingtina. Las explicaciones para los mecanismos patológicos incluyen el estrés oxidativo, la alteración del metabolismo energético y las interacciones anormales entre las proteínas. Posiblemente, tales mecanismos estén conectados con la actividad de la MPO, lo que podría manifestarse a través de la observación de su sobreexpresión en el tejido patológico de la EH (Choi D-K. et al. *J. Neurosci.* 2005; 25(28): 6594-600).

Se puede apoyar la inhibición de la MPO en una enfermedad similar a la EH a través de la utilización de modelos preclínicos de enfermedad para la EH. Tales modelos podrían ser ratones o ratas tratados con toxinas mitocondriales, tales como el ácido 3-nitropropiónico o el malonato (Matthews R. T. et al. *J. Neurosci.* 1998; 18: 156-63). Los modelos útiles podrían también ser ratones transgénicos que expresan mutantes de la proteína huntingtina con o sin la adición de una toxina como el ácido 3-nitropropiónico (Bogdanov M. B. et al. *J. Neurochem.* 1998; 71: 2642-44).

Existe una necesidad esencialmente insatisfecha de medicamentos que puedan utilizarse para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, para el tratamiento de la atrofia multisistémica y/o para la neuroprotección.

**Descripción de la invención**

Se ha encontrado que puede utilizarse un inhibidor de la MPO para el tratamiento de la atrofia multisistémica (AMS).

Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de un inhibidor de la MPO para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la atrofia multisistémica (AMS).

La terminología «atrofia multisistémica», tal y como se utiliza en la presente memoria, significa un trastorno neurodegenerativo progresivo y mortal. Se define como una  $\alpha$ -sinucleinopatía esporádica con disautonomía y afectación motora cerebelar y/o parkinsoniana.

También se ha encontrado que se puede utilizar un inhibidor de la MPO o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo para el tratamiento de la enfermedad de Huntington (EH).

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a la utilización de un inhibidor de la MPO o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

La terminología «enfermedad de Huntington», tal y como se utiliza en la presente memoria, pretende definir un trastorno neurodegenerativo progresivo hereditario que se caracteriza desde el punto de vista clínico por alteraciones psiquiátricas y motoras, y desde el punto de vista patológico por pérdida neuronal y gliosis (astrocitosis reactiva), en particular en el cuerpo estriado y en la corteza cerebral.

La terminología «tratar», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a revertir, aliviar, retrasar o inhibir el progreso, o prevenirlo, del trastorno o afección al cual se aplica tal terminología, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección. La terminología «tratamiento», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere al acto de «tratar» tal y como está definido en la presente memoria.

Para la utilización en medicina, las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser útiles para la preparación de los compuestos de acuerdo con la presente invención. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los

5 compuestos descritos en la presente memoria incluyen sales por adición de ácido que pueden, por ejemplo, formarse mediante la mezcla de una solución del compuesto de acuerdo con la presente invención con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico y ácido fumárico. Además, cuando los compuestos llevan un resto ácido, las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los mismos pueden incluir sales de metales alcalinos, p. ej., sales de sodio y potasio; sales de metales alcalinotérreos, p. ej., sales de magnesio o de calcio; y sales formadas con ligandos orgánicos adecuados, p. ej., sales de amonio cuaternario.

10 La expresión «sales farmacéuticamente aceptables» incluye tanto las sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables como las sales catiónicas farmacéuticamente aceptables. La expresión «sales catiónicas farmacéuticamente aceptables» pretende definir, pero sin limitarse a ellas, sales tales como las sales de metales alcalinos, (p. ej., sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (p. ej., calcio y magnesio), sales de aluminio, sales de amonio y sales con aminas orgánicas, tales como la benzatina (*N,N*-dibenciletilendiamina) y la colina. La expresión «sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables» pretende definir, pero sin limitarse a ellas, sales tales como hidrocloruro, hidrobromuro y sulfato.

15 Las sales catiónicas farmacéuticamente aceptables que contienen ácidos carboxílicos libres se pueden preparar fácilmente al hacer reaccionar su forma de ácido libre con una base adecuada. Las bases típicas son hidróxido de sodio, metóxido de sodio y etóxido de sodio. Las sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables que contienen grupos amina libres se pueden preparar fácilmente al hacer reaccionar la forma de la base libre con el ácido adecuado.

20 La utilización de isómeros ópticos del inhibidor de la MPO también se encuentra dentro del alcance de la presente invención. Los inhibidores de la MPO que tienen un átomo de carbono asimétrico son compuestos quirales y, según los átomos asimétricos presentes, los inhibidores de la MPO pueden existir en forma de mezclas de isómeros, particularmente mezclas racémicas, o en forma de isómeros puros, tales como enantiómeros específicos.

#### Formulaciones farmacéuticas

25 El inhibidor de la MPO o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo que se describen en la presente memoria se pueden administrar de una manera estándar, tal como por las vías oral, parenteral, transmucosa (p. ej., sublingual o mediante la administración bucal), tópica, transdérmica, rectal, por inhalación (p. ej., inhalación nasal o inhalación pulmonar profunda). La administración parenteral incluye, pero sin limitarse a ellas, las vías intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular e intratecal, o mediante una técnica de alta presión.

30 Para la administración bucal, el inhibidor de la MPO o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo pueden estar en forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de la manera convencional. Por ejemplo, los comprimidos y cápsulas para la administración oral pueden contener excipientes convencionales, tales como aglutinantes (p. ej., jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón o polivinilpirrolidona), material de relleno (p. ej., lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato de calcio o sorbitol),  
35 lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol o sílice), disgregantes (p. ej., almidón de patata o glicolato sódico de almidón) o humectantes (p. ej., laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden estar revestidos de acuerdo con los métodos bien conocidos en la técnica. Tales preparaciones se pueden formular también como supositorios para la administración rectal, p. ej., que contienen bases de supositorios convencionales, tales como mantequilla de cacao u otros glicéridos.

40 Las composiciones para la inhalación que comprenden el inhibidor de la MPO o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo se pueden dar a conocer típicamente en forma de una solución, suspensión o emulsión que se puede administrar como un polvo seco o en forma de un aerosol mediante un propulsor convencional, tal como diclorodifluorometano o triclorofluorometano. Las formulaciones tópicas y transdérmicas típicas comprenden vehículos acuosos y no acuosos convencionales, tales como colirios, cremas, ungüentos, lociones y pastas, o en  
45 forma de un emplasto, parche o membrana medicado.

Adicionalmente, el inhibidor de la MPO o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo descritas en la presente memoria se pueden formular para la administración parenteral mediante inyección o venoclisis continua. Las formulaciones para la inyección pueden ser en forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes  
50 y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado (p. ej., agua estéril sin pirógenos) antes de su utilización.

El inhibidor de la MPO o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo de acuerdo con la presente invención también pueden formularse como una preparación de liberación prolongada. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (p. ej., subcutánea o intramuscular) o mediante inyección  
55 intramuscular. Por consiguiente, los compuestos de la presente invención se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos (p. ej., una emulsión en un aceite aceptable), resinas de intercambio iónico o derivados bastante solubles (p. ej., una sal bastante soluble) adecuados.

Para la administración oral, una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de la MPO o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo de acuerdo con la presente invención puede tomar la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y similares. Los comprimidos que contienen distintos excipientes, tales como citrato de sodio, carbonato de calcio y fosfato de calcio, se emplean junto con otros disgregantes, tal como almidón y preferentemente almidón de patata o de tapioca, y algunos silicatos complejos, junto con aglutinantes tales como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina o goma arábica. Adicionalmente, para formar los comprimidos pueden utilizarse lubricantes, tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se emplean como relleno de cápsulas de gelatina blandas y duras; los materiales preferentes en esta conexión también incluyen lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alta masa molecular.

Alternativamente, el inhibidor de la MPO o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo descritos en la presente memoria se pueden incorporar en preparaciones líquidas orales, tales como suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, por ejemplo. Además, las formulaciones que contienen estos compuestos se pueden presentar como un producto seco para reconstituirlo con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, tal como jarabe de sorbitol, gomas sintéticas y naturales, tales como tragacanto, goma arábica, alginato, dextrano, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, polivinilpirrolidona o gelatina, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, gel de estearato de aluminio, emulsionantes, tal como lecitina, monooleato de sorbitano, o goma arábica; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), tales como aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol y alcohol etílico; y conservantes, tales como *p*-hidroxibenzoato de metilo o de propilo y ácido sórbico. Las formas líquidas en las que se pueden incorporar las composiciones descritas en la presente memoria para la administración por vía oral o mediante inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes aromatizados convenientemente, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles, tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Cuando se desean suspensiones acuosas y/o elixires para la administración oral, los compuestos descritos en la presente memoria pueden combinarse con distintos edulcorantes, aromatizantes, colorantes, emulsionantes y/o agentes de suspensión, así como diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y otros como combinaciones de los mismos. Los dispersantes o agentes de suspensión adecuados para las suspensiones acuosas incluyen gomas sintéticas y naturales tales como tragacanto, goma arábica, alginato, dextrano, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, polivinilpirrolidona o gelatina.

El inhibidor de la MPO o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo descritos en la presente memoria también pueden administrarse en una formulación de liberación controlada (definición) tal como una formulación de liberación lenta o una formulación de liberación rápida. Tales formulaciones de liberación controlada de las combinaciones descritas en la presente memoria se pueden preparar con los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. El método de administración se determinará por el médico que lleva el tratamiento u otra persona experta en la técnica después de una evaluación de la afección y de los requisitos del paciente.

Por lo tanto, la dosis eficaz de un inhibidor de la MPO o de las sales farmacéuticamente aceptables del mismo de acuerdo con la presente invención puede variar, según factores tales como la afección del paciente, la gravedad de los síntomas del trastorno así como la potencia del compuesto específico seleccionado, el modo de administración, la edad y el peso del paciente, y similares. La determinación de una dosis se encuentra dentro de la pericia del experto en la técnica. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis pueden ser escogidas por el médico a la vista de la afección del paciente. La cantidad y el intervalo de la dosis se pueden ajustar en cada individuo para que se proporcione una concentración plasmática del resto activo que sea suficiente para mantener los efectos terapéuticos.

Típicamente, la dosis eficaz del inhibidor de la MPO o de las sales farmacéuticamente aceptables del mismo requiere por lo general la administración del compuesto en un intervalo de 1, incluido éste, a 1000 mg. De acuerdo con una realización de la presente invención, dicho intervalo es de 2, incluido éste, a 800 mg o de 2, incluido éste, a 400 mg. En una realización alternativa de la presente invención, la cantidad de inhibidor de la MPO se selecciona entre aproximadamente 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 550, 600, 700 y 800 mg.

#### Descripción de los métodos

El tratamiento de ratones transgénicos (tg) o de tipo silvestre con 3NP constituye también los modelos más establecidos de la EH (Brouillet E et al., *Prog. Neurobiol.* 1999; 59: 427-68). Se basa en una inyección sistémica subaguda de esta toxina del complejo II mitocondrial. En los ratones, esta toxina provoca lesiones en el cuerpo estriado similares a la EH y reproduce la insuficiencia metabólica que tiene lugar en la EH. Durante su uso extensivo se ha demostrado que existe una correlación (Fergnagut P. O. et al., *Neuroscience.* 2002; 114: 1005-17) entre la cinética temporal y la intensidad del trastorno motor, utilizando una escala semicuantitativa (que valora la bradicinesia, distonía del tronco, distonía y agarrotamiento de la pata trasera, y alteración del control postural) y la gravedad del daño en el cuerpo estriado (pérdida de neuronas y reacción astrocítica). También se ha demostrado que se afecta la integración sensoriomotora mediante el uso de pruebas cuantificables que se sabe que son

5 sensibles a la disfunción nigroestriatal: actividad general, prueba del bastón y prueba de recorrido del haz. Por consiguiente, en el modelo de AMS utilizado se emplean varios de los criterios de valoración histopatológicos y conductuales importantes que también son relevantes para la EH. Por consiguiente, la patología del cuerpo estriado, que incluye la pérdida neuronal y partes del comportamiento motor en el modelo de AMS mencionado más abajo, también refleja la patología de la EH.

10 Se ha desarrollado un nuevo modelo de ratón con AMS mediante la inducción de estrés oxidativo en los ratones transgénicos que expresan la  $\alpha$ -sinucleína oligodendroglial (descrita en la presente memoria). Este modelo reproduce los rasgos neuropatológicos fundamentales de la enfermedad, que incluyen la degeneración nigroestriatal, la atrofia olivopontocerebelosa, la astrogliosis y la microgliosis combinadas con inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína insolubles oligodendrogliales. La inhibición mitocondrial debida al 3NP en presencia de inclusiones citoplasmáticas gliales en los ratones transgénicos induce un patrón selectivo de muerte celular neuronal típico de la AMS en estos animales (Stefanova N. et al., *Am. J. Pathol.* 2005, 166: 869-76).

15 Por lo tanto, en la presente invención se ha utilizado un inhibidor de la MPO para suprimir la actividad de la MPO en un modelo de ratón con AMS que consiste en una sobreexpresión de la  $\alpha$ -SYN oligodendroglial en los ratones transgénicos expuestos a la inhibición mitocondrial por el ácido 3-nitropropiónico (3NP). Los efectos se siguieron mediante la aplicación de métodos conductuales e inmunohistológicos consolidados para evaluar la participación de la MPO en la patogénesis de la AMS y los posibles efectos neuroprotectores en un modelo de AMS.

20 La parte compacta de la sustancia negra (SNc) del transgénico sufre pronto la pérdida neuronal asociada a la  $\alpha$ -sinucleinopatía oligodendroglial durante la ventana del tiempo entre dos y cuatro meses de edad. Esta pérdida neuronal temprana se correlacionó con la activación microglial en la SNc. La supresión de la microgliosis en el intervalo de tiempo entre los 2 y los 4 meses de edad se encontró que era neuroprotectora para las neuronas de la sustancia negra. Los hallazgos indican que el modelo de ratón con AMS neurotóxico y transgénico combinado deben servir por sí solos de comprobación preclínica para nuevos candidatos terapéuticos para la AMS, tanto para los paradigmas de AMS de «cambio mínimo» de progresión precoz o de «síntomatología florida» de progresión tardía.

25 La activación de los microglíocitos es un hallazgo sobresaliente en los cerebros con AMS. Se demostró en los ratones transgénicos que sobreexpresaban la  $\alpha$ -sinucleína humana de tipo silvestre bajo el control del promotor de la preteolipoproteína (PLP) que tales ratones tenían una activación intensa de los microglíocitos, en especial en la sustancia blanca, lo que no es el caso en los ratones C57Bl/6 de tipo silvestre (Stefanova N. et al. *Am. J. Pathol.* 2005; 166: 869-76). Además, la activación de los microglíocitos se intensifica mucho tras la exposición al 3NP y viene acompañada de la degeneración neuronal de tipo AMS. La correlación de la activación de los microglíocitos con pérdida de células neuronales indica que los factores microgliales podrían al menos mediar parcialmente en la neurodegeneración mediante la liberación de especies reactivas del oxígeno, de óxido de nitrógeno (NO), de citocinas o de quimiocinas.

#### Animales

35 Se utilizaron en total 30 ratones transgénicos con la (PLP)- $\alpha$ -sinucleína. Los animales se mantuvieron en un ciclo de oscuridad/luz de 12/12 horas con libre acceso a comida y agua en el estabulario de la Universidad de Medicina de Innsbruck. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la ley austríaca y después de que el Ministerio Federal para Educación, Ciencia y Cultura de Austria autorizase la experimentación con animales.

#### Grupos

40 Grupo de control (n = 10) de ratones con AMS (tg + 3NP), tratados con vehículo (ciclodextrina, preparada por AstraZeneca) v. o. (por vía oral).

Grupo con dosis baja (n = 10) de ratones con AMS (tg + 3NP) tratados con 1-(2-isopropoxietil)-2-tioxo-1,2,3,5-tetrahidro-pirrol[3,2-d]pirimidin-4-ona (compuesto I; preparado por AstraZeneca), 2 x 60  $\mu$ mol/kg, v. o.

45 Grupo con dosis alta (n = 10) de ratones con AMS (tg + 3NP) tratados con el compuesto I (preparado por AstraZeneca), 2 x 180  $\mu$ mol/kg, v. o.

50 La 1-(2-isopropoxietil)-2-tioxo-1,2,3,5-tetrahidro-pirrol[3,2-d]pirimidin-4-ona (compuesto I para el tratamiento) se comenzó una semana antes de la primera intoxicación con 3NP y se interrumpió tres semanas después de la primera intoxicación con 3NP (véase el protocolo de intoxicación con 3NP más adelante). Los animales se sometieron a pruebas conductuales durante las semanas 3-4 desde el comienzo del experimento. En el día 28, los animales se sometieron a una perfusión con anestesia profunda de tiopental y se recogieron los cerebros para el análisis histopatológico de la pérdida neuronal y la gliosis.

#### Intoxicación con 3NP

Los ratones se intoxicaron prolongadamente con 3NP mediante el incremento lento de las dosis de la toxina de acuerdo con un esquema utilizado anteriormente (a saber, inyecciones intraperitoneales de 4 x 10 mg/kg, 4 x 20

mg/kg, 4 x 40 mg/kg, 4 x 50 mg/kg cada 12 horas durante un periodo de 8 días) para el modelo con AMS (Stefanova N. et al. *Am. J. Pathol.* 2005; 166: 869-76).

#### Tratamiento con el compuesto I

5 El fármaco y el vehículo (meglumina a 0,1 mol/l con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina al 20% p/v, pH 10,8) se conservaron a 4 °C. Los ratones recibieron la dosis necesaria del fármaco/vehículo (10 ml/kg) dos veces al día mediante alimentación oral forzada durante el periodo indicado.

#### Comportamiento

10 Las pruebas conductuales se realizaron con anonimato para el estado del tratamiento de acuerdo con los procedimientos validados: evaluación a escala clínica, la prueba del bastón y prueba de la actividad locomotora espontánea según la longitud de las zancadas (Stefanova N. et al., *Am. J. Pathol.* 2005; 166: 869-76).

#### Evaluación motora a escala clínica

15 Una escala de valoración descrita anteriormente para evaluar el agarrotamiento de la pata trasera, de la actividad locomotora general, de la distonía de la pata trasera, de la distonía del tronco y de la respuesta al reto postural (0, normal; 1, ligeramente alterado y 2, notablemente incapacitado) (Fernagut P. O. et al., *Neuroscience.* 2002; 114: 1005-17).

#### Actividad en campo abierto

20 Para comprobar la actividad locomotora de los ratones se aplicó el sistema Flex Field Activity (San Diego Instruments, CA, EE.UU.), que permite monitorizar y contar en tiempo real la actividad locomotora vertical y horizontal mediante 544 canales de haces luminosos. Se colocaron los ratones en el centro del campo abierto (40,5 x 40,5 x 36,5 cm) y se analizaron durante un periodo de 15 min siempre a la misma hora del día (17:00 h). Las pruebas se realizaron en una habitación a oscuras que estaba completamente aislada de ruidos externos y luz mientras duró la prueba.

#### Longitud de las zancadas

25 La longitud de la zancada de las patas delanteras y de las patas traseras de los ratones se midió después de una habituación a la prueba durante 3 días antes de su realización de acuerdo con Fernagut et al. (Fernagut P. O. et al. *Neuroscience.* 2002; 114: 1005-17) con una ligera modificación. Las patas de cada animal se mojaron con un colorante alimentario inocuo y se dejó que cada ratón corriera sobre una tira de papel (42 cm de largo, 4,5 cm de ancho) por un pasillo brillante hacia una caja a oscura de objetivo. Después de tres carreras, se midió la longitud de las zancadas de cada pata trasera, descartando el comienzo (7 cm) y el final (7 cm) de la carrera. Se determinó la longitud media de la zancada para cada pata.

#### Preparación del tejido

35 Los animales se sometieron a una perfusión con sobredosis de tiopental con paraformaldehído (PFA) al 4%, pH 7,4. Se les retiró rápidamente el cerebro y se conservaron durante 24 horas en PFA al 4% a 4 °C. Después de la crioprotección en una solución de sacarosa al 20%/PBS a 0,1 M a pH 7,4, se congelaron los cerebros y se conservaron a -80°C. Se realizaron cortes en serie (un total de 7 series) en un criostato (Leica) y se recogieron para las tinciones histológicas (una serie en el portaobjetos) e inmunohistoquímica (6 serie flotando libremente).

Tinción de Nissl: los cortes frontales de todo el cerebro se montaron en el portaobjetos y se procesaron para la tinción estándar con violeta de cresilo.

40 La inmunocitoquímica se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos estándares (Stefanova N. et al., *Am. J. Pathol.* 2005; 166; 869-76) en los cortes (40  $\mu$ m) que flotan con libertad para analizar la patología glial y neuronal en el modelo de ratón con AMS. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-TH contra la tirosina hidroxilasa (Sigma); anti-DARPP-32 (fosfoproteína 32 regulada por 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina y dopamina); anti-GFAP (proteína ácida fibrilar de los gliocitos, Roche Diagnostics GmbH); anti-CD11b: (Serotec). Los anticuerpos secundarios estaban biotinilados y eran contra la IgG de rata o de ratón según fuera necesario. Brevemente, después de lavar en una disolución salina tamponada con fosfato (PBS), los cortes se incubaron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3%, se enjuagaron de nuevo y se bloquearon durante 1 hora en suero de cabra normal al 10% en PBS con Triton-X 100 al 0,3% (PBS-T), seguido de una incubación durante una noche en el anticuerpo primario a 4 °C. Después del lavado en PBS-T, los cortes se incubaron durante 1 hora en el anticuerpo secundario, se lavaron de nuevo y se incubaron otra hora más en el complejo avidina-biotina (Elite Kit, Vector). Finalmente, la reacción se visualizó con 3,3'-diaminobenzidina.

50 Se aplicó la estereología con un sistema de análisis de imagen asistido por ordenador (microscopio Nikon E-800, videocámara de CCD, Optronics MicroFire, Goleta, EE.UU.; Stereo Investigator Software, MicroBrightField Europe e.K., Maddeburg, Alemania). Se utilizó el fraccionador óptico para contar las neuronas en el cuerpo estriado, en la

parte compacta de la sustancia negra, en los núcleos protuberanciales y en las olivas bulbares. Se contaron las células de Purkinje en una región seleccionada para que incluya sólo la capa de células de Purkinje como se describió previamente (German D. C. et al. *Neuroscience* 2001; 105: 999-1005). Todos los datos se expresaron como el valor medio  $\pm$  EEM. Se midió la activación de los gliocitos en la sustancia negra y en el cuerpo estriado mediante la determinación de la densidad óptica en la región diana delineando su área en los cortes en serie. En todas las pruebas estadísticas realizadas se consideró significativo un nivel de probabilidad del 5% ( $p < 0,05$ ).

#### Resultados

##### Efectos del tratamiento con el compuesto I sobre el comportamiento motor de los ratones con la AMS

Hubo una mejora significativa en la media de la puntuación motora diaria de los ratones con AMS que se trataron con el compuesto I en comparación con los ratones tratados con el vehículo (figura 1). También hubo una mejora significativa del comportamiento de flexibilidad de campo después del tratamiento con el compuesto I a dosis altas (180  $\mu\text{mol/kg}$ ). Se vieron afectadas tanto el encabritamiento sobre las patas traseras como la actividad en campo abierto (figura 2). De igual forma, se observó una mejora significativa de la longitud de las zancadas después del tratamiento con el compuesto I a dosis altas (180  $\mu\text{mol/kg}$ ), en donde las patas traseras izquierda y derecha se vieron igualmente afectadas (figura 3).

##### Efectos del tratamiento con el compuesto I en la neuropatología de los ratones con la AMS

El compuesto I a dosis altas (180  $\mu\text{mol/kg}$ ) es neuroprotector con respecto a la degeneración nigroestriatal de los ratones con la AMS (figura 4). Resulta patente en las células de la sustancia negra inmunopositivas a la TH, en las terminaciones dopaminérgicas del cuerpo estriado, así como en las neuronas inmunorreactivas al DARPP-32 en el cuerpo estriado.

El compuesto I a dosis altas (180  $\mu\text{mol/kg}$ ) es neuroprotector con respecto a la atrofia olivopontocerebral en los ratones con AMS. Hay protección del complejo de la oliva bulbar, de los núcleos protuberanciales y de las células de Purkinje del cerebelo (figura 5).

El compuesto I a dosis altas (180  $\mu\text{mol/kg}$ ) se asoció a la supresión de la activación de los microgliocitos, otro marcador de la neuroinflamación, en los ratones con AMS. Esto se observó tanto en la sustancia negra como en el cuerpo estriado (figura 6). Esto sugiere que hemos corroborado farmacológicamente la conexión sugerida previamente (Stefanova N. et al. *Am. J. Pathol.* 2005; 166: 869-76) entre la activación de los microgliocitos y la neurodegeneración.

#### Resumen de los hallazgos

Se ha mostrado una neuroprotección significativa con el tratamiento con el compuesto I. Las neuronas se conservaron de modo repetitivo a nivel de la parte compacta de la sustancia negra, del cuerpo estriado, de la corteza cerebelar, de los núcleos protuberanciales y de complejo de la oliva bulbar. Esta neuroprotección estuvo acompañada de una mejora funcional que se midió con diferentes pruebas del comportamiento. Los efectos del compuesto I también estaban relacionados con la supresión de la activación de los microgliocitos. Los datos apoyan que los inhibidores de la MPO tienen la capacidad de ser posibles neuroprotectores en las afecciones que van acompañadas de neuroinflamación, entre ellas AMS, EP y EH.

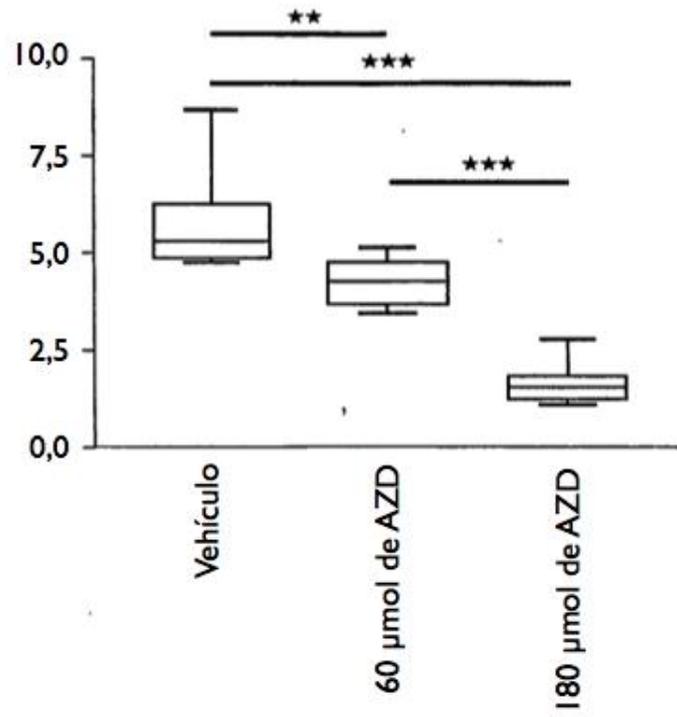
Una neuroprotección generalizada, que no se limita sólo a un subconjunto de neuronas, a través de una reducción de la pérdida de células neuronales y/o una reducción de la pérdida de terminaciones neuronales tras el tratamiento en esta clase de modelo con un inhibidor de la MPO apoyará además el hecho de que los inhibidores de la MPO tengan la capacidad de ser neuroprotectores también en los trastornos neurodegenerativos humanos. Una neuroprotección de todos los fenotipos neuronales afectados, sin ninguna excepción, en un modelo como el descrito en la presente memoria para los inhibidores de la MPO debe ofrecer argumentos claros de que los inhibidores de la MPO son neuroprotectores, sin limitarse necesariamente sólo a AMS, EP y enfermedad de Huntington.

**REIVINDICACIONES**

1. Utilización de la 1-(2-isopropoxietil)-2-tioxo-1,2,3,5-tetrahydro-pirrol[3,2-d]pirimidin-4-ona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la atrofia multisistémica (AMS).
- 5 2. Utilización de la 1-(2-isopropoxietil)-2-tioxo-1,2,3,5-tetrahydro-pirrol[3,2-d]pirimidin-4-ona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Huntington (EH).
3. Utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la dosis diaria de 1-(2-isopropoxietil)-2-tioxo-1,2,3,5-tetrahydro-pirrol[3,2-d]pirimidin-4-ona o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma se encuentra dentro del margen de 1 a 1000 mg.
- 10

Fig.1

Media de la puntuación motora diaria



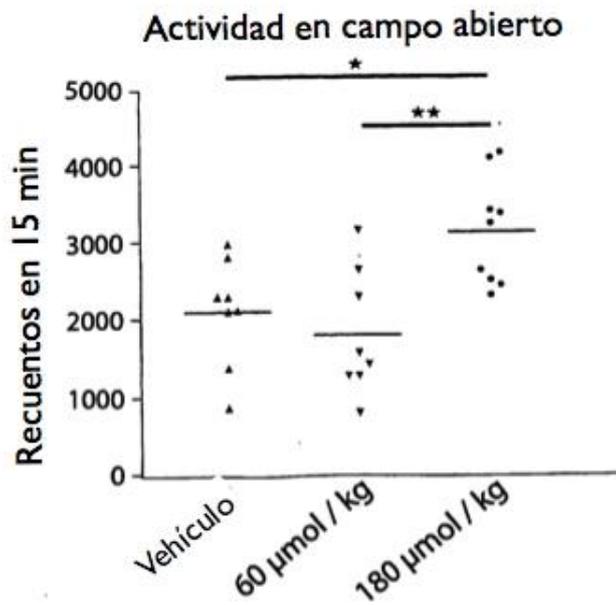
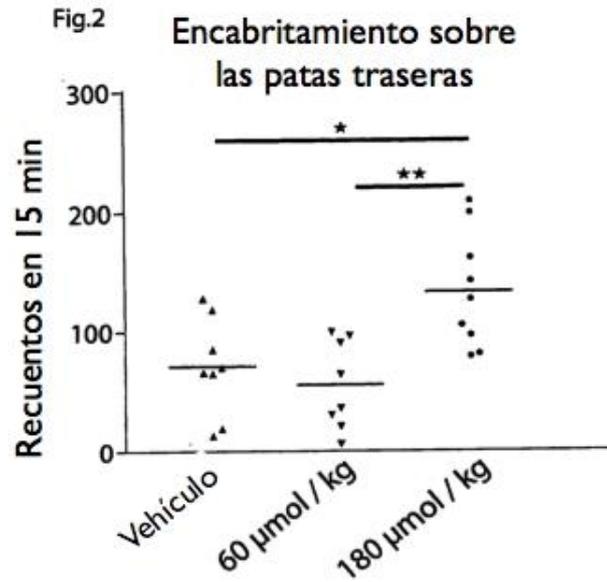
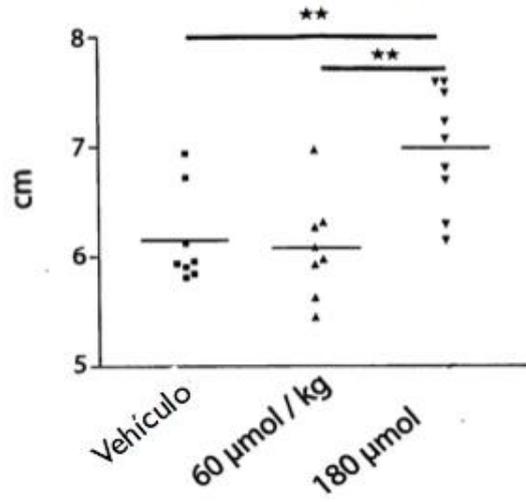
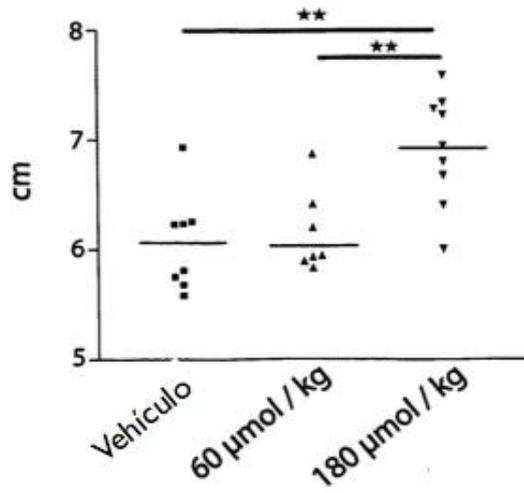


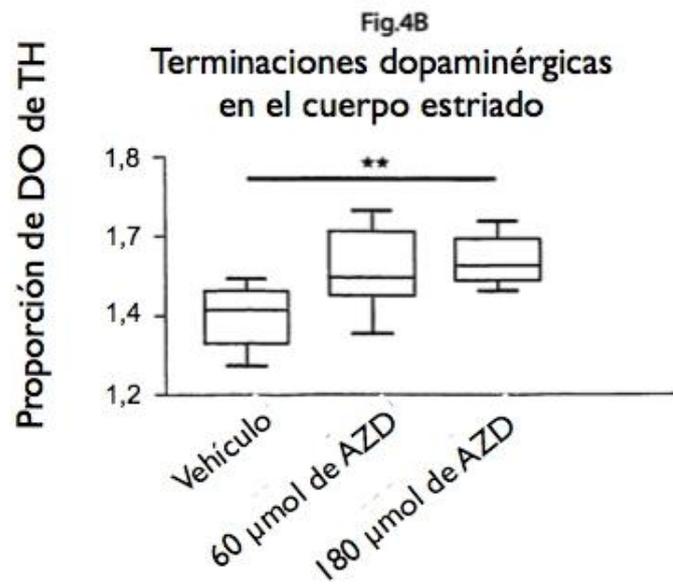
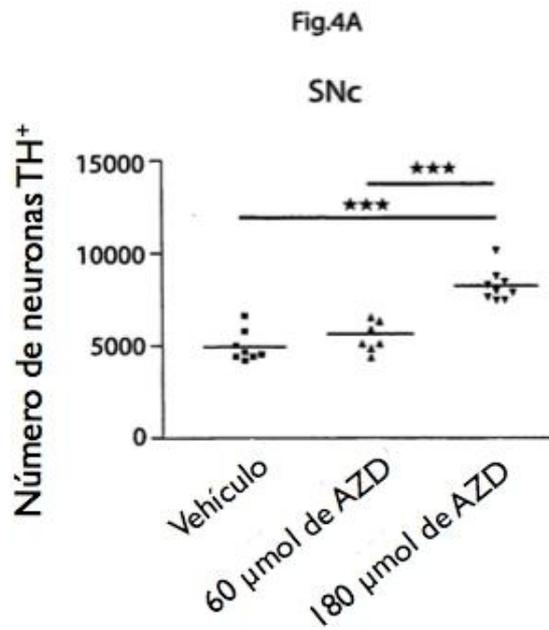
Fig.3

Zancada de la pata trasera izquierda



Zancada de la pata trasera derecha





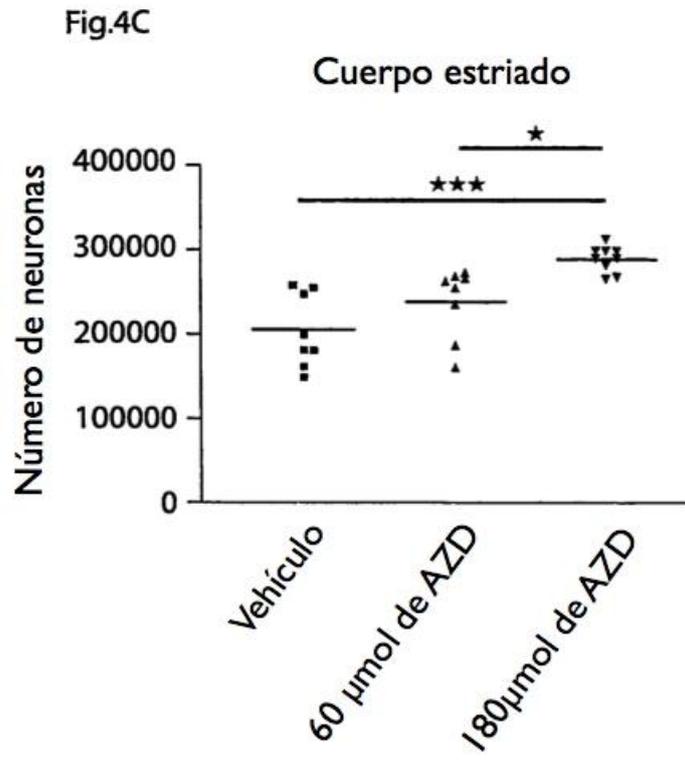


Fig.5A

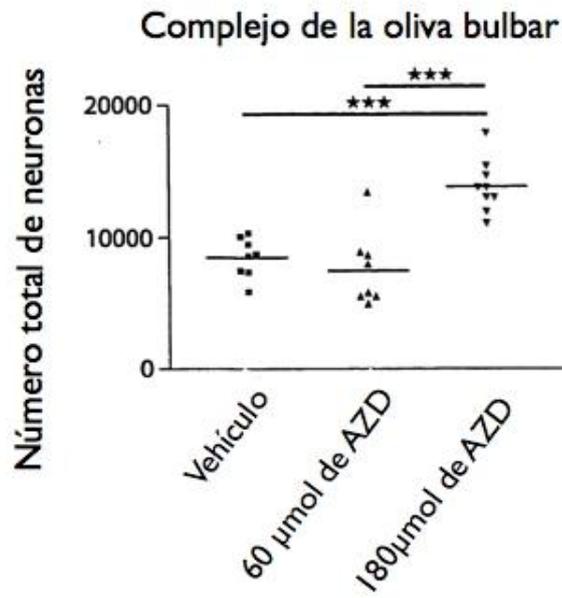


Fig.5B

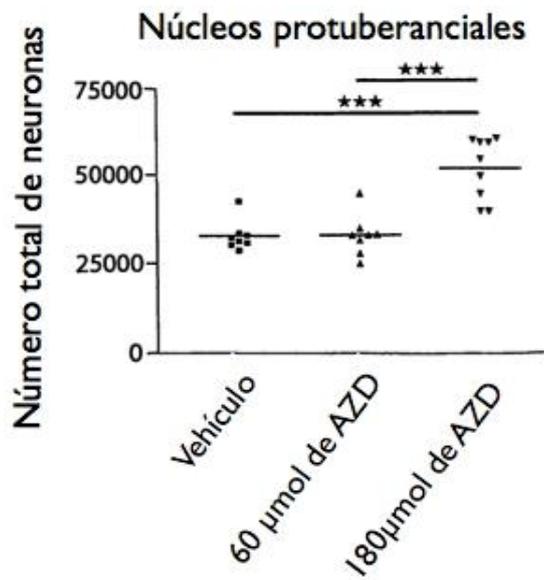


Fig.5C

