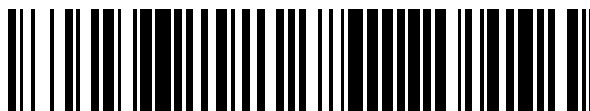


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 117**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/425** (2006.01)

**A61K 31/135** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61K 31/428** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2003** **E 03783422 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013** **EP 1567152**

54 Título: **Uso de rasagilina con riluzol para tratar la esclerosis lateral amiotrófica**

30 Prioridad:

**15.11.2002 US 426543 P**

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

**29.11.2013**

73 Titular/es:

**TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LIMITED**  
**(100.0%)**

**5 BASEL STREET, BOX 3190**  
**PETAH TIKVAH 49131, IL**

72 Inventor/es:

**BLAUGRUND, ERAN y**  
**LEVY, RUTH**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 432 117 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

Uso de rasagilina con riluzol para tratar la esclerosis lateral amiotrófica

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional en EE UU No. 60/426.543, presentada el 15 de noviembre, 2002, el contenido entero de la cual se incorpora en el presente documento mediante referencia.

10 A lo largo de esta solicitud se hace referencia a varias publicaciones en paréntesis. Las citas completas para estas publicaciones se pueden encontrar enumeradas en orden alfabético al final de la especificación inmediatamente antes de las reivindicaciones. Las divulgaciones de estas publicaciones en su totalidad se incorporan en el presente documento mediante referencia en esta solicitud para describir más completamente el estado de la técnica a la que se refiere esta solicitud.

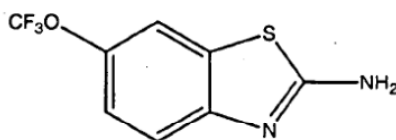
## Antecedentes de la invención

15 La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, es una enfermedad neurodegenerativa que se produce cuando las neuronas motoras degeneran, lo que produce que los músculos bajo su control se atrofen (Página de información de esclerosis lateral amiotrófica, Instituto Nacional de Enfermedades Neurológicas e Ictus). Los síntomas pueden incluir pérdida de control motor en las extremidades, fasciculaciones, espasmos y dificultades en el habla, deglución y respiración. La muerte se produce habitualmente a los 5 años del diagnóstico. El tratamiento neuroprotector de los pacientes que padecen ELA está en sus primeras fases (Ludolph, A.C. et al.). La etiología y patogénesis de la ELA no se conocen, aunque se han avanzado un número de hipótesis (Physician's Desk Reference, 2002). Una hipótesis es que las neuronas motoras, hechas vulnerables bien a través de predisposición genética o bien por factores medioambientales, se lesionan por glutamato (Id.). Hay evidencia de que el daño mitocondrial y la agresión oxidativa desempeñan un papel en la ELA esporádica humana (Ludolph, A.C. et al.; Vielhaber S. et al.). En algunos casos de ELA familiar, se ha encontrado que la enzima superóxido dismutasa es deficiente (Physician's Desk Reference, 2002).

30 Actualmente, se considera que los ratones transgénicos que tienen múltiples copias de la mutación humana G93A son el mejor sistema modelo para degeneraciones de células del asta anterior tal como ELA (Ludolph A.C. et al.; Gurney M.E. et al., *Science* (1994); Gurney M.E. et al., *Ann. Neurol.* (1996)). En este modelo, la degeneración celular está producida por un factor biológico responsable de la etiología de la enfermedad en algunos pacientes. El modelo está bien caracterizado a nivel morfológico y funcional y es comparativamente robusto.

35 Los estudios neuropatológicos de los ratones G93A apoyan ideas actuales que subrayan que el daño mitocondrial y la agresión oxidativa son factores patogénicos importantes para la enfermedad de las células del asta anterior ya que el hinchamiento y la vacuolización mitocondriales están entre las características patológicas más tempranas observadas (Ferrante R.J. et al.; Wong P.C. et al.; Kong J. et al.). Hay evidencia de que este mecanismo también desempeña un papel en la ELA esporádica humana (Ludolph, A.C. et al.; Vielhaber S. et al.).

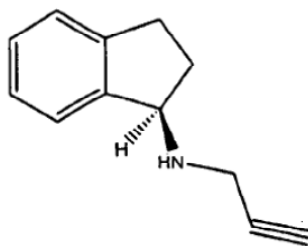
40 Se ha mostrado que el riluzol, un fármaco estabilizante de membrana, tiene un efecto terapéutico sobre ELA. El riluzol es un miembro de la clase de benzotiazol (Physician's Desk Reference, (2002)). Químicamente, el riluzol es 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol y tiene una fórmula molecular de  $C_8H_5F_3N_2OS$  (Id.). Su fórmula estructural es como sigue:



50 Tiene un peso molecular de 234,2. Las propiedades farmacológicas de riluzol incluyen un efecto inhibitor sobre la liberación de glutamato (Id.) mediado por la inactivación de canales de sodio dependientes de voltaje y por su capacidad para interferir con sucesos intracelulares que siguen a la unión del transmisor a receptores de aminoácidos excitadores.

55 RILUTEK®, que ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de ELA, es un comprimido recubierto de película, blanco, en forma de cápsula para la administración oral que contiene 50 mg de riluzol. La dosis recomendada para RILUTEK® es 50 mg cada 12 horas. (Physician's Desk Reference, (2002), p.772-775, el contenido entero del cual se incorporan al presente documento mediante referencia).

60 Se ha mostrado que la rasagilina tiene ciertos efectos neuroprotectores. La rasagilina tiene el nombre químico R(+)-N-propargil-1-aminoindan y su fórmula estructural es:



Se cree que la rasagilina reduce la agresión oxidativa mediante inhibición de la monoaminoxidasa B (MAO-B) (Youdim M.B.H. et al.). Sin embargo, la neuroprotección con rasagilina también se ha ligado a apoptosis, presumiblemente mediante un efecto similar al de bcl-2 sobre el potencial de la membrana mitocondrial (Maruyama W. et al.). Se ha demostrado la neuroprotección con rasagilina en modelos de ictus (Speiser Z. et al.; Eliash S. et al.) y en modelos de lesión traumática en la cabeza (Huang W. et al.). Sin embargo, no se ha sugerido que la rasagilina sea eficaz para el tratamiento de ELA.

La rasagilina, sus sales, la preparación y uso para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, trastornos de la memoria y otros trastornos neurológicos han sido el objeto de numerosas patentes, incluyendo las patentes en EE UU Nos. 5.387.612, 5.453.446, 5.457.133, 5.668.181, 5.576.353, 5.532.415, 5.599.991, 5.786.390, 5.519.061, 5.891.923, 5.744.500 y 6.316.504, el contenido de las cuales se incorpora mediante referencia.

Las interacciones *in vivo* entre dos fármacos, tales como los de la invención objeto, son complejas. Los efectos de un fármaco están relacionados con su absorción, distribución y eliminación. Cuando se introducen dos fármacos en el cuerpo, cada fármaco puede afectar a la absorción, distribución y eliminación del otro y por tanto, alterar los efectos del otro. Por ejemplo, un fármaco puede inhibir, activar o inducir la producción de enzimas implicadas en una ruta metabólica de eliminación del otro fármaco ("Guidance for Industry"). Por tanto, cuando se administran dos fármacos para tratar la misma enfermedad, no está claro si cada uno complementará la actividad terapéutica del otro, no tendrá efecto o interferirá con la actividad terapéutica del otro.

La interacción entre dos fármacos no solo puede afectar a la actividad terapéutica deseada de cada fármaco, sino que la interacción puede aumentar los niveles de metabolitos tóxicos ("Guidance for Industry"). La interacción también puede intensificar o reducir los efectos secundarios de cada fármaco.

Además, es difícil predecir cuando los efectos de interacción entre los dos fármacos serán manifiestos. Por ejemplo, las interacciones metabólicas entre fármacos se pueden hacer aparentes tras la administración inicial del segundo fármaco, después de que los dos hayan alcanzado un estado estacionario de concentración o incluso tras la interrupción de uno de los fármacos ("Guidance for Industry").

Por tanto, el éxito de un fármaco o cada fármaco por separado en un modelo *in vitro*, un modelo animal o incluso en seres humanos se puede no traducir en éxito de la administración de ambos fármacos en seres humanos.

La presente invención presenta el inesperado descubrimiento de que la rasagilina es eficaz para el tratamiento de ELA. También se divulga que la combinación de rasagilina con riluzol es más eficaz para el tratamiento de ELA que cualquier fármaco solo. En particular, los resultados de rasagilina usada en ratones G93A sola o en combinación con riluzol indicaron que la administración oral de rasagilina produjo una mejora dependiente de la dosis en el rendimiento motor y extendió convincentemente la supervivencia en estos ratones.

#### Compendio de la invención

La invención objeto proporciona una composición farmacéutica que comprende R(+)-N-propargil-1-aminoindan o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol y un soporte farmacéuticamente aceptable.

La invención objeto proporciona además un paquete que comprende una preparación farmacéuticamente aceptable de R(+)-N-propargil-1-aminoindan o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, una preparación farmacéuticamente aceptable separada de 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol, e instrucciones para el uso de las preparaciones en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

La invención objeto proporciona además R(+)-N-propargil-1-aminoindan o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en combinación con 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol.

**Descripción detallada de las figuras**

**Figura 1:** Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) para cada grupo de ratones transgénicos SOD1. (x = rasagilina 0,5 mg/kg; ○ = rasagilina 2,0 mg/kg; ♦ = riluzol 30 mg/kg; ▲ = rasagilina 0,5 mg/kg + riluzol 30 mg/kg; ■ = rasagilina 2,0 mg/kg + riluzol 30 mg/kg; ● = control).

**Figura 2:** Efectos de rasagilina y/o riluzol en diferentes dosis sobre la actividad en el cilindro giratorio de ratones transgénicos SOD1 (x = rasagilina 0,5 mg/kg; ○ = rasagilina 2,0 mg/kg; ♦ = riluzol 30 mg/kg; ▲ = rasagilina 0,5 mg/kg + riluzol 30 mg/kg; ■ = rasagilina 2,0 mg/kg + riluzol 30 mg/kg; ● = control).

La invención objeto proporciona una composición farmacéutica que comprende R(+)-N-propargil-1-aminoindan o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol y un soporte farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización, la composición farmacéutica se formula para la administración oral, tópica, parenteral o nasal.

La invención objeto proporciona además un paquete que comprende la composición farmacéutica e instrucciones para el uso de la composición farmacéutica en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

La invención objeto proporciona además un paquete que comprende una preparación farmacéuticamente aceptable de R(+)-N-propargil-1-aminoindan o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, una preparación farmacéuticamente aceptable separada de 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol, e instrucciones para el uso de las preparaciones en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

La invención objeto proporciona además R(+)-N-propargil-1-aminoindan o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en combinación con 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol.

En una forma de realización, la sal farmacéuticamente aceptable es la sal cloruro, mesilato, maleato, fumarato, tartrato, clorhidrato, bromhidrato, esilato, p-toluenosulfonato, benzoato, acetato, fosfato o sulfato para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en combinación con 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol.

En otra forma de realización, la sal farmacéuticamente aceptable es la sal mesilato, para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en combinación con 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitadas a, sales mesilato, maleato, fumarato, tartrato, clorhidrato, bromhidrato, esilato, p-toluenosulfonato, benzoato, acetato, fosfato y sulfato.

Las formulaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para la administración oral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en formas farmacéuticas unitarias y se pueden preparar por cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio o principios activo(s) que se puede combinar con un material soporte para producir una forma farmacéutica individual generalmente será esa cantidad del /de los compuesto(s) que produce(n) un efecto terapéutico como se discute en el presente documento.

Los métodos de preparar estas formulaciones o composiciones incluyen el paso de asociar un compuesto o combinación de la presente invención con el soporte y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme y profundamente el principio o principios activo(s) con soportes líquidos, o soportes sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.

En una forma de realización, se van a administrar desde aproximadamente 0,001 mg hasta aproximadamente 20 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindan en combinación con 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol, desde aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 500 mg.

En otra forma de realización, se van a administrar desde aproximadamente 1,6 mg hasta aproximadamente 2,4 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindan o 2,0 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindan, desde aproximadamente 3 mg hasta aproximadamente 5 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindan, de 8,0 mg hasta aproximadamente 16,0 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindan, de 12,0 mg hasta aproximadamente 16,0 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindan, de 16,0 mg hasta aproximadamente 20 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindan, de 7,2 mg hasta aproximadamente 8,8 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindan, o aproximadamente 8,0 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindan, en combinación con desde aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 500 mg de 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol.

En una forma de realización adicional, cualquiera de las dosis anteriores de R(+)-N-propargil-1-aminoindan se van a administrar en combinación con desde aproximadamente 25 mg hasta aproximadamente 65 mg de 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol, desde aproximadamente 65 mg hasta aproximadamente 150 mg de 2-amino-6-

trifluorometoxi benzotiazol, desde aproximadamente 150 mg hasta aproximadamente 300 mg de 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol, desde aproximadamente 300 mg hasta aproximadamente 500 mg de 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol, desde aproximadamente 25 mg hasta aproximadamente 35 mg de 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol, desde aproximadamente 45 mg hasta aproximadamente 55 mg de 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol, o desde aproximadamente 35 mg hasta aproximadamente 65 mg de 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol.

Las formulaciones de la invención adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, píldoras, comprimidos, polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica) que cada una contiene una cantidad predeterminada del compuesto o compuestos activo(s).

En las formas farmacéuticas sólidas de la invención para la administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grajeas, polvos, gránulos y similares), el/los principio(s) activo(s) se mezcla(n) con uno o más soportes farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: rellenos o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábica; humectantes, tales como glicerol; agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, fécula de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio; agentes de retraso de solución, tales como parafina; aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes mojantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y mezclas de los mismos; y agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como rellenos en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando tales excipientes como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

Un comprimido se puede hacer mediante compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos por compresión se pueden preparar usando un aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa entrecruzada), agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos por moldeado se pueden hacer moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos, y otras formas farmacéuticas sólidas de la presente invención, tales como grajeas, cápsulas, píldoras y gránulos, opcionalmente se pueden ranurar o preparar con recubrimientos y caparazones, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También se pueden formular de modo que proporcionen liberación lenta o controlada del/de los principio(s) activo(s) en los mismos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Se pueden esterilizar mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro que retiene bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición que liberan el/los principio(s) activo(s) solo, o preferentemente, en una cierta parte del aparato digestivo, opcionalmente de una manera retrasada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El/los principio(s) activo(s) también pueden estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral de los principios activos incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del/de los principio(s) activo(s), las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos.

Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Las suspensiones, además de los principios activos, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de sorbitol y sorbitano de polioxietileno, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma tragacanto, y mezclas de los mismos.

Las preparaciones de la presente invención se pueden dar por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Por supuesto, se dan mediante formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de comprimidos o cápsula, mediante inyección, inhalación, pomada, supositorio, etc., administración por inyección, infusión o inhalación; tópica mediante loción o pomada; y rectal mediante supositorios. Se prefiere la administración oral.

Las frases “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” como se usan en el presente documento significa modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal e intraesternal e infusión.

Las frases “administración sistémica”, “administrado por vía sistémica”, “administración periférica” y “administrado por vía periférica” como se usan en el presente documento significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material, diferente que directamente en el sistema nervioso central, de modo que entra en el sistema del paciente y, por tanto, se somete a metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben interpretar en modo alguno como que son además limitantes. Los contenidos de todas las referencias, solicitudes de patentes en tramitación y solicitudes de patente publicadas, citadas a lo largo de esta solicitud, incluyendo a las que se hace referencia en la sección de antecedentes, se incorporan en el presente documento mediante referencia. Se debe entender que los modelos usados a lo largo de los ejemplos son modelos aceptados y que la demostración de eficacia en estos modelos es predictiva de eficacia en seres humanos.

Esta invención se entenderá mejor a partir de los detalles experimentales que siguen. Sin embargo, el experto en la materia apreciará fácilmente que los métodos y resultados específicos discutidos son meramente ilustrativos de la invención como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen posteriormente.

## Detalles experimentales

### Ejemplo 1

#### Animales

Se adquirieron ratones transgénicos que sobreexpresan mutaciones G93A en Cu/Zn-SOD humana ((B6SJL-TgN (SOD1-G93A) 1 Gur) y ratones no transgénicos B6/SJL de Jackson Laboratories (Ben Harbor, ME, EE UU). La segunda generación de ratones G1H se usó para este estudio; un grupo de animales que en nuestras manos tiene un tiempo medio de supervivencia de aproximadamente 200 días (primera generación 130 días). Los animales se mantuvieron y cruzaron en el animalario de la Universidad de Ulm. La progenie transgénica se identificó mediante amplificación del ADN de la cola del ratón mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

#### Protocolo de tratamiento

Los ratones transgénicos SOD1 se trataron en cinco grupos (N = 15) con dos dosis de rasagilina sola o en combinación con riluzol. Otro grupo de 15 ratones sirvió como control.

Los protocolos de tratamiento para los seis grupos fueron los siguientes:

|            |                                                |
|------------|------------------------------------------------|
| Grupo I:   | Rasagilina 0,5 mg/kg al día                    |
| Grupo II:  | Rasagilina 2,0 mg/kg al día                    |
| Grupo III: | Riluzol 30 mg/kg al día                        |
| Grupo IV:  | Rasagilina 0,5 mg/kg y riluzol 30 mg/kg al día |
| Grupo V:   | Rasagilina 2,0 mg/kg y riluzol 30 mg/kg al día |
| Grupo VI:  | Controles                                      |

Los fármacos se administraron en el agua de beber empezando a los 60 días de edad. Las dosis diarias se calcularon basadas en un ingesta diaria de agua de 6 ml. Se prepararon soluciones nuevas una vez a la semana con el volumen consumido total medido para asegurar una dosis diaria y semanal constante. La ingesta de agua no fue diferente entre los grupos y estaba en el intervalo de los 6 ml esperados. Esto se confirmó comparando la ingesta de agua de los controles y los animales tratados. De forma similar, las medidas longitudinales no revelaron cambios importantes en la dosificación, incluso en fases tardías de la enfermedad. El estudio se hizo de forma enmascarada, lo que significa que el tratamiento y la preparación de los fármacos fueron realizadas por individuos separados.

## Evaluación de comportamiento y peso

Los ratones se observaron a diario (incluyendo los fines de semana) y se pesaron semanalmente. El rendimiento motor se evaluó a partir de 40 días de edad usando el aparato del cilindro giratorio para medir la actividad nocturna de los ratones de 8 p.m - 8 a.m. (LMTB, Berlín). La actividad de los animales se registró individualmente mediante un sistema computarizado y se evaluó a diario, incluyendo los fines de semana. Para la evaluación estadística, la actividad en el cilindro giratorio se normalizó respecto a la actividad media de cada animal desde el día 40 hasta el día 60.

## Supervivencia

El estado clínico de los ratones se siguió a diario empezando a los 40 días. El inicio de los signos clínicos se puntuó examinando los ratones para temblores y/o sacudida de las extremidades, y la posición de una o ambas extremidades posteriores (colgando más que extendidas) cuando los ratones se suspendieron en el aire por la cola. La edad del inicio clínico se determinó por la edad (días) a la que se observaron la pérdida de extensión o temblores en las extremidades posteriores. El examen de los ratones para la pérdida del reflejo de enderezamiento determinó la fase final de la enfermedad. Los ratones se sacrificaron si no se pudieron enderezar en 30 segundos cuando se colocaron sobre cualquier lado en una superficie plana. Esta decisión la hizo un veterinario independiente según requiere el protocolo de animales. El protocolo de tratamiento fue aprobado por el Regierungspräsident de Tübinga (35/9185.81-3). El tratamiento y la evaluación clínica fueron realizados por individuos separados, y por tanto los signos neurológicos para determinar el inicio y la fase final de la enfermedad se puntuaron de una manera enmascarada.

## Estadística

Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). La prueba del cilindro giratorio y el peso se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA). Los datos de supervivencia se analizaron mediante el modelo de riesgos proporcional de Mantel-Cox. La significación estadística se ensayó mediante ANOVA unidireccional seguido por comparación de Student-Newman-Keuls retrospectiva con el programa de software SPCC-PC (SPCC, Chicago, IL).

## Estudios neuropatológicos

Los ratones se perfundieron transcardialmente con paraformaldehído al 4%. Los cerebros y la médula espinal entera se disecaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se cortaron en secciones transversales de 20  $\mu$ m en un microtomo deslizante. Las secciones del tronco encefálico y la médula espinal se tiñeron con HE, azul de toluidina (secciones semifinas, 0,5  $\mu$ m) e inmunohistoquímica para marcar astrocitos (GFAP), motoneuronas colinérgicas (ChAT) y células dopaminérgicas (TH).

## Resultados

### Supervivencia

El principal criterio de valoración de este estudio era la supervivencia como se define por el protocolo de animales. La esperanza media de vida de cada uno de los grupos se muestra en la tabla 1. La figura 1 muestra las curvas de Kaplan-Meier complementarias. Los controles tenían una esperanza media de vida de 210,9 días (error estándar de la media, EEM = 7,4779) mientras que los animales tratados con riluzol murieron después de 233,6 días (EEM = 12,6034). Parcialmente debido al EEM comparativamente grande, esta diferencia estaba solo próxima al nivel de  $p = 0,05$  de significación. Los animales tratados con la dosis baja de rasagilina sola (0,5 mg/kg/día) sobrevivieron 223,8667 (EEM = 8,5037) días; esta extensión de la supervivencia no era estadísticamente significativa. La dosis mayor de rasagilina aumentó la duración de la vida en 29 días (esperanza de vida 239,8667; EEM = 4,4281); este resultado era estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ). Se observó un efecto dependiente de la dosis de rasagilina como se muestra por el modelo de riesgo proporcional de Mantel-Cox. La mayor extensión de la duración de la vida se observó con la combinación tanto de riluzol como rasagilina. Este efecto también era dependiente de la dosis ya que la edad media de muerte fue 247,8667 (EEM = 7,9089) días con la combinación rasagilina 0,5 mg/kg/día mientras que la duración de la vida del grupo de combinación de rasagilina 2,0 mg/kg/día se extendió a 252,0 (EEM = 9,4047) días. Se mostró que ambos resultados eran estadísticamente diferentes de los controles ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ), y del grupo tratado con riluzol solo ( $p < 0,02$ ;  $p < 0,03$ ).

**Tabla 1.** Estadística de los efectos de rasagilina y riluzol sobre la supervivencia acumulada en ratones transgénicos SOD1

|         | N  | Media                |                |
|---------|----|----------------------|----------------|
|         |    | Supervivencia (días) | Error estándar |
| RA0,5   | 15 | 223,8667             | 8,5037         |
| RA2     | 15 | 239,8677             | 4,4281         |
| RI30    | 15 | 233,6000             | 12,6034        |
| RIRA0,5 | 15 | 247,8667             | 7,9089         |
| RIRA2   | 15 | 252,0000             | 9,4047         |
| CONTROL | 15 | 210,9333             | 7,4779         |

5 (RA0,5 = rasagilina 0,5 mg/kg; RA2 = rasagilina 2,0 mg/kg; RI30 = riluzol 30 mg/kg; RIRA0,5 = rasagilina 0,5 mg/kg + riluzol 30 mg/kg; RIRA2 = rasagilina 2,0 mg/kg + riluzol 30 mg/kg).

#### Actividad en la rueda de ejercicios

10 Los resultados de medidas de la actividad en la rueda de ejercicios en los 6 grupos eran en gran parte complementarios a los datos de supervivencia, pero también se observaron efectos farmacológicos aparentemente independientes (figura 2). Las diferencias entre grupos se vieron pronto en el periodo preclínico y las diferencias de función persistieron hasta tarde en la enfermedad. Los análisis estadísticos mostraron que los animales tratados con rasagilina (con ambas dosis) y riluzol eran más activos durante el curso del tratamiento y también parecían mantener su actividad motora más tiempo cuando se compararon con los controles (tabla 2). Sin embargo, la actividad motora de los grupos tratados con rasagilina bien a dosis baja o dosis alta combinada con riluzol era menor - lo que contrasta con el tiempo de supervivencia aumentado.

20 Más específicamente, se observó una actividad en la rueda de ejercicios significativamente disminuida de ambos grupos tratados con rasagilina combinada con riluzol. Cuando se compara con los animales sin tratar, la actividad disminuida ya se observó durante las semanas 9 a 12 ( $p = 0,01$ ;  $p = 0,04$ ). Durante las semanas 13 y 16 la actividad en la rueda de ejercicios de los grupos tratados con rasagilina sola aumentó significativamente cuando se comparaba con la actividad motora del grupo control ( $p = 0,007$ ;  $p = 0,0003$ ). Esta actividad aumentada permaneció estable hasta la semana 29. A la semana 29, el rendimiento motor del grupo tratado con rasagilina a dosis baja empezó a disminuir y solo el grupo tratado con rasagilina a dosis alta era aún significativamente más activo ( $p = 0,01$ , semanas 29-36). No hubo ningún caso de muerte prematura en ninguno de los grupos y no se observaron signos de toxicidad evidente de cualquiera de rasagilina sola o la combinación riluzol/rasagilina.

30 Puesto que los grupos de la combinación rasagilina/riluzol sobrevivieron más que todos los otros grupos (véase anteriormente), pero tenían actividad motora disminuida, factores adicionales diferentes de los asociados con la neuroprotección deben ser responsables de la actividad motora disminuida. Sin limitarnos a ninguna teoría específica, creemos que una explicación posible podría ser que la combinación tiene un ligero efecto sedativo en los animales. Sin embargo, esta sedación no se vio durante la observación a diario y no tuvo impacto sobre la ganancia de peso o ingesta de agua de beber.

35 **Tabla 2.** Estadística de los efectos de rasagilina y riluzol sobre la actividad en la rueda de ejercicios en ratones transgénicos SOD1

|         | Semanas<br>9-12 | Semanas<br>13-16 | Semanas<br>17-20 | Semanas<br>21-24 | Semanas<br>25-28 | Semanas<br>29-36 |
|---------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| RA0,5   | 10087           | 9037,14          | 8124,12          | 6070,08          | 4236,96          | 1196,69          |
| RA2     | 11056           | 9999,44          | 8787,09          | 7873,22          | 5902,76          | 2147,29          |
| RI30    | 9729,58         | 7556,57          | 7033,85          | 4687,05          | 2696,11          | 1249,13          |
| RIRA0,5 | 7653,71         | 6692,88          | 4840,69          | 3856,61          | 3558,49          | 1410,11          |
| RIRA2   | 8019,22         | 5775,98          | 5339,56          | 4687,97          | 3165,95          | 1626,65          |
| CONTROL | 9710,04         | 6545,52          | 5079,64          | 3764,38          | 2201,02          | 766,28           |

40 (RA0,5 = rasagilina 0,5 mg/kg; RA2 = rasagilina 2,0 mg/kg; RI30 = riluzol 30 mg/kg; RIRA0,5 = rasagilina 0,5 mg/kg + riluzol 30 mg/kg; RIRA2 = rasagilina 2,0 mg/kg + riluzol 30 mg/kg).

#### Discusión

45 Se examinó el efecto neuroprotector del inhibidor de MAO-B y compuesto antiapoptótico rasagilina solo y en combinación con el putativo bloqueante de la liberación de glutamato riluzol en el modelo G93A de esclerosis lateral amiotrófica familiar (ELAf). El fármaco tenía un efecto terapéutico dependiente de la dosis convincente tanto sobre la función motora como supervivencia preclínica y clínica de los animales. También se encontró que la combinación de rasagilina con riluzol es segura y aumentó la supervivencia en aproximadamente el 20% de una manera dependiente de la dosis.

Se piensa que el mecanismo de acción de riluzol está relacionado con su efecto estabilizante en los canales de sodio y la reducción resultante de la liberación de glutamato presináptico (Doble, A.); el efecto neuroprotector de rasagilina posiblemente es independiente de la inhibición de MAO-B y debido a un efecto estabilizador similar a bcl-2 del potencia de la membrana mitocondrial (Maruyama, W. et al., (2001) *J. Neurochem.*; Maruyama, W. et al., (2000) *J. Neural Trans.*).

Aunque que el riluzol se considera el primer fármaco con un efecto neuroprotector en esclerosis lateral amiotrófica, hay una concordancia universal que el efecto del riluzol se debe mejorar. En el presente estudio, se ha mostrado que una combinación del inhibidor de MAO-B rasagilina y riluzol aumenta dependientemente de la dosis la duración de la vida de ratones G93A considerablemente. Estos fármacos también tienen un efecto beneficioso y dependiente de la dosis sobre la función motora. Sin embargo, durante el tratamiento temprano, no hubo efecto de las combinaciones de fármacos sobre la función motora. Sin limitarnos a ninguna teoría particular, se considera que la falta de efectos funcionales tempranos de las pautas del tratamiento de combinación como una consecuencia de un efecto farmacológico no específico bien sobre el comportamiento o sobre la actividad motora o sobre ambos. No se observaron otros efectos secundarios o tóxicos de los fármacos empleados. La validez de nuestros resultados está subrayada por la reproducción parcial del efecto del riluzol (Gurney M.E. et al., *Ann. Neurol.* (1996)).

En nuestra visión, la interpretación de los resultados de estos estudios solo está limitada por las desventajas conocidas del modelo G93A. Estas desventajas y cómo se abordan por el presente estudio se enumeran a continuación.

Se sabe bien que la esperanza de vida de los ratones usados en el presente estudio aumenta en generaciones posteriores. Para responder de este factor se usó consistentemente la generación F2. Por tanto, no se considera la variación producida por este factor un problema serio.

De forma similar, la variación de la esperanza de vida en una única generación tampoco es una consideración seria para la interpretación de los resultados de este estudio ya que el efecto del tratamiento era comparativamente grande. Sin embargo, sin limitarnos a ninguna teoría particular, creemos que esta variación es la causa de la observación de que el efecto del riluzol (supervivencia media 234 días) no es estadísticamente significativa en nuestro estudio aunque es de un orden de magnitud similar al efecto del riluzol previamente observado por otros (Gurney M.E. et al., *Ann. Neurol.* (1996)) y nosotros (resultados sin publicar). Además, creemos que la falta de un efecto estadístico formal de los grupos de rasagilina a baja dosis (supervivencia media de 224 días) se explica parcialmente por esta variación. Consideramos esta variación normal.

Para responder del hecho de que incluso dentro de la misma generación la variación interindividual de la actividad motora es relevante, se normalizaron las medidas de la actividad motora antes del análisis estadístico.

Por último, con frecuencia se señala que la medida del tiempo de supervivencia tiene sus escollos y debido a diferentes niveles de cuidado animal, los resultados del tratamiento como se describen en la bibliografía pueden no ser comparables. Sin embargo, no consideramos este factor significativo para el desenlace de este estudio ya que el sacrificio de los animales no fue decisión de los investigadores sino la un veterinario independiente que no estaba implicado en el estudio.

El estudio divulgado, por tanto, muestra que la combinación de rasagilina y riluzol es una combinación clínica eficaz para el tratamiento de ELA.

Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar, usando nada más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes a formas de realización específicas de la invención, descritas específicamente en el presente documento. Se pretende que tales equivalentes estén abarcados en el ámbito de las siguientes reivindicaciones.

## Referencias

Doble A. "The pharmacology and mechanism of action of riluzole." *Neurology* 1996;47(Supl. 1):S233-241.

Eliash S, Speiser Z, Cohen S. "Rasagiline and its (S) enantiomer increase survival and prevent stroke in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats." *J. Neural Transm.* 2001;108:909-923.

Ferrante RJ, Shinobu LA, Schulz JB, et al. "Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation." *Ann. Neurol.* 1997;42:326-334.

"Guidance for Industry: *In vivo* drug metabolism/drug interaction studies - study design, data analysis, and recommendations for dosing and labeling," U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Noviembre 1999.

- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, et al "Motor neuron degeneration in mice that express a human superoxide dismutase mutation." *Science* 1994;264:1772-1775,
- 5 Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, et al. "Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1996;39:147-157.
- Huang W, Chen Y, Shohani E, Weinstock M. "Neuroprotective effect of rasagiline, a selective monoamine oxidase-B inhibitor, against closed head injury in the mouse." *Eur. J. Pharmacol.* 1999;336:127-135.
- 10 Kong J, Xu Z. "Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1." *J. Neurosci.* 1998;18:3241-3250.
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, et al. "Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis." *Lancet* 1996;347:1425-1431.
- 15 Ludolph AC, Meyer T, Riepe MW. "Antiglutamate therapy in ALS - which is the next step?" *J. Neural Transm.* 1999;(Supl.) 55:79-96.
- 20 Maruyama W, Akao Y, Youdim MBH, Naoi M. "Neurotoxins induce apoptosis in dopamine neurons: protection by N-propargylamine-1(R)- and (S)-aminoindan, rasagiline and TV1022." *J. Neural Transm.* 2000;(Supl) 60:171-186.
- Maruyama W, Akao Y, Youdim MBH, David BA, Naoi M. "Transfection-enforced bcl-2 overexpression and an anti-Parkinson drug, rasagiline, prevent nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by an endogenous dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol." *J. Neurochem.* 2001;78:727-735.
- 25 Speiser Z, Mayk A, Eliash S, Cohen S. "Studies with rasagiline, a monoamine oxidase-B inhibitor, in experimental focal ischemia in the rat." *J. Neural Transm.* 1999;106:593-606.
- 30 Traynor BJ, Alexander M, Corr B, et al. "Riluzole and prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: Findings of the Irish amyotrophic lateral sclerosis register over a five year study period 1995-2000." *ALS and other motor neuron disorders* 2001;2(Supl. 2):43-44.
- Turner MR, Bakker M, Sham P, et al. "The King's data base 1990-2000: An analysis of the effect on survival of interventions in ALS." *ALS and other motor neuron disorders* 2001;2 (Supl. 2):43.
- 35 Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, et al. "Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Brain* 2000;123:1339-1348.
- 40 Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR et al. "An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria." *Neuron* 1995;14:1105-1116.
- Youdim MBH, Gross A, Finberg JPM. "Rasagiline (N-propargyl-1R(+)-aminoindan), a selective and potent inhibitor of mitochondrial monoamine oxidase B." *Br. J. Pharmacol.* 2001; 132:500-506.

# REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende R(+)-N-propargil-1-aminoindan o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol y un soporte farmacéuticamente aceptable.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, formulada para la administración oral, tópica, parenteral o nasal.
3. Un paquete que comprende la composición farmacéutica de la reivindicación 1 e instrucciones para el uso de la composición farmacéutica en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
4. Un paquete que comprende una preparación farmacéuticamente aceptable de R(+)-N-propargil-1-aminoindan o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, una preparación farmacéuticamente aceptable separada de 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol, e instrucciones para el uso de las preparaciones en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
5. R(+)-N-propargil-1-aminoindan o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en combinación con 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol.
6. La sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 5, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es la sal cloruro, mesilato, maleato, fumarato, tartrato, clorhidrato, bromhidrato, esilato, p-toluenosulfonato, benzoato, acetato, fosfato o sulfato para su uso en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en combinación con 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol.
7. La sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 6, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es la sal mesilato, para su uso en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en combinación con 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol.

Figura 1

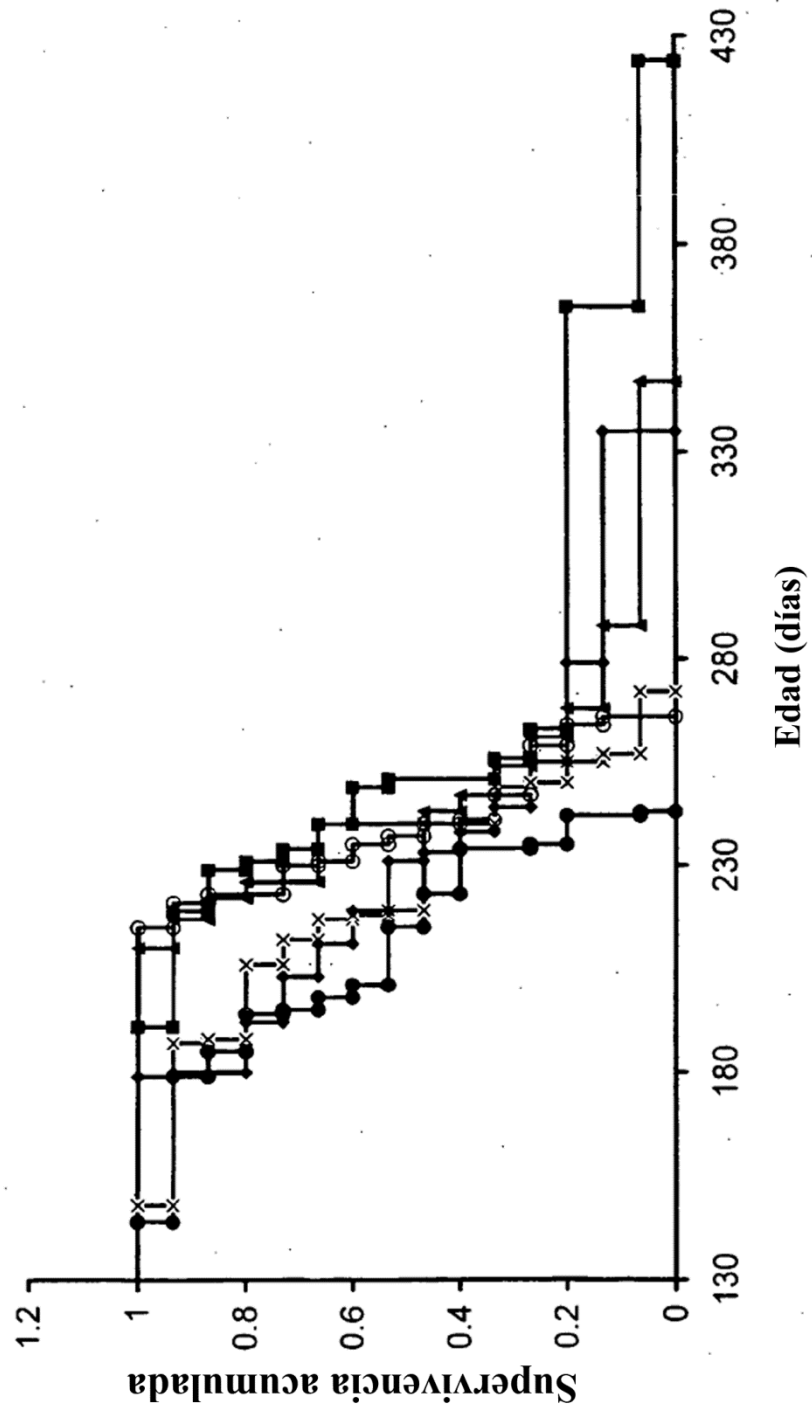


Figura 2

