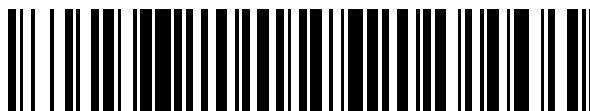


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 212**

51 Int. Cl.:

A61K 31/366 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2009** **E 09757654 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014** **EP 2301532**

54 Título: **Uso de estatinas como anticonvulsivos, antiepilépticos y neuroprotectores**

30 Prioridad:

03.06.2008 ES 200801733

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2015

73 Titular/es:

NEURON BIOPHARMA, S.A. (100.0%)
Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud
Avda. de la Innovación, 1
18100 Armilla - Granada, ES

72 Inventor/es:

BURGOS MUÑOZ, JAVIER SANTOS;
RAMÍREZ MORENO, CARLOS y
VELASCO ALVAREZ, JAVIER

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 528 212 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 estatinas como anticonvulsivos, antiepilépticos y neuroprotectores

Campo de la invención

La invención se refiere al uso de estatinas como compuestos antiepilépticos, anticonvulsivos, neuroprotectores y antioxidantes en la prevención y/o el tratamiento de epilepsia o crisis epilépticas.

Antecedentes de la invención

La epilepsia es una enfermedad crónica caracterizada por convulsiones recurrentes sin causa aparente. Estas convulsiones son transitorias y ocurren como consecuencia de una actividad neuronal sincrónica o excesiva del cerebro. No obstante, por extensión, el término "epilepsia" incluye un conjunto de enfermedades caracterizadas por una amplia diversidad de síntomas, siendo común a todas ellas una actividad eléctrica episódica anormal en el cerebro que causa convulsiones.

Los medicamentos usados actualmente para la prevención y/o el tratamiento de la epilepsia (antiepilépticos) se basan fundamentalmente en compuestos inhibidores de canales iónicos (de voltaje y asociados a receptores neuronales); no obstante, el uso de tales fármacos provoca efectos secundarios graves en los pacientes que afectan al sistema nervioso central, tales como ataxia, diplopia (visión doble), descoordinación motora, hiperactividad, etc., por lo que existe la necesidad de encontrar nuevos compuestos útiles para el tratamiento de la epilepsia. Ventajosamente, la seguridad y eficacia de dichos compuestos debería ser igual o superior a la de los antiepilépticos usados habitualmente en el tratamiento de la epilepsia.

Ahora se ha encontrado que las estatinas pueden usarse como agentes anticonvulsivos y antiepilépticos en la prevención y/o el tratamiento de la epilepsia, las crisis epilépticas y las convulsiones.

Las estatinas son inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima que cataliza la etapa limitante en la biosíntesis del colesterol, y se usan normalmente para disminuir los altos niveles de colesterol asociados a las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Las indicaciones terapéuticas de las estatinas se han ido ampliando a lo largo de los años. De hecho, estos compuestos no sólo se usan para disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos sino también para reducir el riesgo de infarto de miocardio y de muerte coronaria. Además, se están asociando nuevas propiedades a las estatinas, especialmente a nivel de daño cerebral causado por traumatismo o en demencias. Se han propuesto propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Pahan, Cell Mol Life Sci. 2006; 63[10]:1165-78). Adicionalmente, se ha demostrado que la simvastatina intensifica la capacidad de memoria y aprendizaje en ratones (Ling y col., Ann Neurol. 2006; 60[6]:729-39). Asimismo, se ha descrito su potencial empleo como agente antineoplásico y como agente antirretroviral. También se ha descrito que algunas estatinas previenen del daño neuronal en modelos de enfermedades agudas tales como la degeneración retiniana (Nakazawa y col., J Neurochem. 2007; 100[4]:1018-31) y en traumatismo o isquemia (Vaughan y Delanty, Stroke 1999; 30[9]:1969-73) así como en modelos *in vitro* de neuronas corticales primarias (Bosel y col., J Neurochem. 2005; 92[6]:1386-98; Zacco y col. J Neurosci. 2003; 23[35]:11104-11).

El documento US 2007/270350 A1 divulga la capacidad de atorvastatina y lovastatina para reducir crisis inducidas por ácido káínico en ratas tratadas previamente con dichas estatinas. He y col. (Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 2006, 65[7]:652-663) divulga la capacidad de lavastatina para proteger neuronas en el hipocampo del daño provocado por la inyección intracerebrovascular de kainato. Rangel y col. (Archivos de NeuroPsiquiatría 2005, 63[4]:972—976) divulga la capacidad de lovastatina para prevenir la pérdida neuronal en CA1 en el hipocampo después de estado epiléptico inducido por pilocarpina.

Las estatinas, en general, son fármacos con un alto nivel de seguridad ya que se administran para disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos en bolsas muy amplias de población. De hecho, los fármacos relacionados con el control de los niveles de colesterol y de triglicéridos representan el área terapéutica con mayor éxito a nivel mundial, en la que las estatinas representan un 90% del mismo, siendo los 2 fármacos más vendidos durante estos 2 últimos años la atorvastatina y la simvastatina. No obstante, algunas estatinas han sido retiradas del mercado como consecuencia de sus efectos secundarios. Así, se han documentado crisis epilépticas en algunos casos tras la administración de estatinas, concretamente, se ha documentado un episodio de rhabdomiólisis severa con convulsiones y coma tras la administración de rosuvastatina a un paciente (Lorenzoni y col., Arq Neuropsiquiatr. 2007; 65[3B]:834-7); y, en otro caso, la administración de fluvastatina a un paciente con síndrome antifosfolípídico catastrófico produjo convulsiones focales (Miesbach y col., J Neurol Sci. 2005; 238[1-2]:93-5).

Sumario de la invención

Los inventores han encontrado ahora que una estatina, concretamente la simvastatina, sorprendentemente, tiene propiedades antiepilépticas y anticonvulsivas (Ejemplos 1-3), ejerce un efecto protector frente a la muerte causada por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 4), así como un efecto protector frente a la muerte neuronal en el hipocampo

causada por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 5), y un efecto neuroprotector frente a la neurodegeneración, apoptosis y gliosis reactiva, causada por una sustancia excitotóxica (Ejemplos 6-8), y, además, ejerce un efecto antioxidante frente a la peroxidación lipídica causada por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 9). Se ha descrito también que otra estatina, específicamente la lovastatina, también tiene propiedades antiepilépticas y anticonvulsivas frente a la acción de una sustancia excitotóxica (Ejemplo comparativo 10).

Dichos ejemplos ponen de manifiesto el uso potencial de las estatinas en la prevención y/o el tratamiento de la epilepsia y las crisis convulsivas o convulsiones, así como su capacidad para proteger de la muerte neuronal asociada a enfermedades neurodegenerativas en regiones profundas del cerebro tales como el hipocampo. Además, y, sorprendentemente, en la presente invención se muestra por primera vez *in vivo* que las estatinas son agentes antiexcitotóxicos, lo que pone de manifiesto su capacidad protectora frente al síndrome excitotóxico asociado a diferentes enfermedades neurodegenerativas crónicas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, estado epiléptico, enfermedad de Huntington, etc.).

Por tanto, en el presente documento se describe el uso de estatinas como agentes (i) antiepilépticos, (ii) anticonvulsivos, (iii) neuroprotectores, en particular, neuroprotectores frente a enfermedades neurodegenerativas crónicas (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, estado epiléptico, enfermedad de Huntington, etc.), más concretamente, neuroprotectores frente al síndrome excitotóxico asociado a dichas enfermedades neurodegenerativas crónicas, así como neuroprotectores frente a la apoptosis y gliosis reactiva, causada por sustancias excitotóxicas, (iv) antiapoptóticos y (v) antioxidantes en procesos neurodegenerativos o asociados a la edad.

Los resultados obtenidos pueden extrapolarse con fines profilácticos o terapéuticos para su aplicación sobre la población de riesgo. Asimismo, debido a que las estatinas, en general, son compuestos bastante seguros, con un perfil de toxicidad relativamente bajo, su uso como fármaco resulta muy adecuado y no requiere de ensayos clínicos complejos como ocurre con otros fármacos experimentales cuya toxicidad y seguridad se desconoce.

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende simvastatina para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la epilepsia, o crisis epilépticas.

En otro aspecto, la invención se refiere a simvastatina para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la epilepsia, o crisis epilépticas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama de barras que representa el tiempo de latencia en el comienzo de las convulsiones en los animales con diferentes tratamientos. La gráfica muestra el tiempo después de la administración del agente epiléptico en el que aparece la primera convulsión en función del tratamiento.

La Figura 2 es una gráfica de dispersión XY que representa el nivel de gravedad del estado epileptogénico observado según la escala de Racine (Racine, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32[3]:281-94), frente al tiempo después de la inoculación de la sustancia epileptogénica (ácido kaínico o kainato o KA). La gráfica muestra la evolución del estado epileptogénico de los animales según el tratamiento recibido: PBS o simvastatina [SIM].

La Figura 3 es una gráfica de dispersión XY que representa el nivel de gravedad del estado epileptogénico observado según la escala de Racine (Racine, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32[3]:281-94), frente al tiempo después de la inoculación de la sustancia epileptogénica (ácido kaínico o kainato o KA). La gráfica muestra la evolución del estado epileptogénico de los animales según el tratamiento recibido: PBS o DNQX (un antagonista de kainato).

La Figura 4 es una gráfica de dispersión XY que representa el nivel de gravedad del estado epileptogénico observado según la escala de Racine (Racine, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32[3]:281-94), frente al tiempo después de la inoculación de la sustancia epileptogénica (ácido kaínico o kainato o KA). La gráfica muestra la evolución del estado epileptogénico de los animales según la dosis de simvastatina (SIM) administrada durante el tratamiento.

La Figura 5 es una gráfica de dispersión XY que representa el nivel de gravedad del estado epileptogénico observado según la escala de Racine (Racine, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32[3]:281-94), frente al tiempo después de la inoculación de la sustancia epileptogénica (ácido kaínico o kainato o KA). La gráfica muestra la evolución del estado epileptogénico de los animales según la vía de administración de simvastatina (SIM) usada durante el tratamiento.

La Figura 6 es una gráfica de Kaplan-Meier que muestra el índice de supervivencia de los ratones tratados con PBS y con kainato [KA] y su comparación con los ratones tratados con simvastatina [SIM] y con KA.

La Figura 7 es una composición de micrografías que muestra una región del hipocampo teñida con hematoxilina y eosina de ratones tratados con PBS y PBS, ratones tratados con PBS y con kainato [KA] y ratones tratados con

simvastatina [SIM] y con KA.

La Figura 8 es una composición de micrografías que muestra una región del hipocampo teñida con Fluoro Jade B de ratones tratados con PBS y PBS, ratones tratados con PBS y con kainato [KA] y ratones tratados con simvastatina [SIM] y con KA.

- 5 La Figura 9 es una composición de micrografías que muestra una región del hipocampo teñida con naranja de acridina de ratones tratados con PBS y PBS, ratones tratados con PBS y con kainato [KA] y ratones tratados con simvastatina [SIM] y con KA.

- 10 La Figura 10 es una composición de micrografías que muestra una región del hipocampo marcada contra la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) de ratones tratados con PBS y PBS, ratones tratados con PBS y con kainato [KA] y ratones tratados con simvastatina [SIM] y con KA.

La Figura 11 es una composición de micrografías que muestra una región del hipocampo marcada contra HNE de ratones tratados con PBS y PBS, ratones tratados con PBS y con kainato [KA] y ratones tratados con simvastatina [SIM] y con KA.

- 15 La Figura 12 es una gráfica de dispersión XY que representa en nivel de gravedad del estado epileptogénico según la escala de Racine (Racine, Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1972; 32[3]:281-94) frente al tiempo después de la inoculación de la sustancia epileptogénica (ácido káínico o kainato o KA). La gráfica muestra la evolución del estado epileptogénico de los animales según el tratamiento recibido: PBS o lovastatina. Los datos se analizaron estadísticamente por medio de un ensayo ANOVA para la varianza general entre grupos durante la totalidad del tiempo de observación (valor de $p < 0,05$)

20 Descripción detallada de la invención

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención objeto de esta solicitud de patente, a continuación se expone el significado de algunos términos y expresiones usados en el contexto de la invención.

- 25 El término “estatina”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima que cataliza la etapa limitante de la biosíntesis del colesterol, e incluye cualquier estatina tanto natural como sintética o semisintética, conocida o de nueva síntesis o de nuevo diseño o moléculas relacionadas; tal como se usa en el presente documento, el término “moléculas relacionadas” con las estatinas, se refiere a aquellas moléculas con capacidad hipolipemiente (hipocolesterolémica o hipotrigliceridémica). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de estatinas que pueden ser utilizadas en el contexto de la presente invención incluyen atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, una monacolina (por ejemplo, monacolina M, monacolina J, monacolina N, monacolina L, monacolina X, etc.), pitavastatina (también llamada itavastatina), pravastatina, rosuvastatina, simvastatina, etc., así como combinaciones de dos o más estatinas cualesquiera, por ejemplo, monacolinas, por ejemplo, monacolina M, monacolina J, monacolina N, monacolina L, monacolina X, etc.. o cualquier otra combinación de dos o más estatinas cualesquiera. Algunas estatinas pueden presentarse en forma cerrada (lactona) o en forma abierta (hidroxiácido). Los hidroxiácidos (forma abierta) pueden prepararse a partir de las lactonas correspondientes por hidrólisis convencional, por ejemplo, con hidróxido sódico en metanol, hidróxido sódico en tetrahidrofurano-agua y similares.

- 40 En la forma abierta (hidroxiácido), las estatinas reaccionan para formar sales con cationes de metales y aminas, farmacéuticamente aceptables, formadas a partir de bases orgánicas o inorgánicas. El término “farmacéuticamente aceptable” significa que el compuesto es tolerable fisiológicamente y no produce, en general, una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar, tal como un trastorno gástrico, mareo o similares, cuando se administra a un sujeto; preferentemente, dicho término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno o recogido en la farmacopea estadounidense o en otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales (por ejemplo, farmacopea europea, etc.). El término “sal metálica farmacéuticamente aceptable” contempla sales formadas con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, hierro y cinc. El término “sal de amina farmacéuticamente aceptable” contempla sales con amonio y bases nitrogenadas orgánicas suficientemente fuertes para formar sales con ácidos carboxílicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de las estatinas pueden diferir de los ácidos libres correspondientes en algunas características físicas tales como solubilidad y punto de fusión, pero se consideran equivalentes a la forma de ácido libre para los fines de la presente invención. La forma abierta (hidroxiácido) libre de las estatinas puede regenerarse a partir de la forma de sal, si se desea, poniendo en contacto la sal con una solución acuosa diluida de un ácido tal como ácido clorhídrico y similares.

- 55 La forma cerrada (lactona) de las estatinas puede regenerarse por disolución de la forma abierta (hidroxiácido) en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, tolueno, benceno, acetato de etilo y similares, a temperaturas comprendidas entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente el punto de ebullición del disolvente, típicamente (aunque no necesariamente) con separación simultánea del agua resultante y catálisis con ácidos fuertes, por ejemplo, ácido clorhídrico y similares.

Asimismo, las estatinas pueden existir en forma solvatada o no solvatada y tales formas son equivalentes a la forma no solvatada para los fines de la presente invención.

En consecuencia, tanto las formas cerradas (lactonas) como abiertas (hidroxiácidos) de las estatinas, bien en forma de ácido libre o de sal farmacéuticamente aceptable, solvatadas o no solvatadas, entran dentro del ámbito de la definición de estatina tal como se usa en la presente descripción.

El término “epilepsia”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un síndrome cerebral crónico de causas diversas, caracterizada por crisis recurrentes debidas a unas descargas excesivas hipersincrónicas de impulsos nerviosos por las neuronas cerebrales, asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas. Las crisis pueden ser convulsivas o no convulsivas. La epilepsia puede tener muchas causas; en unos casos puede ser debida a lesiones cerebrales de distintos tipos (por ejemplo, traumatismos craneales, secuelas de meningitis, tumores, etc.); en otros casos no hay ninguna lesión sino una predisposición de origen genético a padecer la crisis; en otros casos, la etiología de la epilepsia puede ser ambiental, por tratamientos farmacológicos, por excitotoxicidad, traumatismo, procesos de estrés, envejecimiento, problemas del desarrollo, enfermedades neurológicas, crisis psicológicas, problemas en la gestación, problemas en el parto, etc.

El término “epiléptico o convulsivo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier crisis epiléptica o convulsión de cualquier etiología, por ejemplo, genética, ambiental, por tratamientos farmacológicos, por excitotoxicidad, por traumatismo, por procesos de estrés, por envejecimiento, por problemas del desarrollo, por enfermedades neurológicas, por crisis psicológicas, por problemas en la gestación, por problemas en el parto, etc. Una crisis epiléptica ocurre cuando una actividad anormal eléctrica en el cerebro causa un cambio involuntario de movimiento o función del cuerpo, de sensación, en la capacidad de estar alerta o de comportamiento, y pueden ser parciales o generalizadas (convulsivas o no convulsivas).

El término “antiepiléptico o anticonvulsivo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la atenuación de las crisis epilépticas o convulsivas, por ejemplo, en la duración y/o en la intensidad, o a la desaparición de las crisis epilépticas o convulsivas, o a la disminución o desaparición de sus efectos secundarios.

La expresión “enfermedad neurodegenerativa”, tal como se usa en el presente documento, incluye enfermedades que son consecuencia de la degeneración o deterioro del tejido nervioso, en particular de las neuronas, que conducen, a lo largo del tiempo, a una disfunción o a una incapacidad; el término degeneración incluye pérdida de la viabilidad celular, pérdida de la función celular y/o pérdida del número de células (neuronas y otras). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de enfermedades neurodegenerativas incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, etc. En una realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad relacionada con la muerte neuronal causada por una sustancia excitotóxica, por ejemplo, con la muerte neuronal en el hipocampo causada por una sustancia excitotóxica.

El término “neuroprotector”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la atenuación de los efectos de la degeneración o muerte neuronal mediante cualquier mecanismo conocido o por conocer, por ejemplo necrosis, apoptosis, autofagia, lesión oxidativa, deposición de subproductos, pérdida de la arquitectura celular, etc., o a la desaparición de los efectos de la degeneración o muerte neuronal mediante cualquier mecanismo conocido o por conocer por ejemplo, necrosis, apoptosis, autofagia, lesión oxidativa, deposición de subproductos, pérdida de la arquitectura celular, etc., o a la disminución o desaparición de sus efectos secundarios.

La expresión “enfermedad asociada con una oxidación indeseada”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad causada por una oxidación indeseada (por ejemplo, excesiva) o en el que dicha oxidación indeseada es un síntoma. Dicha oxidación indeseada puede ser la consecuencia del daño causado por radicales libres a proteínas, ADN y/o lípidos independientemente del radical libre específico implicado o de la diana. La oxidación indeseada implica una generación excesiva de radicales libres que puede causar una disfunción en células, tejidos u órganos y puede constituir, por tanto, un mecanismo potencial de una enfermedad. En una realización particular, dicha oxidación indeseada puede ser causada por la edad (envejecimiento) o por un proceso neurodegenerativo y puede provocar por sí sola o en combinación con otros factores el comienzo de diversas enfermedades. Dicha oxidación indeseada puede relacionarse con la lesión oxidativa por peroxidación lipídica causada por una sustancia excitotóxica.

El término “sujeto”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un miembro de una especie de mamífero, e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y humanos; preferentemente, el sujeto es un ser humano, varón o mujer, de cualquier edad o raza. En una realización particular, dicho sujeto es un mamífero que padece, o es susceptible de padecer, epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, o una enfermedad neurodegenerativa, tal como una enfermedad neurodegenerativa crónica.

Nuevos usos terapéuticos de las estatinas

La invención se refiere al uso de una estatina en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de:

- a) epilepsia,
- b) crisis epilépticas,
- c) convulsiones,
- d) enfermedades neurodegenerativas, o
- 5 e) enfermedades asociadas con una oxidación indeseada.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende simvastatina para su uso en la prevención y/o el tratamiento de:

- a) epilepsia, o
- b) crisis epilépticas.

10 Prácticamente puede usarse cualquier estatina, tanto natural como sintética o semisintética, conocida o de nueva síntesis o de nuevo diseño o una molécula relacionada. En el presente documento se describe tanto el uso de una única estatina como de una mezcla de dos o más estatinas. Dicha estatina puede seleccionarse del grupo que consiste en atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, monacolina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina, sus sales farmacéuticamente aceptables y sus mezclas. Por simplicidad, el

15 término "monacolina" se refiere a cualquiera de las monacolininas (monacolina M, monacolina J, monacolina N, monacolina L, monacolina X, etc.) aisladas así como a las mezclas de dos o más de dichas monacolininas. Según la presente invención, dicha estatina es la simvastatina.

Las estatinas previamente mencionadas son compuestos conocidos, disponibles comercialmente, o bien pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales, por ejemplo mediante fermentación (por ejemplo, lovastatina, mevastatina, pravastatina, simvastatina, etc.) o mediante síntesis (por ejemplo, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, pitavastatina, rosuvastatina, etc.), tal como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 409281, EP 325130, WO 84/02131, US 4231938, US 3983140, US 4346227 y EP 33538.

Numerosos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto tanto el efecto antiepiléptico de una estatina (por ejemplo, simvastatina, lovastatina) frente a la acción de una sustancia excitotóxica, así como su efecto neuroprotector en las neuronas del hipocampo, y su efecto antioxidante en regiones de la corteza cerebral ya que previene la lesión oxidativa por peroxidación lipídica debida a la acción de una sustancia excitotóxica.

El efecto antiepiléptico de la simvastatina frente a la acción de una sustancia excitotóxica (kainato) se describe en los Ejemplos 1-3. En dichos ejemplos, se observó que el periodo de tiempo en el que aparecía la primera convulsión (latencia) en los animales a los que se les había administrado la sustancia excitotóxica y la estatina (simvastatina) era mayor que en el resto de tratamientos (Figura 1), lo que demuestra el efecto antiepiléptico o anticonvulsivo de dicha estatina. Asimismo, el efecto antiepiléptico de lovastatina frente a la acción de kainato se describe en el Ejemplo comparativo 10 y en la Figura 12, en la que puede observarse que después de la inoculación de kainato hubo un aumento de niveles de epilepsia hasta 50-60 m.p.i. y, después de este periodo, se observó una reducción progresiva de la gravedad de los síntomas del grupo tratado con lovastatina, a diferencia del grupo al que se había administrado PBS, en el que los niveles epilépticos continuaron aumentando hasta 90 m.p.i. El tratamiento con lovastatina redujo completamente los síntomas de epilepsia causados por KA la final del periodo de observación, mientras que el grupo de PBS + KA mantenía niveles de aproximadamente 3 al final del experimento.

Asimismo, como es conocido, la gravedad de las convulsiones y el efecto en cadena de la excitotoxicidad induce, en algunos casos, la muerte del animal; por este motivo, los inventores analizaron si el efecto antiepiléptico de la estatina (por ejemplo, simvastatina) se veía acompañado por una reducción de la mortalidad producida por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 4). En los resultados obtenidos (Figura 6) se observa un mayor índice de supervivencia en los ratones tratados con simvastatina respecto a los tratados con PBS, lo que indica que el tratamiento con dicha estatina (simvastatina) protege a los animales de la muerte debida a las convulsiones y al resto de efectos orgánicos producidos por una sustancia excitotóxica.

Dado que la gravedad en los síntomas epilépticos tiene una correlación directa con la muerte neuronal y la desestructuración de regiones específicas, por ejemplo, el hipocampo, los inventores analizaron si el efecto antiepiléptico y protector de dicha estatina (simvastatina) iba acompañado de una reducción de esos efectos a nivel celular producidos por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 5). Los resultados obtenidos (Figura 7) muestran que tanto en el grupo de animales tratados con PBS y KA (PBS+KA) como en el grupo de animales tratados con dicha estatina (simvastatina) y KA (SIM+KA) existen evidencias de muerte neuronal en el hipocampo; sin embargo, en el grupo de animales tratados con simvastatina dichas evidencias están restringidas a una región concreta (región CA2) mientras que en el grupo de animales tratados con placebo (PBS) se observa una desestructuración del hipocampo más general, observándose evidencias de muerte neuronal en varias regiones: CA1, CA2, CA3 y giro dentado. Estos resultados pusieron de manifiesto el efecto protector (capacidad para minimizar los efectos del daño neuronal) de dicha estatina (simvastatina) frente a la muerte neuronal en el hipocampo causada por una sustancia

excitotóxica.

Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector de la simvastatina, los inventores analizaron con más detalle el proceso neurodegenerativo que se estaba produciendo en las neuronas del hipocampo y el efecto que sobre el mismo tenía el tratamiento con dicha estatina (Ejemplo 6). Los resultados obtenidos (Figura 8) ilustran que el tratamiento con simvastatina (SIM+KA) reduce cualitativamente el número de neuronas del hipocampo que se encuentran en degeneración, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicha estatina (simvastatina) frente a la neurodegeneración causada por una sustancia excitotóxica.

Asimismo, con el fin de analizar la capacidad protectora de la simvastatina frente a la muerte por apoptosis, los inventores analizaron el efecto ejercido por el tratamiento con una estatina (simvastatina) sobre la muerte neuronal por apoptosis en las neuronas del hipocampo producida por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 7). Los resultados obtenidos (Figura 9) ponen de manifiesto que el tratamiento con simvastatina reduce cualitativamente el número de neuronas en apoptosis y que el marcaje positivo para apoptosis en el grupo de animales tratados con simvastatina (SIM+KA) se restringe exclusivamente a la región CA2 del hipocampo, mientras que en otros grupos de animales se observa un mayor número de neuronas en apoptosis en las regiones CA1, CA2, CA3 y giro dentado, comprobándose de ese modo la capacidad protectora de dicha estatina (simvastatina) frente a la muerte neuronal por apoptosis producida por la administración de una sustancia excitotóxica.

Además, con el objetivo de determinar si la capacidad protectora de dicha estatina (simvastatina) tenía un efecto global, los inventores analizaron otras marcas histopatológicas que indican una lesión neuronal, en concreto, la gliosis reactiva producida en el hipocampo por una sustancia excitotóxica y el efecto que en ella tenía el tratamiento con dicha estatina (Ejemplo 8). Los resultados obtenidos (Figura 10) muestran que el tratamiento con dicha estatina (simvastatina) reduce de manera cualitativa la activación astrocítica en la región del neuropilo del hipocampo así como la presencia de astrocitos en esa región del hipocampo, lo que demuestra, en combinación con los resultados anteriores, la capacidad neuroprotectora de dicha estatina (simvastatina) ante los efectos de la administración de una sustancia excitotóxica.

Finalmente, con el objetivo de determinar si la capacidad neuroprotectora de las estatinas (por ejemplo, simvastatina) también incluía un efecto antioxidante, los inventores analizaron el efecto que tenía el tratamiento con dicha estatina (simvastatina) en la peroxidación lipídica inducida por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 9). Los resultados obtenidos (Figura 11) ilustran que el tratamiento con dicha estatina (simvastatina) reduce de manera cualitativa el número de neuronas marcadas y la intensidad de la señal de HNE, lo que pone de manifiesto que dicha estatina (simvastatina), además de un efecto neuroprotector en las neuronas del hipocampo, tiene un efecto antioxidante en regiones de la corteza cerebral ya que previene la lesión oxidativa por peroxidación lipídica debida a la acción de una sustancia excitotóxica.

Para su administración en la prevención y/o tratamiento de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada, la estatina se formulará en una composición farmacéutica, en una cantidad terapéuticamente efectiva, junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica proporcionada por la presente invención puede contener una o más estatinas diferentes junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, dicha composición farmacéutica comprende una única estatina. En otra realización particular, dicha composición farmacéutica comprende dos o más estatinas. Dicha composición farmacéutica es útil para el tratamiento de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada.

Las composiciones farmacéuticas que contienen una estatina, proporcionadas por la presente invención, pueden formularse en cualquier forma farmacéutica de administración adecuada para su administración por la vía de administración elegida, por ejemplo, oral, parenteral (subcutánea, intramuscular, intravenosa, vía intraperitoneal, etc.), tópica, vía rectal, etc. A modo ilustrativo, no limitante, las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención pueden formularse en una forma farmacéutica sólida de administración por vía oral (por ejemplo, gránulos, comprimidos, cápsulas, etc.), en una forma farmacéutica líquida de administración por vía oral (por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.), en una forma farmacéutica para su administración por vía parenteral (por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). Para ello, en cada caso, se elegirán los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para la forma farmacéutica de administración y vía de administración elegida, por ejemplo, agentes aglutinantes, diluyentes, agentes disgregantes, lubricantes, humectantes, etc., para la formulación de formas farmacéuticas de administración sólidas, y tampones, tensioactivos, etc., para la formulación de formas farmacéuticas de administración líquidas. Dichos vehículos y excipientes deben ser farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente tolerables y han de poder combinarse con otros componentes de la formulación sin ejercer ningún efecto adverso sobre el sujeto tratado. Información sobre dichos vehículos y excipientes, así como sobre dichas formas farmacéuticas de administración de dicho principio activo puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos, en general, y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de

Ediciones.

La composición farmacéutica proporcionada por la presente invención comprende, al menos, una estatina en una cantidad terapéuticamente eficiente. En el sentido usado en la presente descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente eficiente” se refiere a la cantidad de estatina calculada para producir el efecto deseado. La dosis de estatina que se va a administrar a un sujeto puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo de numerosos factores, entre los que se incluyen las características de la estatina usada, por ejemplo, su actividad y vida media biológica, la concentración de la estatina en la composición farmacéutica, la situación clínica del sujeto, la gravedad de la patología, la forma farmacéutica de administración elegida, etc. La composición farmacéutica proporcionada por la presente invención se puede administrar una o más veces al día con fines preventivos o terapéuticos o con otras pautas de administración, no necesariamente diaria sino también de forma puntual, semanal, etc.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención, si se desea, puede usarse junto con otros fármacos, por ejemplo, fármacos útiles en el tratamiento de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada, con el fin de aumentar la eficacia de la composición farmacéutica proporcionada por la presente invención, generándose de este modo una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden facilitarse como una composición farmacéutica separada para su administración al mismo tiempo (administración simultánea) que la composición farmacéutica proporcionada por esta invención o en momentos diferentes (administración secuencial) respecto a la administración de la composición farmacéutica proporcionada por la presente invención.

También se describe en el presente documento una estatina para el tratamiento y/o la prevención de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada. Las características de la estatina así como las de dichas enfermedades ya se han mencionado anteriormente.

En otro aspecto, la invención se refiere a simvastatina para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la epilepsia o de crisis epilépticas. Las características de la estatina así como las de dichas enfermedades ya se han mencionado anteriormente.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben considerarse como limitantes de la misma.

EJEMPLO 1

Efecto antiepiléptico de la simvastatina frente a la acción de una sustancia excitotóxica

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N [Taconic Farms, Inc. (www.taconic.com)]. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las normas “*Guidance on the Operation of Animals*” (*Scientific Procedures, Act. 1986*). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

A los animales, repartidos en distintos grupos, se les inocularon por vía intraperitoneal 30 mg/kg de kainato (KA) disuelto en tampón fosfato salino (PBS), de acuerdo con el siguiente protocolo:

- siete animales se pretrataron a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección intraperitoneal (i.p.);

- seis animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p.; y

- cuatro animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con DNQX (un inhibidor específico de los receptores de KA) a una dosis de 30 mg/kg, mediante inyección i.p.

Tras la inoculación de KA los animales se alojaron en cubetas de manera individual para su seguimiento. Durante la observación se registró el nivel máximo de epilepsia de los animales según la escala Racine cada 10 minutos y durante al menos 120 minutos después de la inoculación (m.p.i.).

Subsiguientemente se realizaron estudios comparativos en los niveles de epilepsia entre el tratamiento con PBS, con simvastatina o con DNQX. Se observaron diferencias en el tiempo en el que aparecía la primera convulsión (latencia), que era mayor en el caso del tratamiento con simvastatina ($50,0 \pm 11,8$ min) que en el resto de tratamientos (PBS: $38,6 \pm 4,0$ min; DNQX: $23,3 \pm 7,6$ min) tal como se muestra en la Figura 1, lo que demuestra un efecto antiepiléptico o anticonvulsivo de la simvastatina.

A partir de 30 m.p.i. se observa que en el tratamiento con PBS los niveles de epilepsia superaron el nivel 4 de la escala Racine, que marca la aparición de convulsiones graves (Figura 2). La aparición de episodios convulsivos graves ocurre fundamentalmente en el periodo comprendido entre 40 y 80 m.p.i. El tratamiento con simvastatina

estabilizó los niveles epileptogénicos después de 30 m.p.i. no superando un valor medio de 4 y estando por debajo respecto al tratamiento con PBS en todos los puntos temporales de la observación, lo que demuestra un efecto antiepiléptico o anticonvulsivo de la simvastatina. La disminución de los niveles de epilepsia con el tratamiento con simvastatina es mayor precisamente en el periodo de mayor gravedad de los episodios convulsivos entre 40 y 80 m.p.i. tal como se puede observar en la Figura 2.

Con el objetivo de validar las observaciones realizadas en el efecto antiepiléptico de la simvastatina se comparó el nivel de epilepsia entre ratones tratados con PBS frente a DNQX (un conocido antagonista de los receptores de KA). En la Figura 3 se observa que el tratamiento con DNQX evita el aumento de los niveles epilépticos después de 30 m.p.i. de KA, mostrando, de manera similar a la simvastatina, un efecto mayor durante el periodo de mayor gravedad de los episodios convulsivos que se presentan entre 40 y 80 m.p.i.

EJEMPLO 2

Dependencia de la dosis en el efecto antiepiléptico de la simvastatina

El Ejemplo 1 muestra que el tratamiento con simvastatina tiene un efecto antiepiléptico frente a una agresión excitotóxica. Basándose en estos resultados los inventores decidieron estudiar la implicación de la dosis de simvastatina en su efecto antiepiléptico.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y se trataron con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

A los animales, repartidos en distintos grupos, se les inocularon por vía intraperitoneal 25 mg/kg de KA disuelto en PBS, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- tres animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 10 mg/kg mediante inyección i.p.; y
- dos animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg, mediante inyección i.p.

Tras la inoculación de KA los animales se alojaron en cubetas de manera individual para su seguimiento. Durante la observación se registró el nivel máximo de epilepsia de los animales según la escala Racine cada 10 minutos y durante al menos 120 m.p.i.

Se observa, de manera general, un menor nivel de epilepsia en los ratones tratados con 50 mg/kg de simvastatina frente a los tratados con 10 mg/kg de simvastatina durante el periodo de observación (Figura 4). De forma destacada, se observa una drástica diferencia a partir de los 60 m.p.i. lo que pone de manifiesto que el uso de una dosis mayor de simvastatina produce un menor índice de epilepsia y favorece la recuperación de los animales de manera más rápida que las dosis bajas. Con estos resultados se pone de manifiesto la dependencia de la dosis en el efecto antiepiléptico de la simvastatina.

EJEMPLO 3

Efecto de la vía de administración en el efecto antiepiléptico de la simvastatina

Como muestran los Ejemplos 1 y 2, la simvastatina tiene propiedades antiepilépticas y éstas dependen de la dosis en la que se administre dicho compuesto. Debido a estas observaciones los inventores decidieron averiguar si el efecto antiepiléptico de la simvastatina vendría modulado también por la vía de administración.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y se trataron con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

A los animales, repartidos en distintos grupos, se les inocularon por vía intraperitoneal 25 mg/kg de KA disuelto en PBS, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- tres animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante administración oral directa; y
- dos animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p.

Tras la inoculación de KA los animales se alojaron en cubetas de manera individual para su seguimiento. Durante la observación se registró el nivel máximo de epilepsia de los animales según la escala Racine cada 10 minutos y durante al menos 120 m.p.i.

Se observa, de manera general, una disminución de los niveles de epilepsia a partir de los 40 m.p.i. en ambos grupos de animales (Figura 5). Este resultado pone de manifiesto la eficiencia de la simvastatina como antiepiléptico mediante ambos tipos de administración. También se observa que mediante la inyección i.p. la disminución de la gravedad en los episodios convulsivos es más rápida que mediante la administración oral directa. En la Figura 5 se puede observar cómo la administración i.p. disminuye los niveles epilépticos al nivel 2 en la escala de Racine a los 70 m.p.i. y a nivel 1 en la escala de Racine a los 120 m.p.i., mientras que la administración oral no llega al nivel 2 en la escala de Racine hasta los 100 m.p.i. y mantiene ese nivel hasta los 120 m.p.i. Estos resultados ponen de manifiesto que la vía de administración influye en la eficiencia de la simvastatina como compuesto antiepiléptico.

EJEMPLO 4

Efecto protector de la simvastatina frente a la muerte causada por una sustancia excitotóxica

Como muestran los Ejemplos 1, 2 y 3, la simvastatina tiene propiedades antiepilépticas y anticonvulsivas. La gravedad de las convulsiones y el efecto en cadena de la excitotoxicidad induce, en algunos casos, la muerte del animal. Debido a esto los inventores decidieron averiguar si el efecto antiepiléptico de la simvastatina se veía acompañado de una reducción de la mortalidad producida por una sustancia excitotóxica.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y se trataron con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

A los animales, repartidos en distintos grupos, se les inocularon por vía intraperitoneal 30 mg/kg de KA disuelto en PBS, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- siete animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, se trataron diariamente con PBS hasta 7 días post-inoculación (d.p.i.); y
- seis animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, se trataron diariamente con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg hasta 7 d.p.i.

Tras la inoculación de KA y, una vez dado por concluido el periodo de observación tras 150 m.p.i. del KA, los animales se alojaron en cubetas individuales para su tratamiento con PBS, o con una dosis de 50 mg/kg de una suspensión de simvastatina en PBS, durante el periodo de 7 d.p.i. En ese periodo de tiempo se registraron los óbitos.

En la Figura 6 se muestran los resultados mediante una curva de supervivencia. En esa figura se observa un índice de supervivencia mayor en los ratones que se trataron con simvastatina respecto a los que se trataron con PBS. Estos resultados de mortalidad indican que el tratamiento con simvastatina protegió a los animales de la muerte debida a las convulsiones y al resto de efectos orgánicos producidos por una sustancia excitotóxica.

EJEMPLO 5

Efecto protector de la simvastatina frente a la muerte neuronal en el hipocampo causada por una sustancia excitotóxica

Como muestran los Ejemplos 1, 2 y 3, la simvastatina tiene propiedades antiepilépticas. Además, como muestra el Ejemplo 4, la simvastatina reduce la mortalidad debida al efecto de una sustancia excitotóxica. Por otra parte, la gravedad en los síntomas epilépticos tiene una correlación directa con la muerte neuronal y desestructuración de regiones específicas (por ejemplo, el hipocampo). Debido a esto los inventores decidieron averiguar si el efecto antiepiléptico y protector de la simvastatina se veía acompañado de una reducción de estos efectos a nivel celular producidos por una sustancia excitotóxica.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y se trataron con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

A los animales, repartidos en distintos grupos, se les inoculó por vía intraperitoneal 30 mg/kg de KA disuelto en PBS, o PBS (control), de acuerdo con el siguiente protocolo:

- siete animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, se trataron diariamente con PBS hasta 7 d.p.i.;
- 5 - seis animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, se trataron diariamente con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg, hasta 7 d.p.i.; y
- a cinco animales se inoculó PBS (en lugar de KA) mediante inyección i.p., y se pretrataron con PBS, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con PBS, mediante inyección i.p., y, posteriormente, se trataron diariamente con PBS hasta 7 días d.p.i.
- 10 Tras la inoculación de KA (o de PBS), los animales se alojaron en cubetas individuales para su tratamiento con PBS o con una dosis de 50 mg/kg de una suspensión de simvastatina en PBS durante un periodo de 7 días. Una vez concluido ese periodo de tiempo de 7 días de tratamiento, los animales se sacrificaron y sus encéfalos se diseccionaron. Las muestras de encéfalo se procesaron y se incluyeron en parafina. Para el análisis de la arquitectura celular del hipocampo se usó la tinción con hematoxilina y eosina en cortes de 5 µm de grosor.
- 15 En la Figura 7 se muestran los focos de muerte celular en los que se localizan los núcleos necróticos (puntos pequeños de coloración intensa) y/o las células en degeneración (núcleos picnóticos de tamaño más reducido al normal y de color más intenso). Tanto en el grupo de animales tratados con PBS y KA (PBS+KA) como en el grupo de animales tratados con simvastatina y KA (SIM+KA) existen evidencias de muerte neuronal en el hipocampo. La diferencia fundamental estribó en que las zonas afectadas en el grupo de animales tratados con simvastatina están restringidas a la región CA2 mientras que el grupo de animales tratados con PBS muestra una desestructuración del
- 20 hipocampo más general, observándose evidencias de muerte neuronal en CA1, CA2, CA3 y giro dentado. Estos resultados pusieron de manifiesto la capacidad de la simvastatina para minimizar los efectos del daño neuronal causado por una sustancia excitotóxica.

EJEMPLO 6

25 **Efecto neuroprotector de la simvastatina frente a la neurodegeneración causada por una sustancia excitotóxica**

Como muestra el Ejemplo 5, la simvastatina previene la desestructuración y la muerte neuronal en el hipocampo por efecto de una sustancia neurotóxica. Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector que se apreciaba en el Ejemplo 5, los inventores decidieron estudiar el proceso neurodegenerativo que se estaba produciendo en las

30 neuronas del hipocampo y el efecto que sobre el mismo tenía el tratamiento con simvastatina.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

35

A los animales, repartidos en distintos grupos, se inocularon por vía intraperitoneal 30 mg/kg de KA disuelto en PBS, o PBS (control), de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 40 - siete animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, se trataron diariamente con PBS hasta 7 d.p.i.;
- seis animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, se trataron diariamente con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg, hasta 7 d.p.i.; y
- 45 - a cinco animales se inoculó PBS (en lugar de KA) mediante inyección i.p., y se pretrataron con PBS, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con PBS, mediante inyección i.p., y, posteriormente, se trataron diariamente con PBS hasta 7 días d.p.i.

Tras la inoculación de KA (o de PBS), los animales se alojaron en cubetas individuales para su tratamiento con PBS o con una dosis de 50 mg/kg de una suspensión de simvastatina en PBS durante un periodo de 7 días. Una vez concluido ese periodo de tiempo de 7 días de tratamiento, los animales se sacrificaron y sus encéfalos se diseccionaron. Las muestras de encéfalo se procesaron y se incluyeron en parafina. Para el análisis de la neurodegeneración del hipocampo se usó la tinción fluorescente de Fluoro Jade B en cortes de 5 µm de grosor. Esta tinción tiñe las neuronas que se encuentran en un proceso degenerativo.

50

En la Figura 8 se observa que el tratamiento con simvastatina (SIM+KA) reduce cualitativamente el número de neuronas del hipocampo que se encuentran en degeneración y la intensidad del marcaje con Fluoro Jade B. Estos

resultados pusieron de manifiesto la capacidad neuroprotectora de la simvastatina ante la acción de una sustancia excitotóxica.

EJEMPLO 7

Efecto neuroprotector de la simvastatina frente a la apoptosis causada por una sustancia excitotóxica

- 5 Como muestran los Ejemplos 5 y 6, la simvastatina tiene un efecto neuroprotector en el hipocampo ante el efecto de una sustancia neurotóxica. Con el objetivo de determinar la capacidad protectora de la simvastatina ante la muerte por apoptosis, los inventores decidieron estudiar el efecto que tenía el tratamiento con simvastatina en la muerte neuronal por apoptosis en las neuronas del hipocampo producida por una sustancia excitotóxica.
- 10 Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y se trataron con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.
- 15 A los animales, repartidos en distintos grupos, se les inocularon por vía intraperitoneal 30 mg/kg de KA disuelto en PBS, o PBS (control), de acuerdo con el siguiente protocolo:
- siete animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, se trataron diariamente con PBS hasta 7 d.p.i.;
 - 20 - seis animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, se trataron diariamente con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg, hasta 7 d.p.i.; y
 - a cinco animales se inoculó PBS (en lugar de KA) mediante inyección i.p., y se pretrataron con PBS, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con PBS, mediante inyección i.p., y, posteriormente, se trataron diariamente con PBS hasta 7 días d.p.i.
- 25 Tras la inoculación de KA (o de PBS), los animales se alojaron en cubetas individuales para su tratamiento con PBS o con una dosis de 50 mg/kg de una suspensión de simvastatina en PBS durante un periodo de 7 días. Una vez concluido ese periodo de tiempo de 7 días de tratamiento, los animales se sacrificaron y sus encéfalos se diseccionaron. Las muestras de encéfalo se procesaron y se incluyeron en parafina. Para el análisis de la muerte neuronal por apoptosis en el hipocampo se usó la tinción fluorescente de Naranja de Acridina en cortes de 5 µm de
- 30 grosor. Esta tinción tiñe el ADN de cadena simple que se produce como consecuencia del proceso apoptótico.
- En la Figura 9 se observa que el tratamiento con simvastatina reduce cualitativamente el número de neuronas en apoptosis. Además el marcaje positivo para apoptosis en el grupo de animales tratados con simvastatina (SIM+KA) se restringe exclusivamente a la región CA2 del hipocampo. Sin embargo, el grupo de animales tratados con PBS (PBS+KA) muestra de manera más numerosa neuronas en apoptosis en las regiones CA1, CA2, CA3 y giro dentado. Estos resultados demostraron la capacidad de protección de la simvastatina ante la muerte neuronal por apoptosis producida por la administración de una sustancia excitotóxica.
- 35

EJEMPLO 8

Efecto neuroprotector de la simvastatina frente a la gliosis reactiva causada por una sustancia excitotóxica

- 40 Como muestran los Ejemplos 5, 6 y 7, la simvastatina tiene un efecto neuroprotector directo en la neurodegeneración y en la muerte neuronal en el hipocampo ante el efecto de una sustancia neurotóxica. Con el objetivo de determinar si la capacidad protectora de la simvastatina tenía un efecto global, los inventores decidieron estudiar otras marcas histopatológicas que indican un daño neuronal. Para ello, se analizó la gliosis reactiva producida en el hipocampo por una sustancia excitotóxica y el efecto que en ella tenía el tratamiento con simvastatina.
- 45 Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y se trataron con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.
- 50 A los animales, repartidos en distintos grupos, se les inocularon por vía intraperitoneal 30 mg/kg de KA disuelto en PBS, o PBS (control), de acuerdo con el siguiente protocolo:
- siete animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, se trataron diariamente con PBS hasta 7

d.p.i.;

- seis animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras inoculación con KA, se trataron diariamente con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg, hasta 7 d.p.i.; y

- 5 - a cinco animales se inoculó PBS (en lugar de KA) mediante inyección i.p., y se pretrataron con PBS, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con PBS, mediante inyección i.p., y, posteriormente, se trataron diariamente con PBS hasta 7 días d.p.i.

Tras la inoculación con KA (o con PBS), los animales se alojaron en cubetas individuales para su tratamiento con PBS o con una dosis de 50 mg/kg de una suspensión de simvastatina en PBS durante un periodo de 7 días. Una vez concluido ese periodo de tiempo de 7 días de tratamiento, los animales se sacrificaron y sus encéfalos se diseccionaron. Las muestras de encéfalo se procesaron y se incluyeron en parafina. Para el análisis de la gliosis reactiva en el hipocampo se utilizó la inmunohistoquímica de fluorescencia contra la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP). Mediante esta técnica se detecta la activación de los astrocitos los cuales muestran una mayor intensidad del marcaje de esta proteína y aumentan en número como respuesta a la lesión neuronal.

15 En la Figura 10 se observa que la administración de una sustancia excitotóxica y el tratamiento con PBS produce una activación astrocítica en la región del neuropilo del hipocampo (PBS+KA). Sin embargo, el tratamiento con simvastatina reduce de manera cualitativa esta activación y la presencia de astrocitos en esta región del hipocampo (SIM+KA). Estos resultados junto con los obtenidos en los Ejemplos 5, 6 y 7 demuestran la capacidad neuroprotectora de la simvastatina ante los efectos de la administración de una sustancia excitotóxica.

20 EJEMPLO 9

Efecto antioxidante de la simvastatina frente a la peroxidación lipídica causada por una sustancia excitotóxica

Con el objetivo de determinar si la capacidad neuroprotectora de la simvastatina también incluía un efecto antioxidante, los inventores decidieron estudiar el efecto que tenía el tratamiento con simvastatina en la peroxidación lipídica inducida por una sustancia excitotóxica.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y se trataron con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

A los animales, repartidos en distintos grupos, se les inoculó por vía intraperitoneal 30 mg/kg de KA disuelto en PBS, o PBS (control), de acuerdo con el siguiente protocolo:

35 - siete animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, se trataron de forma diaria con PBS hasta 7 d.p.i.;

- seis animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras inoculación con KA, se trataron diariamente con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg, hasta 7 d.p.i.; y

40 - a cinco animales se les inoculó PBS (en lugar de KA) mediante inyección i.p., y se trataron con PBS, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con PBS, mediante inyección i.p., y, posteriormente, se trataron de forma diaria con PBS hasta 7 días d.p.i.

Tras la inoculación con KA (o con PBS), los animales se alojaron en cubetas individuales para su tratamiento con PBS o con una dosis de 50 mg/kg de una suspensión de simvastatina en PBS durante un periodo de 7 días. Una vez concluido ese periodo de tiempo de 7 días de tratamiento, los animales se sacrificaron y sus encéfalos se diseccionaron. Las muestras de encéfalo se procesaron y se incluyeron en parafina. Para el análisis de la peroxidación lipídica se usó la inmunohistoquímica de campo claro con el 4-hidroxinonenal (HNE), que permite detectar los aductos de *Michael* producidos por este tipo de lesión oxidativa.

En la Figura 11 se observa que la administración de una sustancia excitotóxica (KA) y el tratamiento con PBS muestra un marcaje de HNE en neuronas piramidales de la región del córtex motor (PBS+KA). Sin embargo, el tratamiento con simvastatina reduce de manera cualitativa el número de neuronas marcadas y la intensidad de la señal de HNE (SIM+KA). Estos resultados muestran que la simvastatina, además de un efecto neuroprotector en las neuronas del hipocampo, tiene un efecto antioxidante en regiones de la corteza cerebral ya que previene la lesión oxidativa por peroxidación lipídica debida a la acción de una sustancia excitotóxica.

EJEMPLO COMPARATIVO 10

Efecto antiepiléptico de la lovastatina frente a la acción de una sustancia excitotóxica

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 12 semanas de edad y de la cepa FVB/N (Taconic Farms, Inc. (www.taconic.com)). Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y se trataron con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

A los ratones, repartidos en distintos grupos, se les inoculó por vía intraperitoneal 25 mg/kg de KA disuelto en PBS, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- cinco animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección i.p.; y

- cinco animales se pretrataron, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con lovastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p.;

Tras la inoculación con KA, los ratones se alojaron en cubetas individuales para su observación. Los niveles máximos de epilepsia de los animales se registraron durante la observación según la escala de Racine cada 10 minutos y durante al menos 120 minutos después de la inoculación (m.p.i.).

Los estudios comparativos de los niveles de epilepsia entre el tratamiento con PBS y con lovastatina (Figura 12) se realizaron subsiguientemente. Después de la inoculación de KA, hubo un aumento de los niveles de epilepsia hasta el periodo de 50-60 m.p.i., en el que empezó a suceder el primer episodio convulsivo en ambos grupos de ratones. Después de ese periodo, se observó una disminución progresiva en la gravedad de los síntomas del grupo tratado con lovastatina, a diferencia del grupo al que se le había administrado PBS, en el que los niveles epilépticos continuaron aumentando hasta 90 m.p.i. El tratamiento con lovastatina redujo completamente los síntomas de epilepsia provocados por KA al final del periodo de observación, mientras que el grupo PBS+KA mantenía niveles de aproximadamente 3 al final del experimento. La diferencia entre ambas cinéticas de síntomas fue estadísticamente significativa (análisis de varianza: $F(1,28) = 14,97$; valor de $p = 0,00059$)

Se observaron adicionalmente diferencias entre los tratamientos en el acceso al estado epiléptico, definidas como la presencia de convulsiones tónicas y/o clónicas de un modo continuo durante al menos 30 minutos. El tratamiento con lovastatina protegió completamente del acceso al estado epiléptico después de la inoculación de KA (0 de 5 ratones), mientras que en los ratones a los que se había administrado PBS el acceso al estado epiléptico tuvo lugar en el 60 % de los casos (3 de 5)

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende simvastatina o las sales farmacéuticamente aceptables de la misma para su uso en la prevención y/o el tratamiento de:

5

- a) epilepsia, o
- b) crisis epilépticas

2. Simvastatina o sales farmacéuticamente aceptables de la misma para su uso en la prevención y/o el tratamiento de:

10

- a) epilepsia, o
- b) crisis epilépticas.

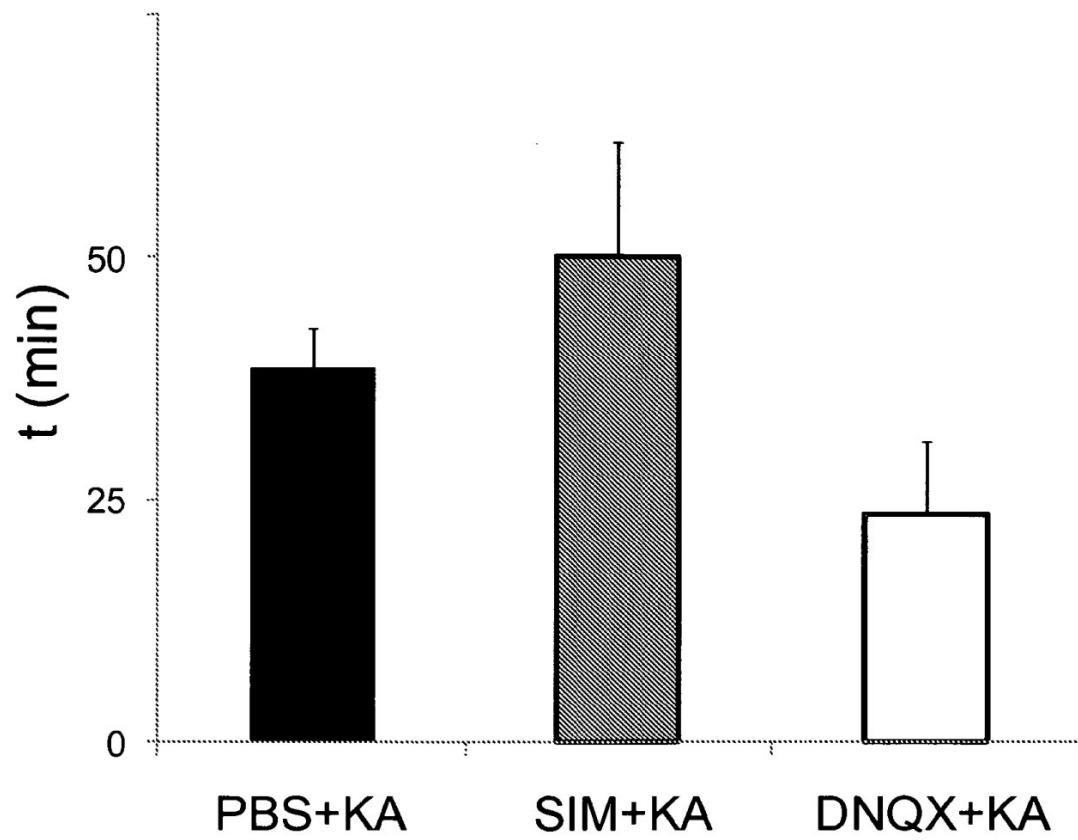


Figura 1

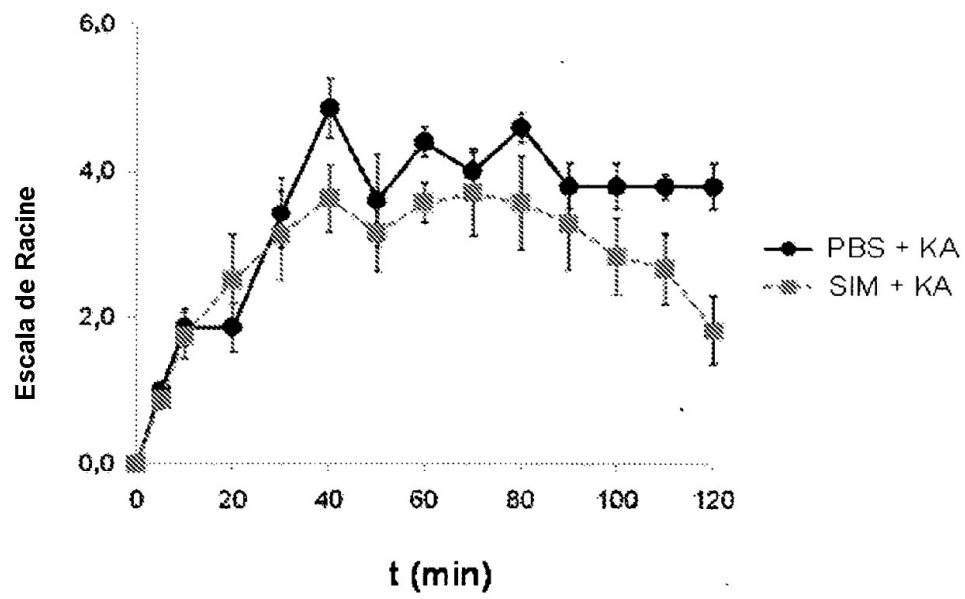


Figura 2

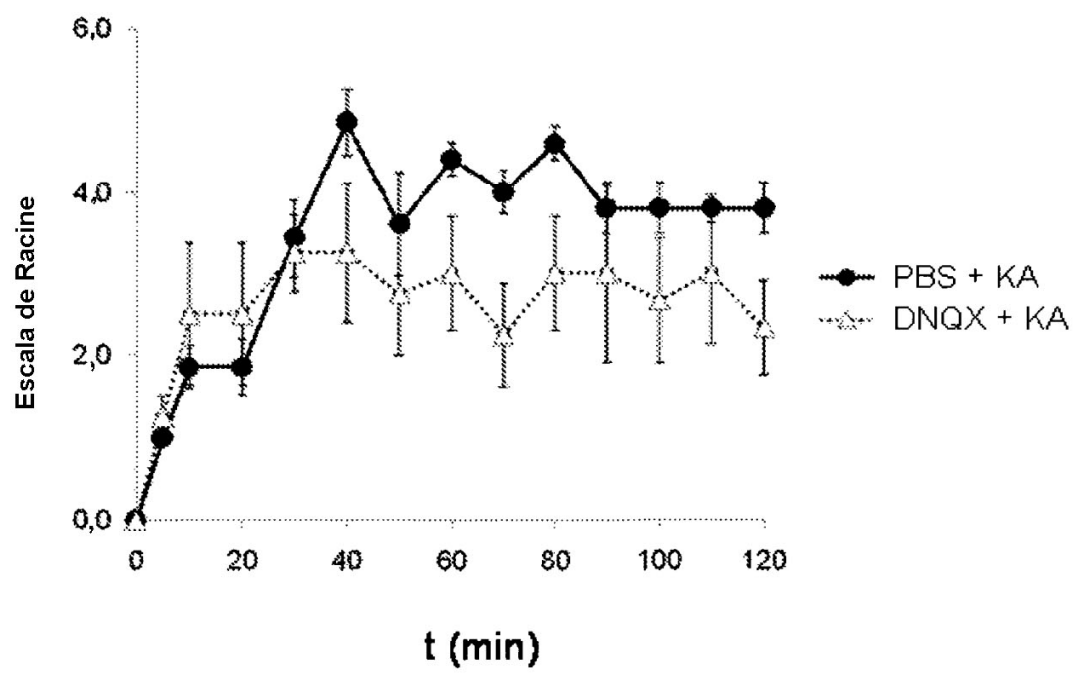


Figura 3

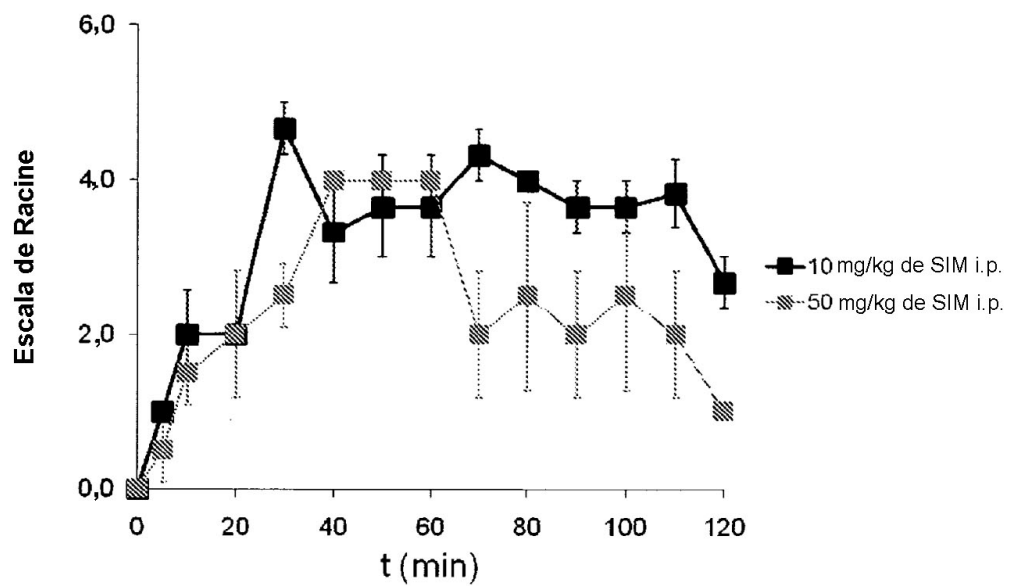


Figura 4

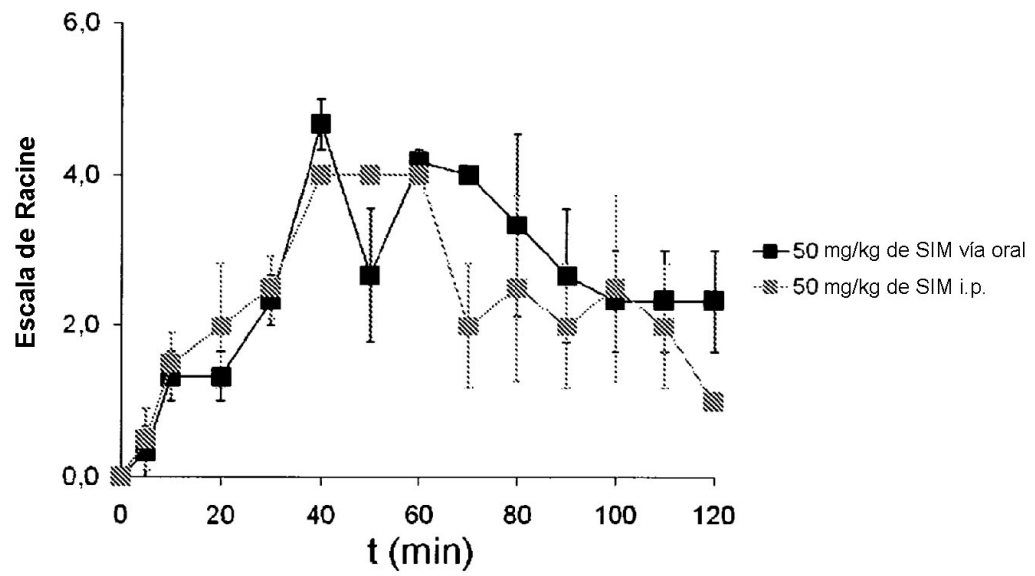


Figura 5

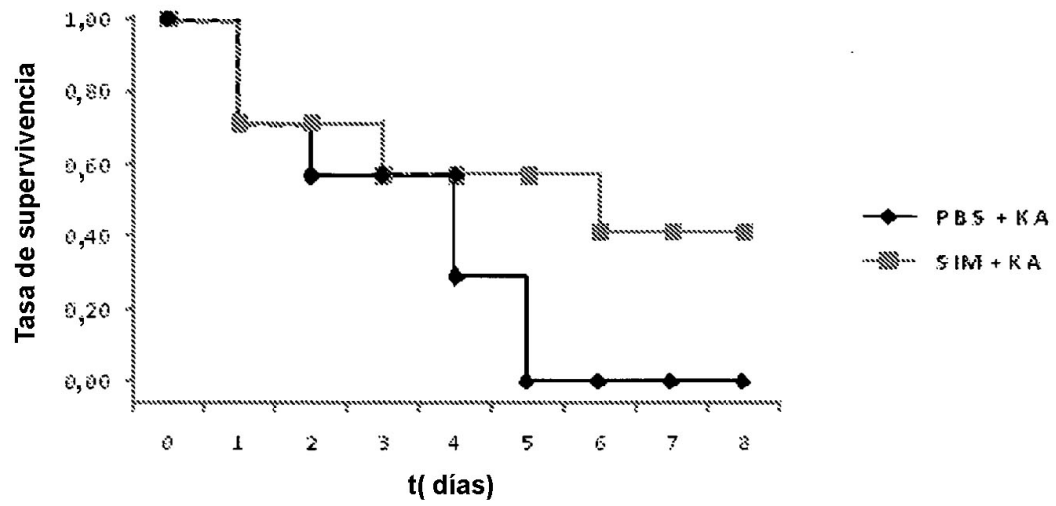


Figura 6

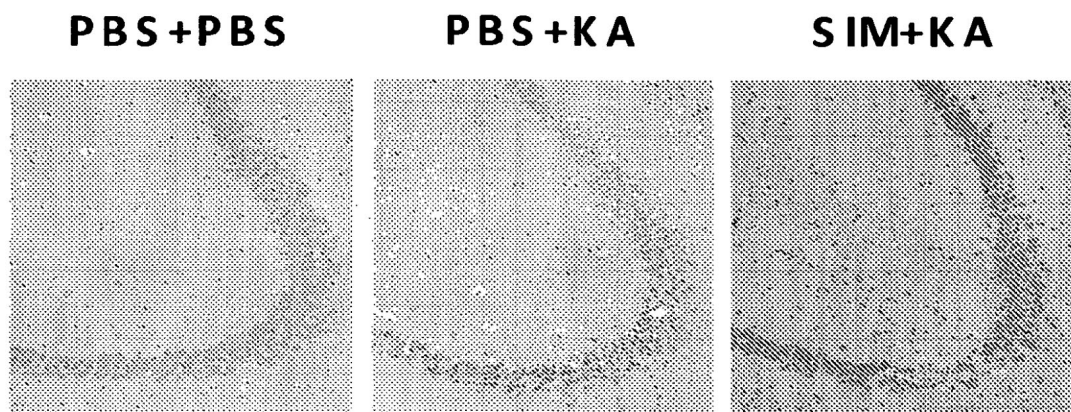


Figura 7

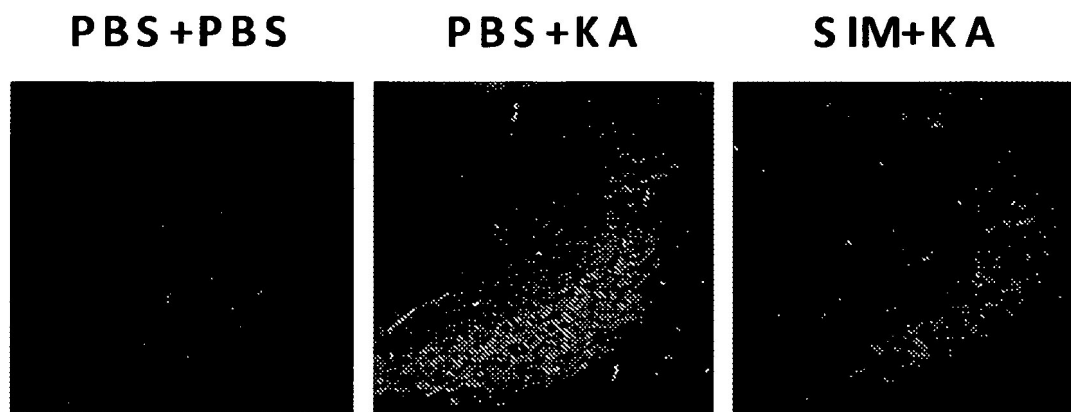


Figura 8



Figura 9

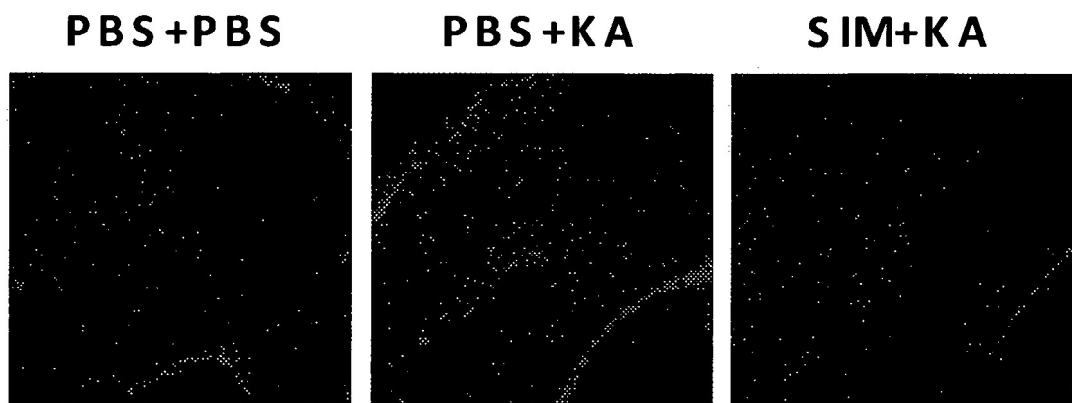


Figura 10

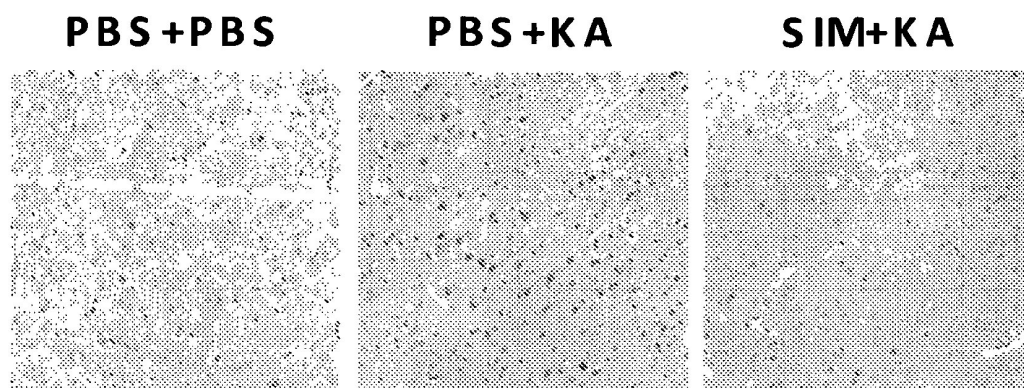


Figura 11

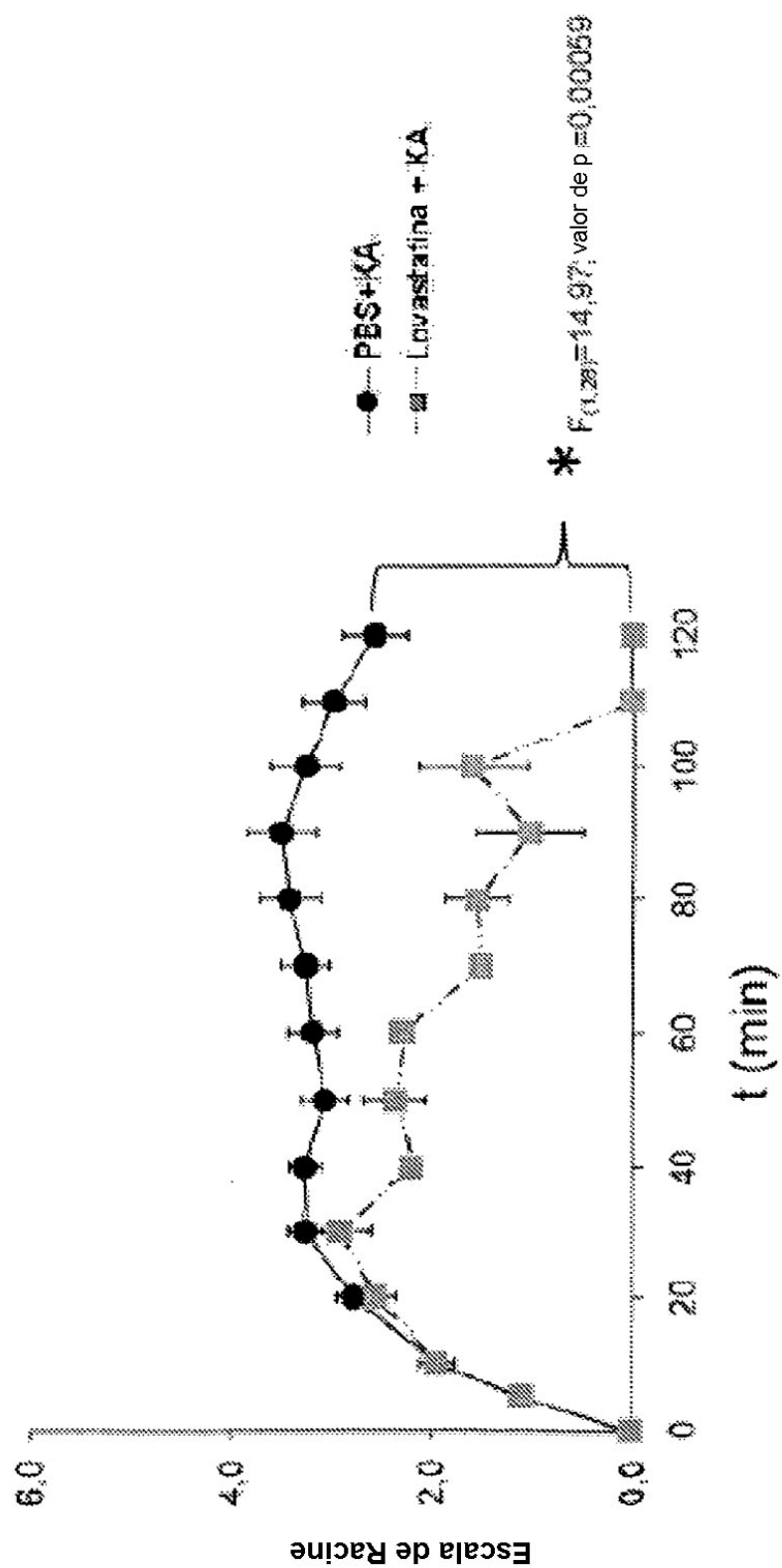


Figura 12