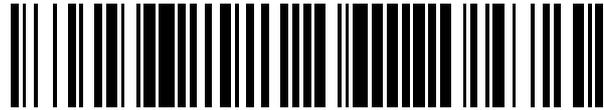


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 527**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/428** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2002 E 10008579 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2246053**

54 Título: **Uso de pramipexol para tratar la esclerosis lateral amiotrófica**

30 Prioridad:

**11.12.2001 US 339383 P**

**11.01.2002 US 347371 P**

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

**04.12.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION  
(100.0%)**

**250 West Main Street Suite 300  
Charlottesville, VA 22902, US**

72 Inventor/es:

**BENNETT, JAMES P.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 432 527 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 pramipexol para tratar la esclerosis lateral amiotrófica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de pramipexol (2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol) para tratar la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Más particularmente, la invención está dirigida al uso del estereoisómero sustancialmente puro R(+) 2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol las sales farmacológicamente aceptables del mismo como agente neuroprotector para tratar la ELA.

**Antecedentes de la invención**

Las enfermedades neurodegenerativas (END), como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP), se producen por la pérdida acelerada de determinadas poblaciones de las neuronas del cerebro. Las enfermedades de Parkinson (EP) y de Alzheimer (EA) suelen aparecer de forma esporádica sin ningún patrón de herencia mendeliana obvio pero puede mostrar sesgos maternos. Aunque existen formas hereditarias raras o poco frecuentes de las END, la relevancia de la patogenia en estas variantes genéticas autosómicas para las formas esporádicas mucho más frecuentes es objeto de un intenso debate.

Cada vez hay más pruebas que proporcionan respaldo convincente de que un componente etiológico primario de las END esporádicas en adultos se refiere a disfunción mitocondrial y al resultante incremento del estrés oxidativo celular. Los cerebros de EP y EA y los tejidos que no pertenecen al SNC muestran reducciones de la actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial. Cuando se amplifican de forma selectiva en modelos celulares híbridos citoplasmáticos ("híbridos"), los genes mitocondriales de sujetos con EP (Swerdlow, et al, Exp Neurol 153:135 - 42, 1998) y EA (Swerdlow, et al, Exp Neurol 153:135 - 42 1997) resumen los déficits de ETC, producen mayor estrés oxidativo y otras varias disfunciones mitocondriales y celulares importantes. El peso combinado de las pruebas de los estudios con tejidos y modelos híbridos de EP y EA sugiere que el alivio del estrés oxidativo por agentes capaces de secuestrar los radicales libres de oxígeno y proteger las células de la muerte celular generada en las mitocondrias se considere una característica primaria de los compuestos desarrollados como agentes neuroprotectores para estas enfermedades Beal, Exp Neurol 153:135 - 42, 2000).

El estrés oxidativo también se ha asociado al trastorno neurodegenerativo fatal de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). La ELA, también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, es un trastorno neurodegenerativo fatal que afecta a las neuronas motoras de la corteza, el tronco encefálico y la médula espinal. Es una enfermedad degenerativa de las neuronas motoras superiores e inferiores que produce debilidad progresiva de los músculos voluntarios, con la muerte en última instancia. Normalmente, el inicio de la enfermedad en la cuarta o quinta década de vida y los individuos afectados sucumben en de 2 a 5 años desde el inicio de la enfermedad. La ELA se produce en las formas esporádica y familiar.

Aproximadamente el 10 % de todos los pacientes de ELA son casos familiares de los cuales el 20 % tiene mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa 1 (SOD 1) (antes conocida como Cu,Zn-SOD), lo que sugiere que una enzima Cu,Zn-SOD de funcionamiento anormal puede desempeñar un papel central en la patogenia y la progresión de la esclerosis lateral amiotrófica familiar (ELAF). Se cree que el incremento de la generación de radicales libres de oxígeno, especialmente radicales hidroxilo, pero la SOD1 mutante, es el factor de iniciación que tiene como resultado la secuencia de acontecimientos que conducen a la muerte de las neuronas motoras en la ELAF. Esta hipótesis está respaldada por informes recientes sobre que la transfección de células precursoras neuronales con SOD1 mutante tiene como resultado una mayor producción de radicales hidroxilo y una mayor velocidad de la muerte celular causada por apoptosis. Además, los solicitantes creen que el estrés oxidativo es responsable de la muerte de las neuronas motoras en las formas esporádicas de la ELA también.

Muchas publicaciones tratan las posibles causas de la EP (enfermedad de Parkinson), EA (enfermedad de Alzheimer) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA), solo algunas de las cuales sugieren un tratamiento específico de la ELA.

El documento WO 96/18395 divulga el uso de pramipexol como agente neuroprotector, en el que las enfermedades específicas mencionadas en el mismo incluyen EP (enfermedad de Parkinson) y EA (enfermedad de Alzheimer). El documento WO 96/18395 no divulga el uso de pramipexol para el tratamiento de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA). El documento WO 96/18395 no divulga una composición farmacéutica que comprende pramipexol, en la que al menos más del 99 % del pramipexol en dicha composición es R(+) 2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol.

Deigner *et al.* (véase Deigner et al., "Apoptosis modulators in the therapy of neurodegenerative diseases", Expert opinion on investigational drugs, Ashley Publications Ltd., London, GB, vol. 9, No. 4, April 2000, pp. 747 - 764) divulgan una revisión general de la participación de apoptosis en enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington y los conceptos terapéuticos

que se usan o proponen para tratar enfermedades neurodegenerativas. Deigner *et al.* (2000) mencionan trastornos neurodegenerativos tales como EM (esclerosis múltiple), EA, EH (enfermedad de Huntington) o EP (véase la pág. 747, resumen) pero ninguna composición farmacéutica que comprende pramipexol o el tratamiento de pacientes con ELA.

5 Worker ("Novel therapeutic strategies", IDRUGS, Current Drugs Ltd, GB, vol. 2, No. 9, 1999, pp. 848 - 852) divulga la modulación de mecanismos mitocondriales como potencial diana para las terapéuticas para tratar la neurodegeneración. Worker (1999) divulga adicionalmente la participación del glutamate específicamente en la pérdida de potencial de membrana mitocondrial mediante acumulación de calcio intracelular. De acuerdo con Worker  
10 (1999), la prevención de la acumulación de calcio intracelular puede prevenir la forma necrótica de la lesión por glutamato y se ha convertido en la estrategia terapéutica en la neurodegeneración. No obstante, Worker (1999) no menciona composiciones farmacéuticas adecuadas para el tratamiento de neurodegeneración. Adicionalmente, Worker (1999) no menciona la ELA ni el tratamiento de la neurodegeneración por ELA en general como enfermedad neurodegenerativa.

15 Abramova *et al.* (véase Journal of Neuroscience Research, 15 Feb 2002, US, vol. 67, No. 4, pp. 494 - 500) divulgan la inhibición de la activación de la caspasa y la muerte celular inducida por iones de metilpiridinio o el péptido beta amiloide en células de neuroblastoma humano por R(+) o S(-) pramipexol en el tratamiento de la EA o la EP. Abramova *et al.* (2002) no tratan ningún enfoque para tratar la ELA.

20 Cassarino *et al.* (véase Brain Research Reviews, vol. 29, No. 1, 1999, pp. 1 - 25) mencionan el estrés oxidativo como implicación importante en las principales neurodegenerativas EA, EP y ELA. Aunque Cassarino *et al.* (1999) divulgan la implicación mitocondrial en estas enfermedades y trata los rasgos patológicos, la cadena de transporte de electrones mitocondrial, las pruebas de afectación enzimática en el estrés oxidativo, las enzimas antioxidantes y los sistemas de modelos híbridos, Cassarino *et al.* (1999) no mencionan composiciones farmacéuticas adecuadas para el tratamiento de la neurodegeneración, en particular composiciones farmacéuticas adecuadas que incluyen pramipexol para el tratamiento de la neurodegeneración por ELA.

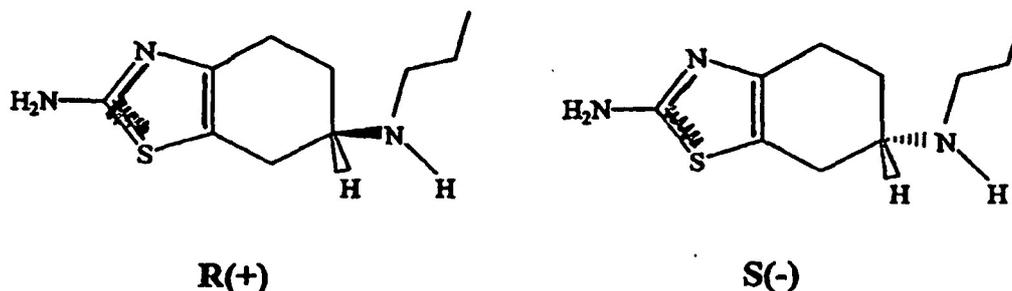
30 Investigaciones recientes han revelado que un probable acontecimiento incitador en la muerte neuronal prematura que se asocia con la ELA es la presencia de genes mitocondriales mutados (ADN mitocondrial, ARNmt). Estas mutaciones en el ADNmt conducen a anomalías en el funcionamiento de las vías de producción de energía en la mitocondria, lo que tiene como resultado una generación excesiva de derivados de oxígeno dañinos conocidos como "especies reactivas de oxígeno" (ERO). Cuando la producción de ERO supera la capacidad de los mecanismos celulares para eliminar/inactivar las ERO se produce la afección conocida como "estrés oxidativa".

35 El estrés oxidativo puede dañar muchos componentes celulares. Los trabajos del inventor han demostrado que un componente celular crucial dañado por el estrés oxidativo en los modelos celulares de EA y de EP es un complejo proteico mitocondrial concreto conocido como el "complejo del poro de transición mitocondrial" (MTPC). La actividad normal del MTPC es esencial para el mantenimiento de un potencial bioeléctrico ( $\Delta\Psi$ ) a través de las membranas de  
40 las mitocondrias, lo que a su vez se usa para la síntesis mitocondrial de las sustancias químicas de almacenamiento de energía, tal como el ATP. La pérdida de  $\Delta\Psi$  tiene como resultado la despolarización de las mitocondrias e inicia una cascada de reacciones bioquímicas que, en último término, tienen como resultado la muerte celular mediante un mecanismo conocido como "muerte celular programada" o "apoptosis." Los mecanismos de la apoptosis se han notificado no solo en la EA y la EP, sino también en otras END tales como esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y  
45 enfermedad de Huntington.

De acuerdo con esto, una estrategia para tratar estas diversas enfermedades neurodegenerativas implica la administración de un agente neuroprotector. Agentes neuroprotectores eficaces para estas enfermedades debilitantes y mortales no solo tienen que ser eficaces en los cultivos celulares y en modelos animales de estas  
50 enfermedades, sino que deben ser tolerados crónicamente a dosis lo bastante altas como para alcanzar niveles terapéuticos en los tejidos nerviosos. Idealmente, estos agentes también estarían dirigidos a componentes celulares implicados en el control de las vías de muerte celular e interrumpir la fisiopatología de la enfermedad.

De acuerdo con una realización, la presente invención usa pramipexol para tratar una enfermedad neurodegenerativa tal como la ELA. El uso comprende las etapas de administrar pramipexol al individuo en una  
55 cantidad eficaz para reducir el estrés oxidativo en dicho individuo.

El pramipexol (PPX, 2-amino-4,5,6, 7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol) existe en forma de dos estereoisómeros.



5 El enantiómero S(-) es un potente agonista en los receptores dopaminérgicos de la familia D2 y se usa ampliamente en el tratamiento de los síntomas de la EP. La síntesis, formulación y administración de pramipexol se describe en las patentes de EE.UU. N° 4.843.086, 4886.12 y 5.112.842. Varios grupos han demostrado que el S (-) PPX es neuroprotector en modelos celulares y animales de mayor estrés oxidativo, incluyendo la toxicidad MPTP para las neuronas dopaminérgicas (véanse las patentes de EE.UU. N° 560.420 y 6.156.777). El S(-) PPX reduce el estrés oxidativo producido mediante la neurotoxina parkinsoniana y el inhibidor metilpiridinio (MPP+) del complejo ETC (MPP+) tanto *in vivo* como *in vitro*, y puede bloquear la apertura del poro de transición mitocondrial (MTP) inducida por MPP+ y otros estímulos (Cassarino, et al, 1998). La estructura catiónica lipófila del PPX sugiere la posibilidad de que la concentración en la mitocondria a través de  $\Delta\Psi_M$ , en combinación con su bajo potencial de reducción (320 mV), puede representar estas propiedades neuroprotectoras deseables.

15 La dosificación con S(-) PPX está limitada en seres humanos por sus potentes propiedades agonistas de la dopamina y restringirá los niveles de fármaco que se pueden alcanzar en el cerebro. Dado que el enantiómero R(+) del PPX tiene muy poca actividad agonista de la dopamina (Schneider y Mierau, J Med Chem 30:494 - 498,1987) pero puede retener las propiedades moleculares/antioxidantes deseables del S(-) PPX, en el presente documento se sugiere que este compuesto tiene utilidad como inhibidor eficaz de la activación de las cascadas de la muerte celular y la pérdida de viabilidad que se produce en las enfermedades neurodegenerativas.

### Sumario de la invención

25 La presente invención se refiere a procedimientos para prevenir y/o retrasar los síntomas o aliviar los síntomas relacionados con la ELA. Más particularmente, la invención está dirigida al uso de composiciones que comprenden pramipexol para tratar la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

### Breve descripción de las figuras

30 La Fig. 1A representa una evolución en el tiempo de la liberación inducida por MPP+ del citocromo C y la Fig. 1B representa una evolución en tiempo de la activación inducida por MPP+ de la caspasa 3. Las células SH-SY5Y incubadas con MPP+ 5 mM durante varios tiempos y se recogieron. En la Fig. 1A, las células se homogenizaron en sacarosa isotónica, se centrifugaron y se añadieron 100  $\mu$ g de la proteína del sobrenadante se sometieron a electroforesis usando SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nailon y se sometieron a inmunotinción para el citocromo C con potenciación con detección de quimioluminiscencia. La banda más a la izquierda (denominada "0hr" en el eje x) corresponde al citocromo C mitocondrial a tiempo "0" y las otras bandas representan la proteína citoplasmática sometida a electroforesis inmunoteñida para el citocromo D. Las posiciones de los marcadores de PM se muestran en el eje y. En otros lotes de células se analizó la caspasa 3 usando un sistema comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Biomol). Los ensayos de la caspasa mostrados en la Fig. 1B son los resultados de 3-4 experimentos independientes. \*\*p < 0,05 en comparación con la actividad a 0,25 horas.

35 La Fig. 2 representa datos que muestran la inhibición de la activación de la caspasa 3 inducida por MPP+ por PPX, ácido bongkréckico y ácido aristolóquico. Las células SH-SY5Y se incubaron con MPP+ 5 mM durante 24 horas en ausencia o presencia de S(-) PPX, 1 Mm, R(+) PPX 1 mM, ácido bongkréckico (BKA) 250  $\mu$ M o ácido aristolóquico (ARA) 25  $\mu$ M o combinaciones de los mismos. Las células se analizaron después para determinar la actividad de la caspasa 3. En la Fig. 2 se muestra la media  $\pm$  SEM para 4-5 experimentos independientes. Las calles A-F representan la activación de la caspasa 3 por células incubadas con los compuestos siguientes. A, control (sin compuestos añadidos); B, MPP+; C, MPP+/BKA; D, MPP+/S(-) PPX; E, MPP+/R(+) PPX; F, MPP+/ARA. Para las calles B, p < 0,05 en comparación con el control; y para las calles C-F, p < 0,05 en comparación con las células tratadas con MPP+ (calle B).

50 La Fig. 3 representa datos que muestran la inhibición de la activación de la caspasa 9 inducida por MPP+ por PPX, ácido bongkréckico y ácido aristolóquico. Las células SH-SY5Y se incubaron con MPP+ 5 mM durante 4 horas en ausencia o presencia de S(-) PPX, 1 Mm, R(+) PPX 1 mM, ácido bongkréckico (BKA) 250  $\mu$ M o ácido

aristolóquico (ARA) 25  $\mu$ M. Las células se analizaron después para determinar la actividad de la caspasa 9. En la Fig. 3 se muestra la media  $\pm$  SEM para 3-4 experimentos independientes. Las calles A-I representan la activación de la caspasa 9 por células incubadas con los compuestos siguientes. A, control (sin compuestos añadidos); B, 15 min MPP+; C, 4 h MPP+; D, 4 h MPP+/PPX; E, 8 h MPP+; F, 8 h MPP+BKA; G, 8 h MPP+/S(-) PPX; H, 8 h MPP+/R(+) PPX; I, 8 h MPP+/ARA. Para las calles C y E,  $p < 0,01$  en comparación con el control; y para las calles F, G, H e I,  $p < 0,05$  en comparación con el control.

Fig. 4A y 4B. Inhibición de la muerte celular inducida por MPP+ por los enantiómeros del PPX. Las células SH-SY5Y se incubaron con MPP+ 5 mM durante 24 horas en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de S(-) PPX (Fig. 4A) o R(+) PPX (Fig. 4B). Las calles A-F representan las células tratadas con PPX 0nM, 3 nM, 30 nM, 300 nM, 3  $\mu$ M y 30  $\mu$ M, respectivamente. Después, las células se incubaron con calceína-AM, se lavaron y se leyeron en un lector de placas de fluorescencia. El número de experimentos independientes se indica en cada barra y los valores P mediante la prueba t para comparación con sin PPX (solo MPP+) se muestran encima de cada barra. En presencia de MPP+, R(+) PPX 3 nM produjo mayor retención de calceína que S(-) PPX ( $p = 0,035$ ), y 3  $\mu$ M, S(-) PPX produjo mayor retención de calceína que R(+) PPX ( $p = 0,027$ ).

La Fig. 5 es una representación gráfica de la evolución en el tiempo de los cambios en los niveles de 2,3-DHBA en suero en la ELA y los sujetos control (CTL) tras la administración de 1,3 gramos de aspirina. La Fig. 5A muestra la media  $\pm$  SEM para los cambios en la concentración en suero de 2,3-DHBA; la Fig. 5B muestra la proporción entre la concentración en suero de 2,3-DHBA y la concentración de salicilato; y la Fig. 5C muestra la concentración de salicilato en suero en el tiempo.

La Fig. 6 es una representación gráfica del efecto de pramipexol en la concentración en suero de 2,3-DHBA. La Fig. 6A indica las concentraciones de DHBA en sujetos individuales tanto antes como después del tratamiento con pramipexol. Los sujetos 2, 3, 7 y 12 eran no ambulatorios. Los sujetos 3 y 7 dependían de respirador. La Fig. 6B proporciona la media  $\pm$  SEM de los niveles en suero de 2,3-DHBA antes y después del tratamiento con pramipexol. La Fig. 6C proporciona los niveles medios  $\pm$  SEM de la concentración en suero de 2,3-DHBA /salicilato antes y después del tratamiento con pramipexol.

Fig. 7. Se administró a los ratones R(+) PPX en el agua de bebida y después se les trató con una neurotoxina (N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, MPTP) que aumenta el estrés oxidativo en el cerebro y el prosencéfalo. Se determinan los niveles de 2,3-DHBA.

## 30 Descripción detallada de la invención

### Definiciones

Al describir y reivindicar la invención se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones expuestas a continuación.

Como se usa en el presente documento, el término “purificado” y términos similares se refieren al aislamiento de una molécula o compuesto de un modo que esté sustancialmente libre de los contaminantes que normalmente se asocian con la molécula o compuesto en un entorno nativo o natural.

Como se usa en el presente documento, el término “tratar” incluye profilaxis del trastorno o afección específico o alivio de los síntomas asociados con un trastorno o afección específico y/o prevención o eliminación de dichos síntomas.

Como se usa en el presente documento, una “cantidad eficaz” significa una cantidad suficiente para producir un efecto seleccionado. Por ejemplo, la cantidad eficaz de pramipexol o un derivado del mismo de acuerdo con la fórmula de la reivindicación 1 abarca una cantidad que inhibirá la generación o disminución de los niveles de especies reactivas de oxígeno presentes en un individuo.

Como se usa en el presente documento, el término “halógeno” significa Cl, Br, F, y I. Halógenos especialmente preferidos incluyen Cl, Br y F. El término “haloalquilo”, como se usa en el presente documento, se refiere a un radical alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> portador de al menos un sustituyente halógeno, por ejemplo clorometilo, fluoroetilo o trifluorometilo y similares.

El término “alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>n</sub>” en el que n es un número entero, como se usa en el presente documento, representa un grupo alquilo ramificado o lineal que tiene uno de los números de átomos de carbono especificados. Normalmente, los grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> incluyen, entre otros, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, ventilo, hexilo y similares.

El término “alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>n</sub>” en el que n es un número entero, como se usa en el presente documento, representa un grupo olefínicamente insaturado ramificado o lineal que tiene de 2 del número de átomos de carbono especificados y al menos un doble enlace. Ejemplos de dichos grupos incluyen, entre otros, 1-propenilo, 2-propenilo, 1,3-butadienilo, 1-butenilo, hexenilo, pentenilo y similares.

El término “alquino C<sub>2</sub>-C<sub>n</sub>” en el que n es un número entero que hace referencia un grupo olefínicamente insaturado ramificado o lineal que tiene de 2 del número de átomos de carbono especificados y al menos un triple

enlace. Ejemplos de dichos grupos incluyen, entre otros, 1-propinilo, 2-propinilo, 2-butadienilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo y similares.

5 El término "cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>n</sub>", en el que n= 8, representa ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

10 Como se usa en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un sistema de anillo carbocíclico mono o bicíclico que tiene uno o dos anillos aromáticos incluyendo, entre otros, fenilo, bencilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo y similares. El término aril(alquilo C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>) hace referencia a cualquier grupo arilo que está unido al resto parental a través del grupo alquilo.

15 El término "grupo heterocíclico" hace referencia a un sistema de anillo carbocíclico mono o bicíclico que contiene de uno a tres heteroátomos en el que los heteroátomos se seleccionan del grupo que consiste en oxígeno, azufre y nitrógeno.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo carbocíclico mono o bicíclico que tiene uno o dos anillos aromáticos que contienen de uno a tres heteroátomos e incluye, entre otros, furilo, tienilo, piridilo y similares.

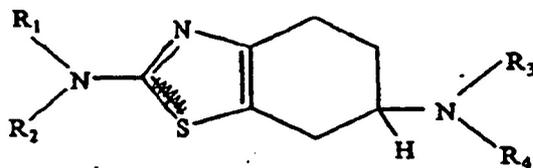
20 El término "bicíclico" representa un anillo de carbono bicíclico en puente o condensado de 7 a 12 miembros estable saturado o insaturado. El anillo bicíclico puede estar unido en cualquier átomo de carbono que tenga como resultado una estructura estable. El término incluye, entre otros, naftilo, dicitlohexilo, dicitlohexenilo y similares.

25 Los compuestos abarcados por la presente invención incluyen compuestos que contienen uno o más centros asimétricos en la molécula. De acuerdo con la presente invención, debe entenderse que una estructura que no designa la estereoquímica abarca todos los diversos isómeros ópticos, así como mezclas racémicas de los mismos.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión agente neuroprotector hace referencia a un agente que previene o ralentiza la progresión de la degeneración neuronal y/o previene la muerte celular neuronal.

### La invención

35 La presente invención se refiere a un procedimiento de tratar la ELA. El procedimiento comprende administrar a un paciente un compuesto que tiene la estructura general:



40 en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son H, y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>. En una realización preferida, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son H y R<sub>3</sub> es propilo. En otra realización, la composición comprende pramipexol en el que el componente pramipexol consiste esencialmente en uno de los dos estereoisómeros de pramipexol (bien R(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol o S(-)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol). En una realización, el principio activo de la composición consiste en el estereoisómero de pramipexol, R(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol diclorhidrato u otras sales farmacológicamente aceptables, sustancialmente libres de su enantiómero S(-). En una realización, se proporciona una composición en la que más del 80 % de los compuestos de pramipexol presentes en la composición están en la conformación R(+), y más preferentemente, más del 90 % o más del 95 % de los compuestos de pramipexol están en la conformación R(+). En una realización se proporciona una composición que comprende pramipexol en la que más del 99 % de los compuestos de pramipexol están en la conformación R(+).

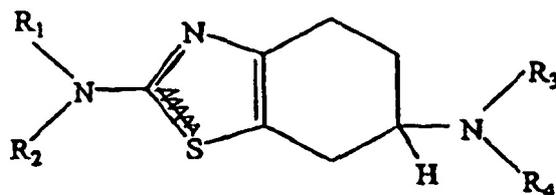
50 En una realización, se proporciona una composición que comprende un principio activo que consiste esencialmente en R(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol diclorhidrato u otras sales farmacológicamente aceptables del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición se puede administrar por vía oral de un modo crónico para prevenir la pérdida de células neurales en la ELA (y, más particularmente, para reducir el estrés oxidativo en los pacientes de ELA).

55 El efecto neuroprotector de las composiciones de la presente invención deriva al menos en parte de la capacidad de los compuestos activos para prevenir la muerte celular neural mediante al menos uno de tres mecanismos. En primer lugar, los presentes tetrahydrobenzotiazoles son capaces de reducir la formación de ERO (tanto *in vivo* en cerebro de rata como *in vitro* en células con alteración de la producción de energía mitocondrial) inducida con neurotoxinas que pueden imitar la EP. De este modo, la función de los tetrahydrobenzotiazoles como "secuestrantes

60

de radicales libres". En segundo lugar, los tetrahydrobenzotiazoles pueden restablecer parcialmente el  $\Delta\Psi$  reducido que se correlaciona con las mitocondrias en la EA y la EP. En tercer lugar, los tetrahydrobenzotiazoles pueden bloquear las vías de la muerte celular apoptótica que se producen mediante modelos farmacológicos de alteración de las mitocondrias en la EA y la EP.

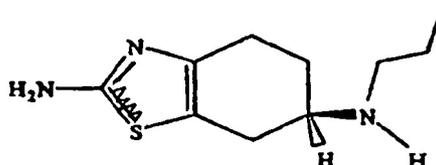
5 De acuerdo con una realización se usa pramipexol para reducir el estrés oxidativo en un paciente con ELA. Con una reducción del estrés oxidativo para los fines de la presente invención se pretende incluir cualquier reducción del nivel de especies reactivas de oxígeno presentes en el paciente, incluyendo, por ejemplo, disminución de los niveles séricos de ERO detectados mediante la conversión de salicilato en 2,3 DHBA. El procedimiento comprende  
10 administrar una cantidad eficaz de un tetrahydrobenzotiazol que tiene la fórmula general:



15 en la que  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_4$  son H y  $R_3$  es alquilo  $C_1-C_3$ . En una realización, el tetrahydrobenzotiazol es R(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol o S(-)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol o una mezcla racémica de los estereoisómeros R(+) y S(-). La cantidad de tetrahydrobenzotiazol administrada para tratar la ELA variará basándose en la vía de administración, así como factores adicionales que incluyen la edad, el peso, el estado de salud general, la gravedad de los síntomas, la frecuencia del tratamiento y si sustancias farmacéuticas adicionales acompañan al tratamiento. La cantidad de dosis del compuesto activo que se va a administrar se  
20 determina fácilmente mediante procedimientos de rutina conocidos para los expertos en la técnica.

Como alternativa, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para potenciar el potencial bioeléctrico ( $\Psi$ ) a través de las membranas mitocondriales de las células con alteración de la producción de energía mitocondrial. El procedimiento comprende las etapas de poner en contacto las células que tienen la producción de  
25 energía mitocondrial alterada con una composición que comprende un principio activo pramipexol y un vehículo farmacéuticamente activo. En una realización, el principio activo pramipexol consiste esencialmente en el estereoisómero R(+) 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol y las sales farmacológicamente aceptables del mismo.

30 La invención también es segura en su administración a seres humanos. El S(-) pramipexol, que es un potente agonista de la dopamina aprobado para el tratamiento de los síntomas de la EP es el enantiómero del R(+) pramipexol. No obstante, el R(+) pramipexol carece de actividad dopaminérgica farmacológica. De acuerdo con lo anterior, el R(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol y las sales farmacológicamente aceptables del mismo se pueden administrar a dosis mucho mayores que el S(-) pramipexol y pueden alcanzar niveles en el  
35 cerebro capaces de proporcionar neuroprotección. La ELA se trata administrando R(+) o S(-) pramipexol, no obstante, se prefiere la administración de R(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol porque se pueden administrar dosis mucho mayores. Como se indica en el ejemplo 1, los isómeros R(+) y S(-) son aproximadamente equipolentes en la reducción del estrés oxidativo. No obstante, el uso del isómero R(+) permite administrar dosis mayores y, por tanto, conseguir una reducción mayor de los radicales de oxígeno libre tóxicos. De  
40 acuerdo con esto, en una realización, se proporciona la reducción de la muerte celular neural en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA), en la que se administra al paciente una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la estructura general.



R(+)

45 La síntesis de pramipexol se describe en la patente europea 186 087 y su homóloga, la patente de EE.UU. Nº 4.886.812.

50 En una realización, el pramipexol y, más preferentemente, el R(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol se mezcla con agentes de unión para dar comprimidos para administración oral o con

5 sustancias conocidas en la técnica para dar un parche transdérmico ("parche cutáneo") para liberación continua. Como alternativa, el pramipexol se puede formular con los agentes estabilizantes necesarios para producir una solución que se puede administrar por vía parenteral (es decir, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea). Las preparaciones orales y/o transdérmicas de la invención se usan para reducir la muerte celular neural en pacientes con ELA.

10 El uso de R(+) pramipexol para tratar la ELA, en virtud de ser un estereoisómero relativamente inactivo del agonista dopaminérgico S(-) pramipexol (Mirapex, Pharmacia and Upjohn) resuelve un problema importante asociado con el uso de S(-) pramipexol como agonista dopaminérgico. La dosis de Mirapex está limitada por los efectos secundarios dopaminérgicos sobre la presión arterial y la actividad mental. El R(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol tiene un 1 % o menos de la potencia para producir los efectos secundarios que son el resultado del uso de S(-) pramipexol. Asimismo, la presente invención se puede administrar por vía intravenosa a dosis mucho mayores que el S(-) pramipexol. Por tanto, se puede usar de un modo seguro en afecciones tales como ictus, en las que la disminución de la presión arterial puede ser perjudicial.

15 Los usos de la presente invención para tratar la ELA simultáneamente reducen el riesgo de efectos secundarios dopaminérgicos. El uso comprende la etapa de administrar una composición que comprende un principio activo pramipexol y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el principio activo pramipexol consiste esencialmente en el estereoisómero R(+) 2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol y las sales farmacológicamente aceptables del mismo. La composición se administra a una dosis de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 500 mg al día de R(+) 2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol y las sales farmacológicamente aceptables del mismo.

20 La dosis a usar depende, por supuesto, del trastorno específico que se va a tratar, así como de factores adicionales que incluyen la edad, el peso, el estado de salud general, la gravedad de los síntomas, la frecuencia del tratamiento y si sustancias farmacéuticas adicionales acompañan al tratamiento. Las cantidades de los compuestos activos individuales se determinan fácilmente mediante procedimientos de rutina conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, los tetrahidrobenzotiazoles de la presente invención se pueden administrar por vía oral a seres humanos con ELA a dosis totales diarias de entre 10 mg y 500 mg.

25 En una realización preferida, el R(+) 2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol (o una sal farmacológicamente aceptable del mismo) se administra a un paciente que sufre una enfermedad neurodegenerativa tal como ELA para tratar la enfermedad. Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye alivio de los síntomas asociados con un trastorno o afección específico y/o prevención o eliminación de dichos síntomas. Más particularmente, se administra al paciente una composición que comprende un principio activo pramipexol y un vehículo farmacéuticamente aceptable para prevenir o reducir sustancialmente la muerte celular neural, en la que el principio activo pramipexol consiste esencialmente en el estereoisómero R(+) 2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol (y las sales farmacológicamente aceptables del mismo). La síntesis, formulación y administración de pramipexol se describen en las patentes de EE.UU. Nº 4.843.086, 4.886.812 y 5.112.842.

30 La generación de radicales hidroxilo en los tejidos de un individuo tiene como resultado un incremento en la conversión del salicilato en ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA) (Floyd et al. (1984) J. Biochem. Biophys. Methods 10:221-235; Hall et al. (1993) J. Neurochem. 60:588-594). Por tanto, la acumulación de 2,3 DHBA en suero de individuos se puede usar como indicador de los niveles de estrés oxidativo que sufre dicho individuo. El efecto del R(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol o S(-)-2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol sobre los niveles séricos de ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA). Como se muestra en las Figs. 5 y 6, los niveles individuales en suero de 2,3 DHBA disminuyeron en los pacientes de ELA tras el tratamiento con S(-)-2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol. Estos datos demuestran que el tratamiento con pramipexol disminuye el estrés oxidativo *in vivo* en los pacientes con ELA.

35 Además, como se muestra en la Fig. 7, se realizaron estudios adicionales en ratones y demuestran la eficacia de pramipexol en la reducción del estrés oxidativo *in vivo*. En este estudio, se administró a los ratones R(+) PPX en el agua de bebida durante 8 semanas a 3 dosis diarias diferentes y después se les administró una neurotoxina (N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, MPTP) que aumenta el estrés oxidativo en el cerebro. Después se analizó en el tejido cerebral la protección de radicales libres de oxígeno. Los datos muestran que las dosis de 30 mg/kg/día y 100 mg/kg/día tuvieron como resultado niveles cerebrales de radicales libres reducidos.

40 También se han realizado estudios de toxicología y no se detectaron pruebas de efectos adversos. En concreto, se realizó un estudio de toxicología de 8 semanas en ratones a los que se administró R(+) PPX en el agua de bebida. Todos los órganos principales se analizaron patológicamente y no se encontraron lesiones. Aunque esto no aborda el problema de la eficacia de R(+) PPX como neuroprotector, demuestra que la potencial seguridad (y por tanto la viabilidad) de la administración de dosis muy altas del fármaco a seres humanos de forma crónica.

45 La presente invención también está dirigida a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de tetrahidrobenzotiazol de la presente invención. Más particularmente, los compuestos de tetrahidrobenzotiazol se pueden formular como composiciones farmacéuticas usando vehículos estándar farmacéuticamente aceptables, cargas,

agentes solubilizantes y estabilizantes conocidos por los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los tetrahydrobenzotiazoles se administran a un individuo que lo necesita mediante una serie de vías, incluidas, entre otras, las vías tópica, oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual o rectal.

5 La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprenden uno o más contenedores cargados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. De acuerdo con una realización se proporciona un kit para tratar a un paciente con ELA. En la presente realización, el kit comprende uno o más de los tetrahydrobenzotiazoles de la presente invención y, más particularmente, el estereoisómero R(+) 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol. Estas sustancias farmacéuticas se pueden envasar en varios envases, por ejemplo viales, tubos, placas de microtitulación con pocillos, frascos y similares. Preferentemente, el kit también incluirá instrucciones de uso.

### 15 Ejemplo 1

#### 20 R(+) y S(-) PPX son inhibidores eficaces de la activación de las cascadas de muerte celular. Materiales y procedimientos

##### 25 *Cultivo celular*

Las células SH-SY5Y humanas se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)) y se mantuvieron en cultivo en estado de replicación. Para los ensayos de la caspasa y los estudios de liberación del citocromo C se cultivaron en matraces T75 con DMEM/niveles altos de glucosa que contiene 10 % de suero bovino fetal, antibiótico/antimicótico (100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina, 0,25 µg/ml de amfotericina B) y 50 µg/ml de uridina y 100 µg/ml de piruvato en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C hasta aproximadamente una confluencia total 2 x 10<sup>7</sup> células/matraz. Después se incubaron con yoduro de metilpiridinio 5 mM (MPP+; Sigma; [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)) o 100 µM 25 - 35 o 35 - 25 péptidos beta amiloide (Bachem; [www.bachem.com](http://www.bachem.com)) durante varios tiempos, después se recogieron. Para los estudios de muerte celular, las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo negro y se cultivaron durante 24 horas en medio DMEM antes de exponerlas a la toxina.

##### 30 *Ensayos de caspasa.*

Tras la exposición a MPP+ o al péptido beta amiloide, las células se recogieron en PBS y se centrifugaron a 450 x g durante 6 minutos a 4 °C. Los sedimentos celulares se resuspendieron en un tampón de lisis celular hipotónico [HEPES 25mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, EDTA 5mM, DTT 1M y un cóctel de inhibidor de la proteasa (Sigma Chemical)] a una concentración de 2 x 10<sup>7</sup> células/100 µl de tampón de lisis. Los lisados se sometieron a cuatro ciclos de congelación y descongelación. Después, los lisados celulares se centrifugaron a 16.000 g durante 30 minutos a 4 °C. Las fracciones del sobrenadante se recogieron y se midió el contenido proteico mediante el ensayo de Lowry (BioRad). Se usaron 100 µg de proteína para medir la actividad de la caspasa en placas de 96 pocillos y se analizaron por cuadruplicado. La actividad se midió usando el tampón de ensayo y el protocolo proporcionado por los fabricantes. (Biomol, caspasa 3; Promega, caspasas 3 y 9). La actividad de la caspasa se basa en la escisión de los sustratos peptídicos sintéticos que tienen como resultado la liberación de cromógenos coloreados (p-nitroanilina (p-NA), Biomol) o fluorescentes (aminometilcoumarina (AMC), Promega). Solo las caspasas activadas son capaces de escindir estos sustratos y la generación de cromógenos se ve completamente inhibida cuando el inhibidor de la caspasa proporcionada con cada kit de ensayo se incluyó en el ensayo. En las condiciones de ensayo indicadas se observaron tasas lineales de generación de cromógeno durante 2 horas. La absorbancia del cromógeno (p-NA) se midió en un lector de placas OptiMax o la fluorescencia del cromógeno (AMC) en el lector de placas SpectraMax Gemini a tiempo cero y tras 30 minutos de incubación a 37 °C para estimar las actividades relativas de la caspasa. La señal del cromógeno a tiempo cero se restó de las lecturas a los 30 minutos.

##### 35 *Muerte celular.*

La muerte celular se estimó midiendo la pérdida de retención de calceína con el ensayo "Live-Dead" (Molecular Probes; [www.molecularprobes.com](http://www.molecularprobes.com)) en las células cultivadas en placas de 96 pocillos y se incubaron con calceína-AM, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las señales de la calceína se analizaron en un lector de placas de fluorescencia ajustable SpectraMax Gemini (Molecular Devices). La fluorescencia de la calceína de las células preincubadas con metanol se restó de todas las lecturas como fondo. Cada ensayo se realizó con 8 pocillos/afección, de los que se realizó la media. Se realizaron 3-8 experimentos independientes para evaluar un intervalo amplio de concentraciones de S(-) y R(+) PPX en este paradigma.

##### 40 *Transferencia de tipo western del citocromo C.*

El citocromo C se detectó mediante transferencia de tipo Western tras la electroforesis de poliacrilamida de 100 µg de proteína del sobrenadante celular y transferencia a la membrana de nailon. El anticuerpo principal fue un anticitocromo C monoclonal de ratón obtenido de Pharmingen y se usó a una dilución de 1:10.000. La detección se

realizó con potenciación de quimioluminiscencia (Pierce) y las imágenes se realizaron con una estación de imágenes BioRad FluorS.

### Fármacos

5 R(+) y S(-) PPX (regalos de Pharmacia Corporation) se obtuvieron como sus sales de diclorhidrato y se disolvieron directamente en medio de cultivo. El ácido bongkréckico, un antagonista del sitio de unión al ATO en el translocador del nucleótido adenina, se proporcionó como solución en NH<sub>4</sub>OH 1M. El ácido aristolóquico (sal de sodio), un inhibidor de la fosfolipasa A2, se obtuvo de Sigma Chemical Co. En los experimentos con caspasa se añadieron 10 fármacos 1 hora antes del MPP+ o del péptido beta amiloide. En los experimentos de calceína/muerte celular se añadieron los fármacos 4 horas antes que el MPP+.

### Resultados

#### 15 *Activación de las caspasas mediante MPP+y BA 25 – 35.*

La Fig. 1B muestra el curso en el tiempo de la actividad de la caspasa 3 durante la incubación de células SH SY5Y con MPP+ 5 mM. El incremento de la actividad fue detectable a las 4 horas y se había duplicado a las 24 horas. La Fig. 1A muestra el resultado de la transferencia de tipo western para la proteína citocromo C liberada en el citoplasma. De un modo similar a la curva de la actividad bioquímica, el citocromo C citoplásmico es detectable en pequeñas cantidades a las 4 horas y aumenta sustancialmente a las 12 horas.

La Fig. 2 muestra que los dos enantiómeros, R(+) y S(-) PPX, suprimían la activación de la caspasa 3 durante la exposición a MPP+. Los incrementos inducidos por MPP+ de la actividad de la caspasa 3 también fueron bloqueados por el ácido bongkréckico, un antagonista específico del sitio de unión al ATP en el sitio de la membrana interna del translocador del nucleótido adenina. El ácido aristolóquico, un inhibidor de la fosfolipasa A2, que previamente se había mostrado que bloqueaba la apoptosis inducida por MPP+ de las células SH-SY5Y (Fall y Bennett, 1998), también previno los incrementos de la actividad de la caspasa 3. La activación de las caspasas por el MPP+ y el péptido BA 25 - 35 se bloqueó mediante los enantiómeros de PPX y los agentes activos en el poro de transición mitocondrial. El S(-) PPX redujo en aproximadamente un 70 % los incrementos de la actividad de la caspasa tras la incubación con el péptido BA 25 - 35 y no tuvo ningún efecto supresor por sí mismo. La exposición a MPP+ también aumentó la actividad de la caspasa 9 con un curso de tiempo similar a la activación de la caspasa 3 (véase la Fig. 3). Los incrementos en la actividad de la caspasa 9 también se bloquearon mediante S(-) y R(+) PPX, ácido bongkréckico y ácido aristolóquico.

La Fig. 4 muestra los efectos sobre la retención de la calceína celular de la incubación de las células SH-SY5Y con varias concentraciones de R(+) o S(-) PPX antes de la exposición a MPP+ 5 mM durante 24 horas. La calceína es un pigmento fluorescente que se retiene dentro de las células como función de su capacidad para mantener un potencial de membrana plasmática. El MPP+ solo redujo la captación de la calceína en aproximadamente un 60 %. Los dos enantiómeros de PPX restablecieron sustancialmente la captación de calceína a niveles de 30 nM y este efecto protector se conservó para PPX 30 μM.

### 40 **Discusión**

Este estudio se centró en el uso de las neurotoxinas MPP+ y 25-35 péptido beta amiloide añadido a las células de neuroblastoma SH-SY5Y en replicación como modelos de cultivo celular para estudiar los potenciales compuestos neuroprotectores útiles para las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer. Las células SH-SY5Y son células en división neoplásicas de origen neuroectodérmico, no neuronas primarias. Son mitóticas como resultado de una mutación Ras, que conduce a la activación crónica de la señalización MAPK/ERK. Las células SH-SY5Y son relativamente insensibles en incubaciones a corto plazo a MPP+ en comparación con las neuronas primarias. Los solicitantes han descubierto que 2,5 y 5 mM, pero no 1 mM, el MPP+ produjo metodología apoptótica y fragmentos de ADN picnótico en 18-24 horas. No obstante, incubaciones más largas con concentraciones menores de MPP+ pueden aproximarse más estrechamente al modelo de MPTP *in vivo* de EP en animales, se ha notificado que una exposición más prolongada para disminuir os niveles de MPP+ todavía pueden activar la cascada de muerte celular mitocondrial.

55 Las células SH-SY5Y son también sensibles a los péptidos beta amiloide. Li, et al (1996) encontraron que -SH-SY5Y sin suero mostraron un extenso marcado en el extremo del ADN con muestras tras 3 días de exposición al beta amiloide 2S-3S 100 μM y exhibieron un incremento dependiente de la concentración del ADN con forma de escalera. Aparentemente no se ha descrito activación inducida por el péptido beta amiloide de las caspasas en SH-SY5Y, pero varios informes han mostrado activaciones de la caspasa por la exposición a los péptidos beta amiloide en 60 varias líneas neuronales primarias. Estos incluyen activación de las caspasas 2, 3 y 6 por el análogo 25-35 en células granulares cerebelosas y de la caspasa 3 en neuronas corticales primarias de rata. Por tanto, no es sorprendente que la actividad de la caspasa 3 (DEVDase) se observara en SH(-)SY5Y expuestas al beta-amiloide 25-35 100 μM pero no se observó activación de la caspasa tras la exposición a la secuencia 35-25 inversa.

65 El centro de los presentes experimentos era determinar si los enantiómeros PPX pueden prevenir la activación de las caspasas y pueden estimular la retención de calceína como marcador de la supervivencia celular en la

exposición aguda a toxinas, en modelos de cultivo celular de EA y EP. La activación del "iniciador" de caspasa 9 y el "ejecutor" caspasa 3 se bloqueó por acción de ambos enantiómeros de PPX en el modelo con MPP+ de la EP y la activación de la caspasa 3 se bloqueó mediante S(-) PPX en el modelo BA 25 - 3S de la EA. Ambos enantiómeros del PPX a niveles nanomolares pudieron estimular la supervivencia en el modelo de EP con MPP+. Por tanto, los presentes hallazgos se añaden a las crecientes pruebas que describen las acciones neuroprotectoras del PPX y sugieren una potencial utilidad clínica de esta familia de compuestos en enfermedades neurodegenerativas.

Aunque este estudio no examinó el sitio más próximo de acción del PPX, varios hallazgos implican al complejo de poro de transición mitocondrial (MTPC) en estos modelos celulares. En primer lugar, el ácido bongkréckico, un antagonista selectivo del translocador del nucleótido adenina e inhibidor de la abertura del MTP, bloqueó la activación inducida por MPP+ de las caspasas 9 y 3. Esto sería consistente con la unión del MPP+ sobre la abertura del MTP directamente o mediante mecanismos que implican estrés oxidativo. En mitocondrias hepáticas aisladas, el MPP+ puede conllevar una abertura clásica del MTP que está bloqueada de forma incompleta por las enzimas secuestrantes de radicales libres y se bloquea más completamente mediante S(-) PPX. El péptido neurotóxico 25 - 35 BA también puede estimular la abertura del MTP en mitocondrias aisladas. Tanto el MPP+ como el péptido 25 - 35 BA aumentan el estrés oxidativo en estudios de microdiálisis de cerebro *in vivo* y en cultivo de células neurales *in vivo* y se ha mostrado que el S(-) PPX reduce el estrés oxidativo inducido por MPP+ *in vitro* e *in vivo*.

## Ejemplo 2

### Uso de pramipexol para tratar la ELA

Se han identificado anomalías oxidativas tanto en la esclerosis lateral amiotrófica familiar (ELAF) y la ELA esporádica (ELAE) más prevalente. El 2,3-DHBA es un subproducto de salicilato hidroxilado que se ha demostrado que es un marcador fiable *in vivo* del incremento de la actividad de los radicales libres y se analiza fiablemente mediante HPLC. Tras la administración de una carga de salicilato oral, se observaron niveles séricos elevados de ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA) y DHBA/salicilato en sujetos con ELAE. Como se ha descrito en el presente documento, se estudiaron 12 pacientes con ELAE para determinar los niveles de 2,3-DHBA tanto antes como después del tratamiento con pramipexol.

### Procedimientos

#### Preparación de los participantes

El presente estudio se realizó en dos fases. En la primera fase se estudiaron once sujetos con ELAE definitiva que cumplieron los criterios de Airlie House y 7 controles. Estos participantes fueron sometidos a una carga de aspirina con el posterior análisis de 2,3-DHBA. Después de recibir 1,3 gramos de aspirina por vía oral se extrajo sangre 2, 3 y 4 horas después. El suero se separó congelado y se almacenó a -80 °C. Después, las alícuotas de suero se codificaron y enmascararon para ensayos de 2,3-DHBA y salicilato.

En la segunda fase, 17 sujetos con ELAE definitiva se seleccionaron al azar de una población clínica. Los sujetos recibieron 1,3 gramos de aspirina por vía oral y se extrajo sangre 3 horas después. Tras la adquisición de estas muestras basales, los participantes con ELAE comenzaron el tratamiento con pramipexol. El escalado de la dosis se realizó de un modo similar en los pacientes con EP con un intento de alcanzar 1,5 mg tres veces-una vez al día como dosis final, tras una titulación de 7 semanas. Después de administrar a cada participante su dosis más elevada de pramipexol durante tres semanas, se repitió el estudio de carga de aspirina. Doce de los diecisiete sujetos con ELAE originales pudieron completar la fase de escalado de pramipexol. De estos, todos menos dos pudieron alcanzar una dosis de pramipexol de 6 mg al día y todos los pacientes obtuvieron al menos una dosis de 3 mg al día. Después, se ofreció a cada participante la oportunidad de continuar con el tratamiento de pramipexol.

#### Preparación de muestras

Preparación de suero: 0,9 ml de suero a 4 °C se mezclaron con 0,2 ml de ácido perclórico 1M y se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 minutos en una microcentrífuga refrigerada.

Ensayo para 2,3-DHBA: Se inyectaron 20 uL de sobrenadante por duplicado en una columna C18 "Catecholamine" Adsorbosphere (Alltech) perfundida a 0,6 ml/min con tampón que consiste en 25 ml/l de acetonitrilo, 1,5 g/l de sulfonato heptano sódico, 3 ml/l de trietilamina, 100 mg/l de a<sub>2</sub> EDTA con un pH final ajustado a 2,8 con ácido fosfórico. Para la detección se usó un detector electroquímico de fluido continuo CouloChem II (ESA, con los parámetros siguientes: celda de protección= +600 mV; E1 = -100 mV; E2 = +400 mV). 2,3-DHBA eluido a 10 - 10,5 minutos en estas condiciones.

Ensayo para salicilato: Se inyectaron 50 ul del sobrenadante por duplicado en una columna C8 Kromosil HPLC (Alltech) perfundida a 0,8 - 1,0 ml/min con 70 % de metanol/30 % de agua/0,5 % de ácido trifluoroacético. El salicilato eluyó a 6-7 minutos en estas condiciones y se detectó mediante absorción ultravioleta a 315 nM.

## Resultados

La Figure 5A muestra el curso en el tiempo del incremento de los niveles séricos de 2,3-DHBA en los 11 pacientes con ELAE ( $59,2 \pm 12,3$  años) y 7 controles de edades equivalentes ( $56,7 \pm 10,7$  años) estudiados en la primera fase. Los pacientes de ELAE exhibieron un intervalo desde el inicio de los síntomas de 10 a 156 meses, lo que representa las etapas tanto aguda como crónica de esta enfermedad. Se encontraron niveles máximos de 2,3 DHBA en sujetos con ELAE a las 3 horas de la administración de la dosis de aspirina y este punto de tiempo se escogió para la segunda fase del estudio. Además, el ANOVA de 2 vías reveló una diferencia en la producción de 2,3-DHBA cuando los grupos de ELAE y control se compararon en el tiempo. Esta diferencia fue significativa al nivel de  $p = 0,033$  para las dos poblaciones; los ensayos post-hoc (prueba de Tukey) no revelaron ninguna diferencia significativa entre puntos de tiempo individuales.

Como comparación adicional se compararon proporciones de 2,3-DHBA/salicilato en el tiempo para las dos poblaciones. El grupo de ELAE mostró un incremento aproximado de 1,5 veces en este marcador normalizado de producción de 2,3-DHBA a las 3 horas de la administración de aspirina. El ANOVA de 2 vías mostró una diferencia significativa al nivel de  $p = 0,06$  (Figura 5B). Los niveles de salicilato en suero no fueron significativamente diferentes en el tiempo entre las poblaciones de ELAE y CTL (Figura 5C). De los 17 pacientes iniciales que entraron en la segunda fase de estudio, 5 abandonaron debido a complicaciones por la enfermedad o incapacidad para tolerar la medicación. Los participantes restantes consistieron en 8 varones y 4 mujeres. La media de edad fue de 63,2 años. La terapia con pramipexol fue bien tolerada por estos sujetos de ELA. Estos participantes no exhibieron ninguna prueba de demencia clínica no tenían ninguna inestabilidad cardiovascular significativa.

Los pacientes reclutados en este estudio representaron varias etapas clínicas de la progresión de la enfermedad. Cuatro participantes eran no ambulatorios, dos de los cuales dependían del respirador. Los otros ocho fueron ambulatorios al inicio del estudio. El tiempo medio desde la entrada en el estudio y la última extracción de sangre fue de 76,6 días con un intervalo de 49 - 105 días.

Los niveles en suero de 2,3-DHBA se compararon antes y después del tratamiento con pramipexol. Sin excepción, se redujeron los niveles en suero individuales de 2,3-DHBA (Figura 6A). La Figure 6B muestra la media  $\pm$  SEM para la concentración de 2,3-DHBA en suero en los sujetos de ELAE antes y después de alcanzar la dosis estable de pramipexol. La reducción media fue de aproximadamente un 45 % y fue significativa al nivel de  $p = 0,015$ . Los niveles de salicilato en suero ( $\mu\text{M}$ ) no se modificaron antes ( $18,8 \pm 7,2$ , S.D.) y durante  $20,2 \pm 5,5$ , S.D.) el tratamiento de pramipexol. La Figura 6C muestra que los niveles en suero de 2,3-DHBA se normalizaron con los niveles de salicilato para cada sujeto se redujeron una media del 59 % mediante el tratamiento con pramipexol; la prueba t mostró esta diferencia significativa al nivel de  $p = 0,010$ .

## Discusión

Este estudio reveló que se observaba un incremento por dos veces aproximado del estrés oxidativo *in vivo* en pacientes de ELA tras la carga de aspirina oral basándose en el incremento de la producción de 2,3-DHBA. El incremento de 2,3-DHBA se observó en varias etapas de la progresión de la enfermedad clínica, lo que sugiere que este metabolito puede servir como marcador fiable del incremento del estrés oxidativo a lo largo este proceso de enfermedad, pero, particularmente, en las primeras etapas en las que el diagnóstico suele ser incierto. Dado el pequeño tamaño de la población no se realizó ningún intento para correlacionar el nivel de producción 2,3-DHBA con la etapa de la enfermedad.

El presente estudio también reveló que el tratamiento pramipexol a dosis habitualmente toleradas en la enfermedad de Parkinson redujo el estrés oxidativo *in vivo* en sujetos con ELA. El suero de 12 pacientes antes y varias semanas después de alcanzar las dosis máximas toleradas de pramipexol reveló una reducción de aproximadamente un 45 % del 2,3-DHBA basal y aproximadamente un 59 % del 2,3-DHBA basal normalizado al nivel del salicilato. Es probable que el pramipexol produzca esta reducción en la producción de ERO como resultado de sus propiedades de secuestro de radicales libres/antioxidantes. Se ha demostrado que el pramipexol es capaz de reducir la producción de ERO en células de neuroblastoma SY5Y *in vitro* y en el núcleo estriado de rata *in vivo* expuesto de forma aguda a la inhibición del complejo I con metilpiridinio (Cassarino et al., J. Neurochem 1998; 71:295 - 301). El pramipexol también reduce la producción de ERA en el cerebro *in vivo* tras la infusión de la neurotoxina. La 6-hidroxi-dopamina (Ferber et al., Brain Res 2000; 883:216 - 23) inhib la liberación del citocromo C y reduce la oxidación lipídica en el cerebro *in vivo* tras el tratamiento con la pro-neurotoxina MPTP [16].

Dado que se observan acciones neuroprotectoras aproximadamente equivalentes del pramipexol en los enantiómeros R(+) and S(-) y dado que las acciones de agonista dopaminérgico residen principalmente en el enantiómero S(-), las acciones secuestrantes de ERO probablemente no tengan ninguna relación con las propiedades de agonista dopaminérgica. Si esto es cierto, el enantiómero R(+) del pramipexol debería ser tolerado a dosis mucho más altas que el enantiómeros S(-) usado en el presente estudio, con el potencial de incrementar la actividad antioxidante *in vivo*.

Los factores de estrés oxidativo están bien establecidos en la ELA esporádica, aunque la etiología del incremento del estrés oxidativo sigue sin conocerse. Los marcadores del daño por estrés oxidativo en el SNC en la ELA incluyen un incremento de la tinción inmunohistoquímica en la médula espinal lumbar para el producto de la peroxidación lipídica e incrementos de los niveles en líquido cefalorraquídeo de nitrotirosina y manganeso nitrosilado superóxido dismutasa. Estos resultados son consistentes con el aumento del daño en el tejido de ELA por las ERO que incluyen derivados del óxido nítrico.

Los modelos animales y celulares de ELA también proporcionan información del estrés oxidativo y la vulnerabilidad neuronal motora. Las neuronas motoras de la médula espinal en la ELA tienen menor actividad de la citocromo C oxidasa (estudiada histoquímicamente) y dicha función reducida de la cadena de transporte de electrones puede servir para aumentar la producción de radicales libres de oxígeno. La microdiálisis de la médula espinal de los ratones portadores de un gen de la SOD1 FALS humana mutantes reveló un incremento de la producción de ERO y niveles de malondialdehído consistentes con dicho concepto. Además, se ha notificado que la mutación de CuZn-SOD FALS aumentaba la vulnerabilidad de las neuronas motoras espinales a la muerte por excitotoxicidad y el mecanismo implicado aumentó el estrés oxidativo. Por último, el incremento del estrés oxidativo en la ELA puede ser responsable del incremento de los marcadores de los procesos de muerte celular apoptótica observados en la médula espinal de ELA y de la participación de las caspasas en la muerte de neuronas motoras en un modelo de ratón FALS.

La patología mitocondrial se produce al principio de la evaluación de la enfermedad experimental de las neuronas motoras. Estas estructuras no solo son sensibles a los daños oxidativos sino que su disfunción conduce a una producción acelerada de radicales libres y a los posibles daños en el ADN mitocondrial. La visualización de la función mitocondrial en las biopsias de músculos con ELA reveló una reducción de la actividad del complejo I y el análisis ultraestructural de las dendritas de las células del cuerno anterior con ELA reveló agregación de mitocondrias oscuras. La pérdida selectiva del transportador de aminoácidos 2 excitatorio glial (EAAT2) alrededor de las células en degeneración del cuerno anterior en la ELA puede reflejar daños proteicos adicionales que podrían contribuir al incremento de la excitotoxicidad.

El daño oxidativo en la ELA puede representar un proceso neurodegenerativo primario, un epifenómeno secundario de la patología mitocondrial en las neuronas motoras o una combinación de ambos. Los estudios con híbridos con amplificación de los genes mitocondriales de ELAE han mostrado que un incremento del estrés oxidativo en la ELAE se puede entender en términos de una etiología genética mitocondrial primaria. No se sabe cómo el ADN mitocondrial se convierte en defectuoso en la ELA; son posibles tanto los mecanismos heredados por vía materna como los adquiridos esporádicamente.

El uso de carga de salicilato y de las mediciones de 2,3-DHBA como estimación de los niveles de estrés oxidativo *in vivo* se ha aplicado a la diabetes de inicio en la edad adulta, la disfunción hepática en alcohólicos y la artritis. Múltiples especies oxidantes pueden contribuir a la producción de 2,3-DHBA, incluyendo el radical hidroxilo y en anión peroxinitrito. Por tanto, no se puede asignar una fuente concreta de ERO para los niveles de 2,3-DHBA observados ni se puede definir la o las fuentes de tejido de incremento de la hidroxilación del salicilato.

En resumen, los niveles séricos basales de 2,3-DHBA, un marcador del estrés oxidativo se encontraron aumentados en una cohorte de sujetos con ELAE y estos niveles se redujeron tras el tratamiento con pramipexol. Como se muestra en la Fig. 6, los niveles individuales en suero de 2,3 DHBA disminuyeron en los pacientes de ELA tras el tratamiento con S(-)-2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol. En particular, se administró a los pacientes una dosis oral diaria de 3 - 6 mg de R(+) 2-amino-4,5,6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol durante siete semanas. Al final de las siete semanas se tomaron muestras de suero y se midió la concentración de 2,3 DHBA y se comparó con los niveles de 2,3 DHBA en las muestras de suero tomadas antes del tratamiento. Estos datos demuestran que el tratamiento con pramipexol disminuye el estrés oxidativo *in vivo* en los pacientes con ELA.

### Ejemplo 3

#### Eficacia De pramipexol en la reducción del estrés oxidativo inducido por MPTP *in vivo*

##### Procedimientos

Ratones C57BL/6 macho recibieron R(+) pramipexol diclorhidrato diario en el agua de bebida durante 8 semanas a dosis calculadas para proporcionar 0, 10, 30 o 100 mg/kg/día. El día del estudio, se inyectó a los ratones 30 mg/kg s.c. de la neurotoxina N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) para aumentar el estrés oxidativo en el cerebro. Una hora después se inyectó a los ratones 100 mg/kg i.p. de salicilato sódico. Una hora después de la inyección de salicilato se sacrificó a los ratones y los prosencéfalos se analizaron para determinar el contenido en ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB).

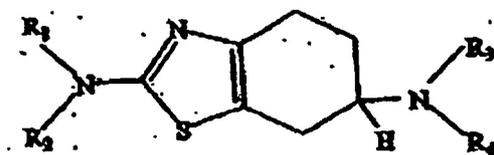
Como se muestra en la Fig. 7, los resultados muestran que un tratamiento de 30 y 100 mg/kg/día con R(+) pramipexol reducía significativamente el estrés oxidativo en el prosencéfalo producido por MPTP. También se han realizado estudios de toxicología y no se detectaron pruebas de efectos adversos. En concreto, se realizó un estudio

de toxicología de 8 semanas en ratones a los que se administró R(+) PPX en el agua de bebida. Todos los órganos principales se analizaron patológicamente y no se encontraron lesiones.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un tetrahidrobentotiazol para la preparación de una composición para tratar a los pacientes con ELA, en el que el tetrahidrobentotiazol tiene la estructura general:

5



en la que  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$ , se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo  $C_1C_3$ .

10

2. Una composición que comprende un tetrahidrobentotiazol como se define en la reivindicación 1 para usar en el tratamiento de pacientes con ELA.

15

3. El uso de la reivindicación 1 o la composición para uso de la reivindicación 2, en donde  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_4$ , son H y  $R_3$  es alquilo  $C_1-C_3$ .

4. El uso de la reivindicación 1 o la composición para uso de la reivindicación 2, en donde dicho tetrahidrobentotiazol es pramipexol.

20

5. El uso de la reivindicación 4 o la composición para uso de la reivindicación 2, en donde más del 90 % del pramipexol en dicha composición es R(+) 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol o una sal farmacológicamente aceptable del mismo.

25

6. El uso de la reivindicación 1 o la composición para uso de la reivindicación 2, en donde la composición es para potenciar el potencial bioeléctrico ( $\Delta\Psi$ ) a través de las membranas mitocondriales de las células con alteración de la producción de energía mitocondrial.

7. El uso de la reivindicación 6, en donde dicho tetrahidrobentotiazol es pramipexol.

30

8. El uso o la composición para uso de la reivindicación 7, en donde más del 90 % del compuesto pramipexol es R(+) 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol o una sal farmacológicamente aceptable del mismo.

9. El uso de la reivindicación 1 o la composición para uso de la reivindicación 2, en donde la composición es para reducir el estrés oxidativo en un paciente de ELA.

35

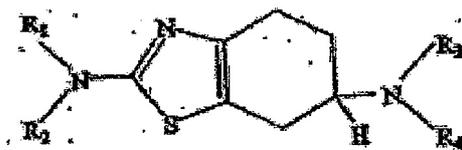
10. El uso o la composición para uso de la reivindicación 9, en donde dicho tetrahidrobentotiazol es pramipexol.

11. El uso o la composición para uso de la reivindicación 10, en donde dicho pramipexol es R(+) 2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-propilaminobenzotiazol o una sal farmacológicamente aceptable del mismo.

40

12. Un procedimiento in vitro para potenciar el potencial bioeléctrico ( $\Delta\Psi$ ) a través de las membranas mitocondriales de células con alteración de la producción de energía mitocondrial, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de poner en contacto dichas células con una composición que comprende un tetrahidrobentotiazol que tiene la estructura general

45



en la que  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$ , se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo  $C_1-C_3$ .

50

### Fig. 1A



### Fig. 1B

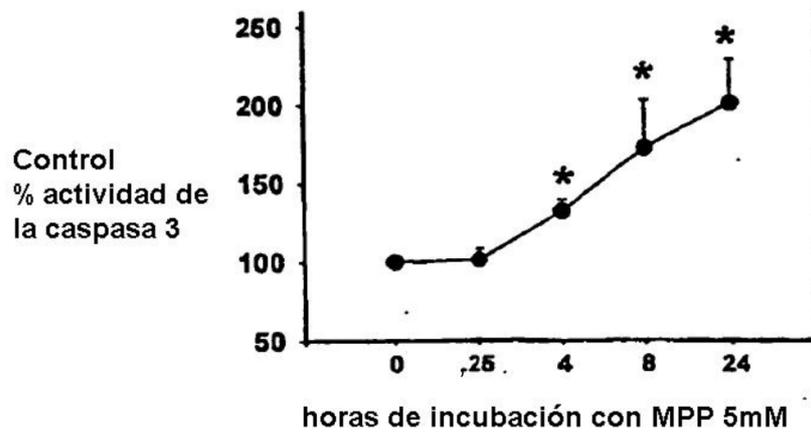
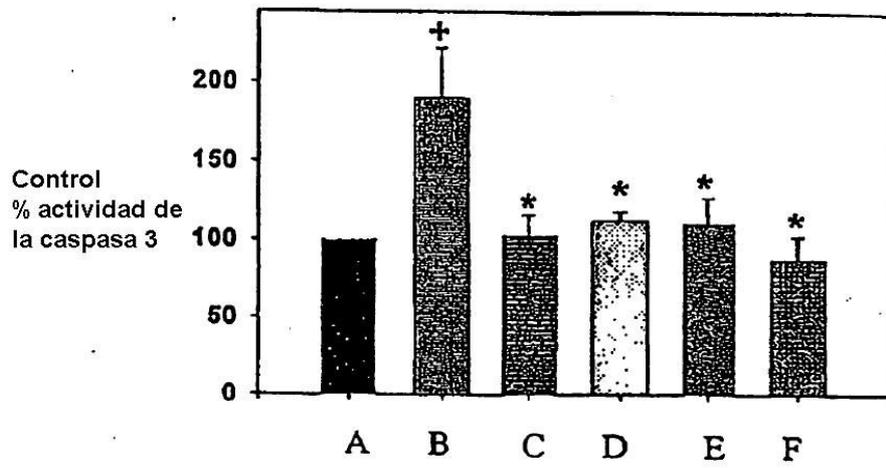
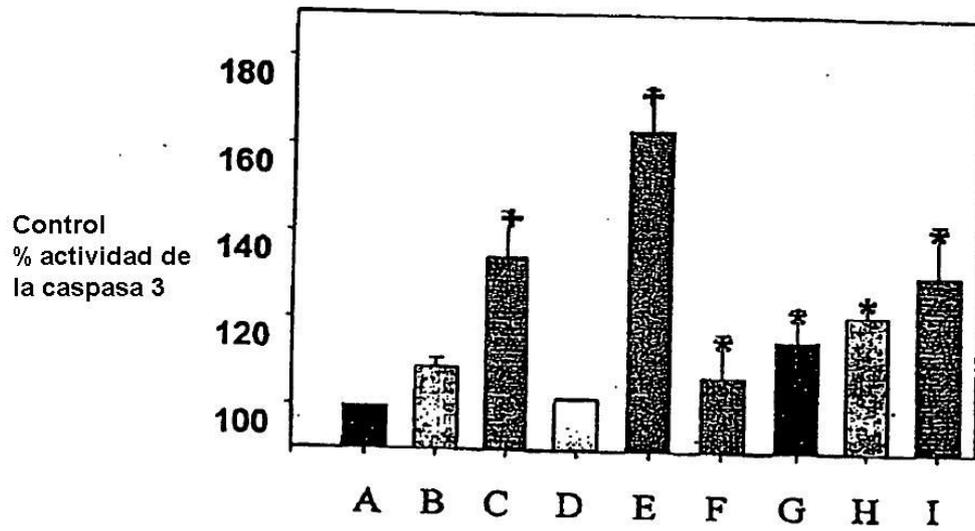


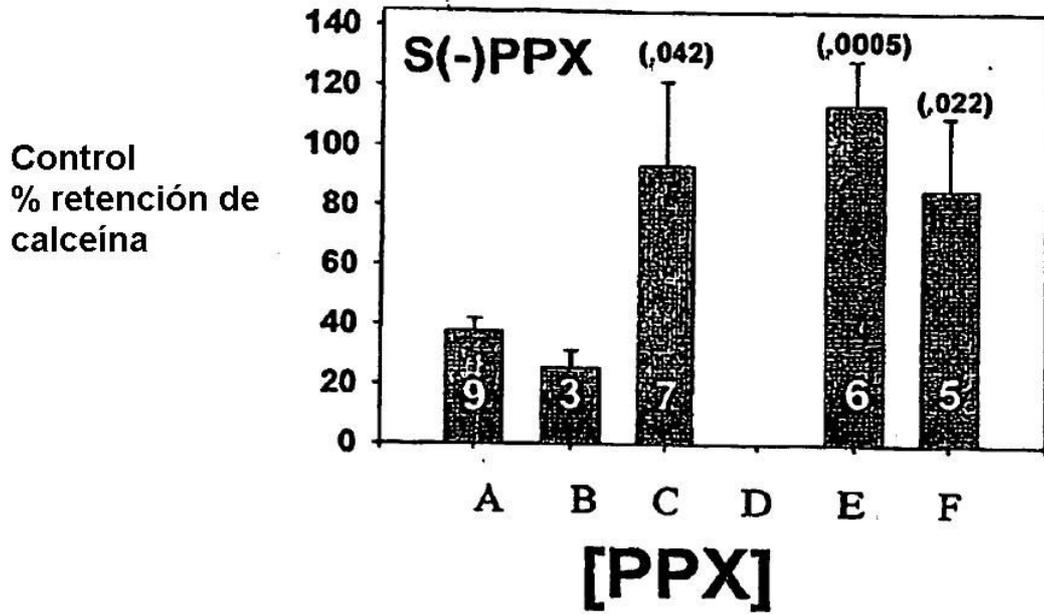
Fig. 2



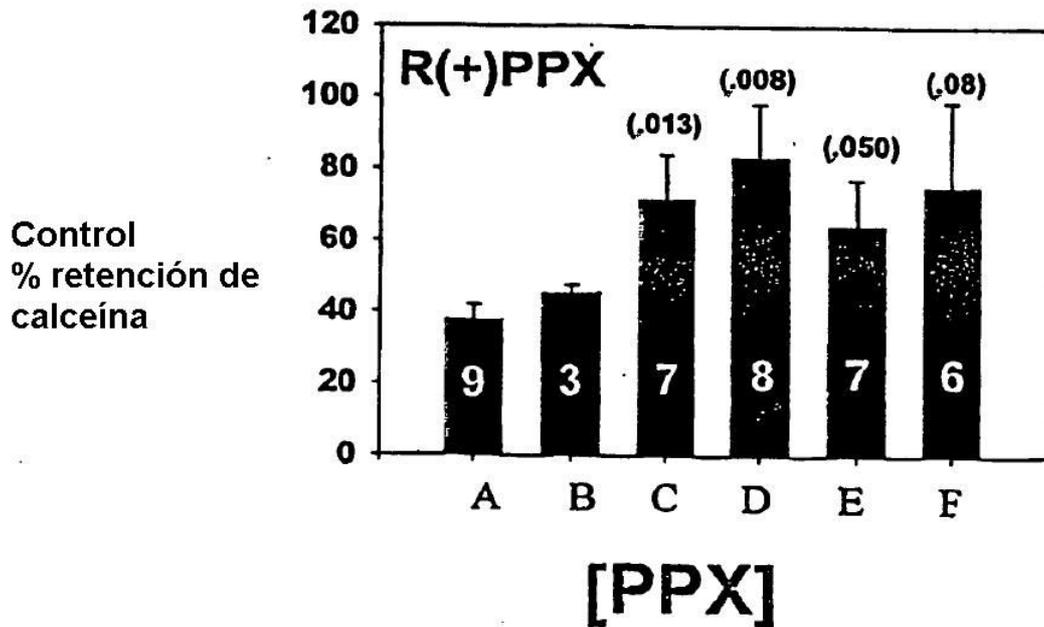
**Fig. 3**



**Fig. 4A**



**Fig. 4B**



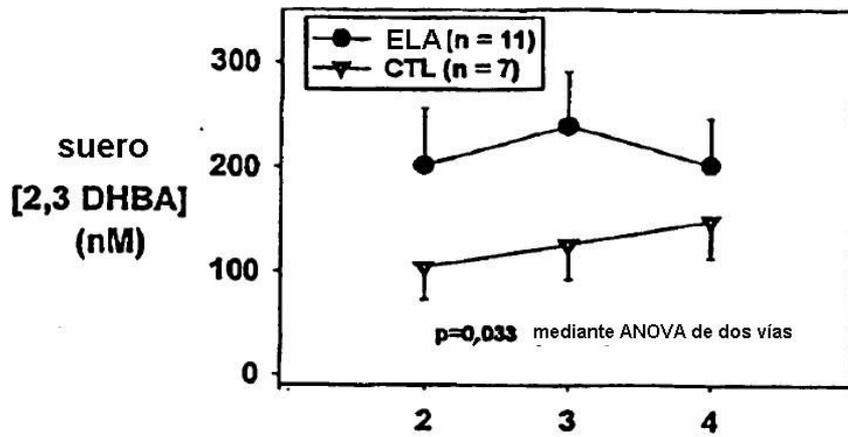


Fig. 5A

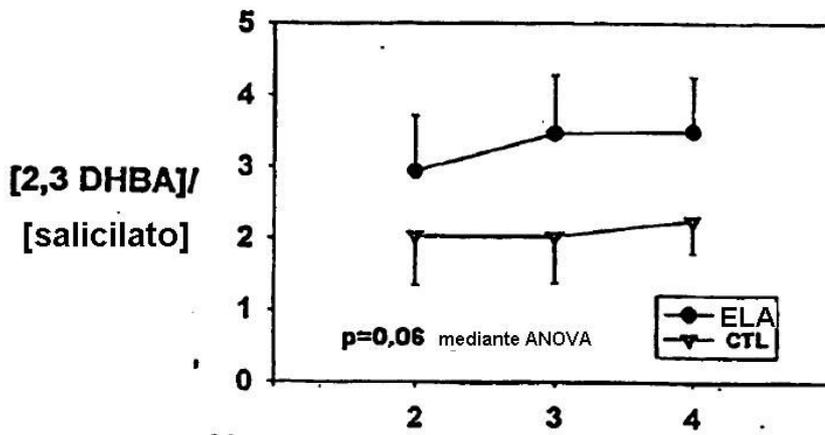


Fig. 5B

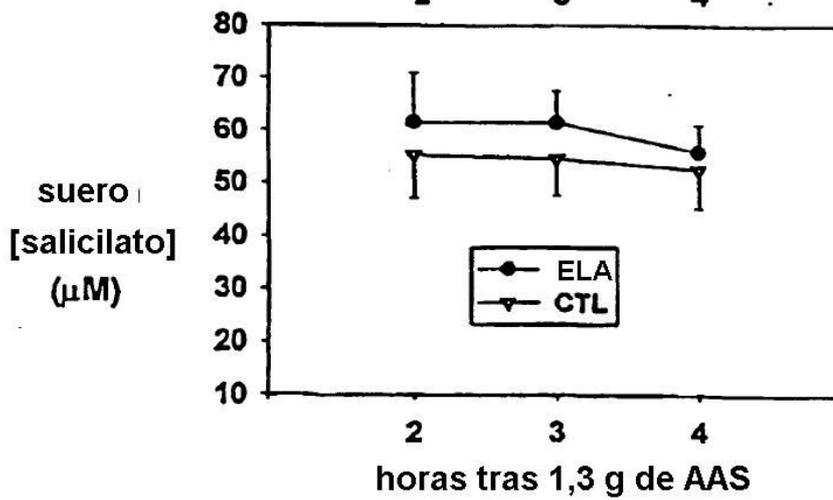
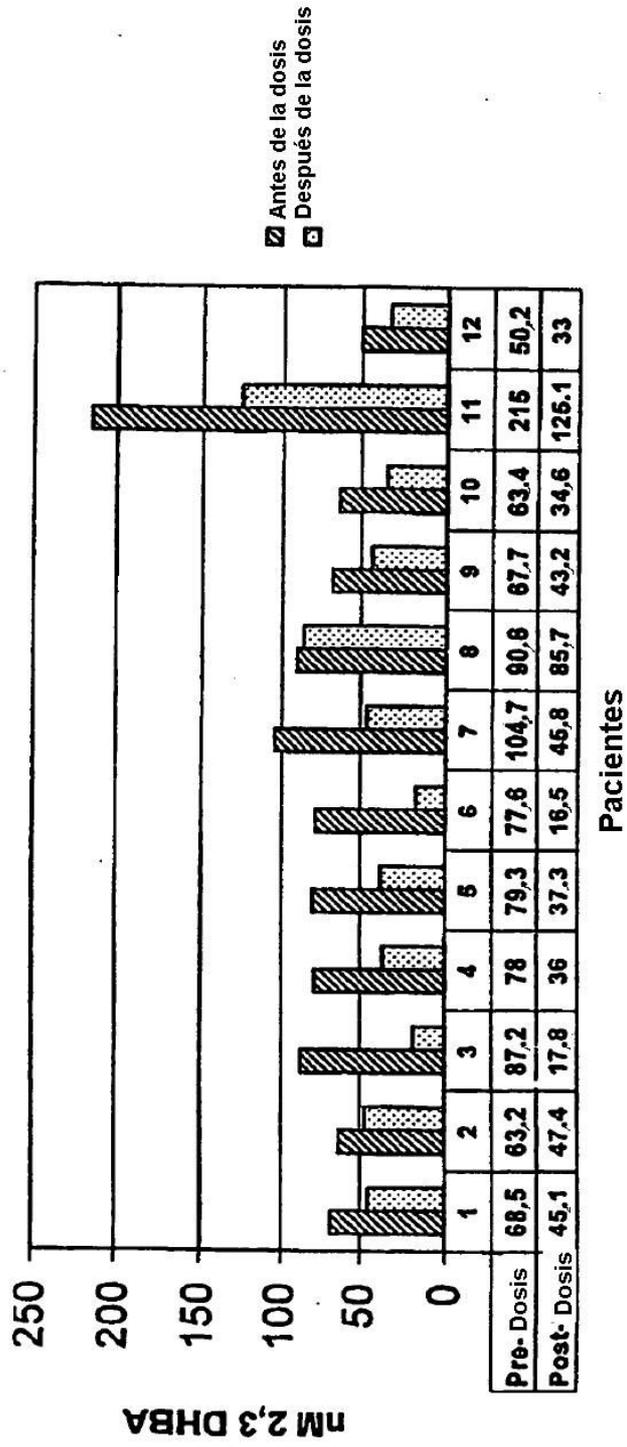
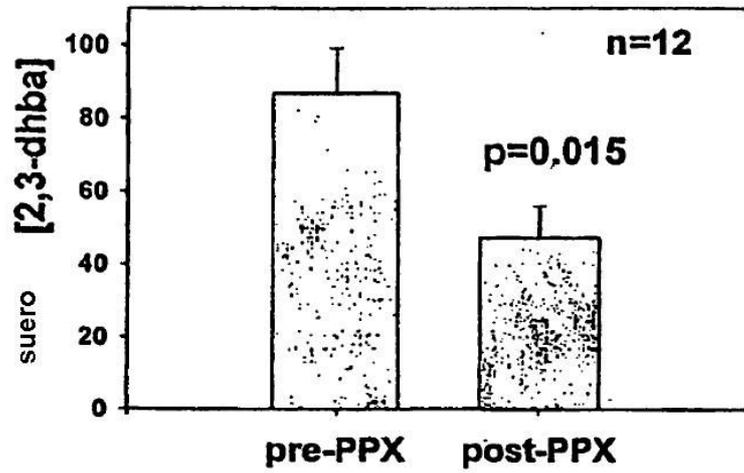


Fig. 5C

**Fig. 6A**



**Fig. 6B**



**Fig. 6C**

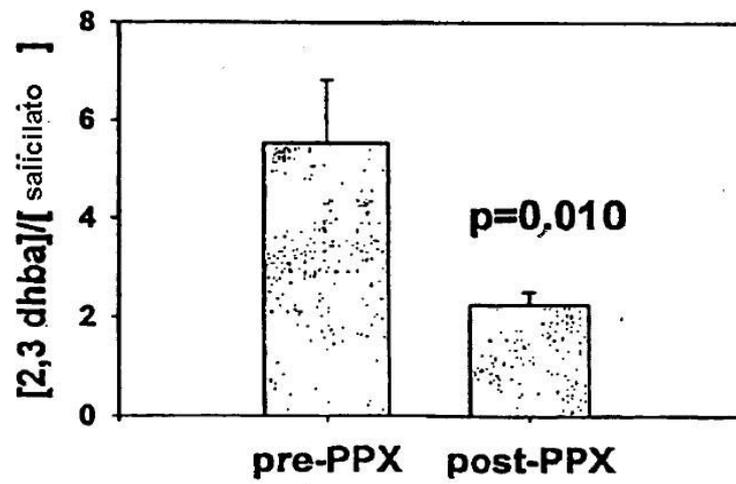


Fig. 7

