

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 003**

21 Número de solicitud: 201431825

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

11.12.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.07.2016

Fecha de concesión:

13.07.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

20.07.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070896

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (80.0%)
C/ Pedro Cernuda, 12
50009 Zaragoza (Zaragoza) ES y
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "LA
SAPIENZA" (20.0%)**

72 Inventor/es:

**OSTA PINZOLAS, Rosario;
RANDO ZALDUENDO, Amaya;
TOIVONEN, Janne;
ZARAGOZA, Pilar y
MUSARÓ, Antonio**

74 Agente/Representante:

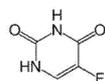
FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE LAS MOTONEURONAS.**

57 Resumen:

La presente invención proporciona un fármaco que permite un tratamiento efectivo de las enfermedades de las motoneuronas. En particular, la presente invención proporciona una composición que comprende:

a) un compuesto o una cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde dicho compuesto tiene la fórmula (I):



Fórmula (I).

; y/o

b) un antagonista de la pirimidina derivado del compuesto de fórmula I o de cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, capaz de bloquear la reacción de metilación del ácido desoxiuridílico para convertirlo en ácido timidílico mediante la inhibición de la enzima timidilato sintasa; para su uso en el tratamiento de una enfermedad de las motoneuronas.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

ES 2 577 003 B1

DESCRIPCIÓN

Composiciones para el tratamiento de enfermedades de las motoneuronas.

5 **Campo técnico**

La presente invención se encuentra dentro del campo de la Medicina y la Farmacia, y se refiere a una composición farmacéutica y/o a una preparación farmacéutica combinada que comprende un compuesto capaz de bloquear la reacción de metilación del ácido desoxiuridílico para convertirlo en ácido timidílico mediante la inhibición de la enzima timidilato sintasa tal y como el tegafur, carmofur o el 5-fluorouracilo para el tratamiento de enfermedades de las motoneuronas. Particularmente, para el tratamiento de la Esclerosis lateral amiotrófica, la Esclerosis lateral primaria, la Atrofia muscular progresiva, la Enfermedad de Kennedy o atrofia muscular progresiva espinobulbar y/o la Atrofia muscular espinal (AME).

Estado de la técnica anterior

Las motoneuronas son un tipo de células del sistema nervioso que se encuentra situadas en el cerebro y la médula espinal y tienen la función de producir los estímulos que provocan la contracción de los diferentes grupos musculares del organismo. Son imprescindibles por lo tanto para las actividades cotidianas que precisan contracción muscular: andar, hablar, mover las manos y en general todos los movimientos del cuerpo. Se pueden distinguir dos tipos de motoneuronas:

- **Primera motoneurona o motoneurona superior** : Se encuentran en la corteza cerebral y emiten terminaciones nerviosas que forman la llamada vía piramidal que conecta con la médula espinal.
- **Segunda motoneurona o motoneurona inferior**: Están situadas en el asta anterior de la médula espinal y emiten terminaciones nerviosas que llegan directamente a los músculos del organismo y provocan su contracción voluntaria.

Las enfermedades de la motoneurona producen una deficiencia en la capacidad de realizar movimientos voluntarios (afectación motora) y fasciculaciones. Las fasciculaciones son pequeñas contracciones involuntarias que se pueden percibir fácilmente como pequeños movimientos bajo la piel o detectarse mediante pruebas diagnósticas como el electromiograma. No se afectan las capacidades mentales superiores como inteligencia o memoria. Dentro de este tipo de enfermedades existen dos síndromes que se producen cuando se lesionan las vías motoras denominados síndrome de motoneurona superior y síndrome de motoneurona inferior.

El síndrome de motoneurona superior se produce cuando se lesionan las vías motoras descendentes desde la corteza cerebral hasta la médula espinal. Este síndrome presenta las siguientes características:

- **Distribución de la debilidad**: el síndrome de la motoneurona superior afecta a grupos musculares amplios y nunca afecta a músculos individuales, debido a que afectan a fibras superiores que conectan con muchas neuronas inferiores, que a su vez inervan y contraen a distintos músculos.

• Si la lesión es unilateral puede dar lugar a monoparesia o hemiplejía (que es lo más frecuente). Si la lesión está por encima de la decusación, en el encéfalo, la hemiplejía es contralateral. Pero si por el contrario la lesión está por debajo de la decusación la hemiplejía es ipsilateral

5

• Si la lesión es bilateral el paciente presenta tetraplejía o paraplejía dependiendo del nivel de la lesión.

10

• Si se afectan los músculos faciales, sólo vamos a apreciar clara debilidad en la porción inferior (desviación de la boca) debido a que los músculos faciales inferiores están inervados por el hemisferio contralateral, y los músculos faciales superiores están inervados por los dos lados (bihemisférica) por lo que si existe lesión de alguno de los hemisferios queda compensado con el otro hemisferio. Los músculos del cuello, tronco, mandibulares, extra-oculares apenas se van a ver afectados unilateralmente por esa inervación hemisférica.

15

• En las extremidades suele haber mayor afectación de la musculatura distal y se ven afectados los movimientos finos y de precisión.

20

• Atrofia. No es característica la atrofia marcada, sino moderada y secundaria al desuso.

25

• Tono muscular y reflejos musculares. En la fase aguda puede haber un episodio transitorio de hipotonía (flaccidez) y disminución de los reflejos, pero posteriormente el tono se incrementa (espasticidad) y los reflejos aumentan (hiperreflexia). Este ascenso del tono se debe a que el arco reflejo pierde influencias que normalmente recibe de las estructuras nerviosas superiores, estando el arco reflejo desinhibido. La espasticidad es un tipo de hipertonía.

30

• La resistencia que nota el explorador depende de la velocidad del desplazamiento.

• Fenómeno de la navaja. La resistencia es mayor al principio hasta que cede.

35

• No afecta de forma homogénea a los músculos agonistas y antagonistas: en los MMII predominan en los músculos extensores y en el MMSS predomina en los músculos flexores, lo que justifica la postura de estos pacientes: flexión y pronación de los MMSS y en el MMII extensión y aducción y con el pie en flexión plantar e inversión (pie equino varo). También justifica la marcha hemipléjica en guadaña o del segador (circunducción de un miembro inferior, elevación de la pelvis).

40

• Cuando se lesiona la vía piramidal el reflejo cutáneo plantar se hace extensor (signo de Babinski) y abolición del reflejo abdominal en el lado afectado.

45

• En el Síndrome de la Motoneurona Superior no hay fasciculaciones. Estas van a ser características del síndrome de motoneurona inferior.

El Síndrome de motoneurona inferior se produce cuando la lesión está situada en el asta anterior de la médula espinal. Este síndrome presenta las siguientes características:

50

• La distribución de la debilidad depende de la estructura lesionada y puede afectar a un único músculo o a un grupo restringido de músculos.

- Presencia de fasciculaciones. Son contracciones espontáneas de una o más unidades motoras. Se observan, por inspección, como "saltitos" en el vientre muscular y también por electromiografía (EMG). Además con la denervación pueden aparecer fibrilaciones, que son contracciones de fibras musculares aisladas detectados por el electromiograma.

5

Síndrome de motoneurona superior (piramidal)	Síndrome de motoneurona inferior
Atrofia muscular moderada	Atrofia muscular marcada
Tono muscular: Hipertonía	Tono muscular: Hipotonía
No existen fasciculaciones	Presencia de fasciculaciones
Reflejo cutaneo plantar extensor (singo de Babinski)	Reflejo cutaneo plantar flexor
Reflejos osteotendineos: aumentados	Reflejos osteotendineos: disminuidos
Afectación de grupos musculares amplios, hemiplejia	Distribución restringida o difusa

Las principales enfermedades de las motoneuronas son:

- 10 • Esclerosis lateral amiotrófica. Es la variedad más frecuente y se conoce con las siglas ELA.
- Esclerosis lateral primaria.
- 15 • Atrofia muscular progresiva.
- Enfermedad de Kennedy o atrofia muscular progresiva espinobulbar.
- Atrofia muscular espinal (AME):
- 20 ○ AME I. Forma infantil grave o enfermedad de Werdnig-Hoffman.
- AME II. Forma intermedia.
- 25 ○ AME III. Forma juvenil, de carácter leve. También llamada enfermedad de Kugelberg-Welander.
- AME IV. Forma leve del adulto.

A continuación asociamos cada una de las enfermedades de las motoneuronas con el tipo de degeneración que producen:

Tipo	Degeneración de 1ª motoneurona (superior)	Degeneración de 2ª motoneurona (inferior)
Esclerosis lateral amiotrófica	Si	Si
Esclerosis lateral primaria	Si	No
Atrofia muscular progresiva	No	Si
Atrofia muscular espinal	No	Si
Enfermedad de Kennedy	No	Si

5

La presente invención se enfrenta al problema de que a día de hoy aún no se ha encontrado un fármaco, o una combinación de fármacos, que permita un tratamiento efectivo de las enfermedades de las motoneuronas, en particular de la esclerosis lateral amiotrófica, permitiendo incrementar la eficacia del riluzol e incrementar la esperanza y calidad de vida de los pacientes.. Es necesario, por tanto, encontrar tratamientos alternativos para este tipo de enfermedades.

10

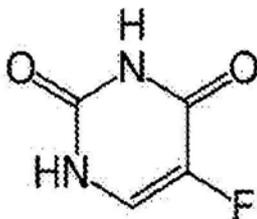
Breve descripción de la invención

15

La presente invención proporciona un fármaco que permite un tratamiento efectivo de las enfermedades de las motoneuronas. En particular, la presente invención proporciona una composición que comprende:

20

- a) un compuesto o una cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde dicho compuesto tiene la fórmula (I):



Fórmula (I),

; y/o

- b) un antagonista de la pirimidina derivado del compuesto de fórmula I o de cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, capaz de bloquear la reacción de metilación del ácido desoxiuridílico para convertirlo en ácido timidílico mediante la inhibición de la enzima timidilato sintasa;

5

para su uso en el tratamiento de una enfermedad de las motoneuronas. Preferiblemente, para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, enfermedad de Kennedy o atrofia muscular progresiva espinobulbar y atrofia muscular espinal (AME). Más preferiblemente, para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.

10

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Curva de supervivencia. Para elaborar la figura 1, se estableció como endpoint el momento en que el animal ya no era capaz de darse la vuelta cuando se colocaba en decúbito supino y se registró la edad a la que cada ratón alcanzaba dicho punto. Se determinó la curva de supervivencia mediante el estimador de Kaplan-Meier y las diferencias se analizaron mediante el Test Log-Rank. Se observó un incremento significativo ($p=0.0003$) en la supervivencia de los animales que habían recibido el tratamiento.

15

20

Figura 2: Evaluación de la actividad motora mediante la prueba del Rotarod. Para llevar a cabo la figura 2, la capacidad motora se evaluó mediante la prueba de Rotarod. Para ello, se colocó al ratón sobre un cilindro que gira sobre su propio eje a velocidad constante de 12 rpm y se registra el tiempo que el animal es capaz de permanecer sobre dicho cilindro. Se considera que la capacidad motora no está afectada cuando el animal es capaz de permanecer 180 segundos. Se registraron los valores semanalmente y se representaron en una distribución XY (edad del animal frente al tiempo que es capaz de permanecer en el rotarod). Las diferencias se establecieron mediante la prueba estadística t de Student, siendo estas significativas cuando $p<0.05$. Se observó un retraso de una semana en la aparición de los síntomas (de 96 a 103 días) y un enlentecimiento en la progresión de la enfermedad a partir de dicha edad.

25

30

Figura 3: Evaluación de la actividad motora y fuerza muscular mediante la prueba de la Rejilla. Para llevar a cabo la figura 3, la fuerza muscular se evaluó mediante la prueba de la rejilla. Esta prueba consiste en colocar al animal sobre una rejilla y girar dicha rejilla 180°. El animal queda por tanto suspendido de la rejilla a la que se agarra con sus extremidades. Se registró el tiempo que los ratones tardaron en caer, hasta un máximo de 180 segundos. Se realizó la prueba semanalmente y se representaron los valores en una distribución XY (edad-tiempo en la rejilla). Las diferencias entre las medias se analizaron mediante la prueba estadística t de Student. Se observó un discreto efecto del tratamiento sobre la fuerza motora a la edad de 124 días.

35

40

Figura 4: Evolución del peso en gramos. Para llevar a cabo la figura 2, se determinó que peso es un buen parámetro de la evolución de la enfermedad ELA en el modelo animal. Por tanto, se registró semanalmente el peso de los animales y se observó que el tratamiento enlentecía la pérdida de peso, observándose diferencias significativas entre los animales tratados y los no tratados a la edad de 124 días.

45

50

Figura 5: Evolución del peso respecto al peso inicial. Con el objetivo de corregir la variabilidad intragrupo del peso de los animales antes de iniciar el estudio, se determinó

la pérdida relativa del peso del animal referida al peso inicial antes de recibir el tratamiento o el placebo. Para obtener este valor, se dividió el peso de cada una de las semanas por el peso al inicio del experimento. A partir de los 96 días de edad se observó que el tratamiento tendía a reducir las pérdidas de peso, siendo el peso relativo del animal tratado significativamente mayor a partir de los 110 días de edad.

Figura 6: Porcentaje de Células Madre Hematopoyéticas (CMHs) en sangre periférica. Mediante citometría de flujo de muestras de sangre periférica tomadas de la vena de la cola se determinó el porcentaje de Células Madre Hematopoyéticas en sangre. Se analizaron animales WT que no recibieron el tratamiento y animales transgénicos tratados y sin tratar. Las extracciones se realizaron antes del tratamiento y 4 post-tratamiento, a los 75, 90 y 105 días de edad y al sacrificio. Se observó que ninguna de las administraciones del tratamiento afectó de manera significativa al porcentaje de células madre hemapotoyécticas en sangre periférica si comparamos los animales transgénicos tratados frente a los no tratados.

Figura 7 Porcentaje de Células Precursoras de Linfocitos (CPLs) en sangre periférica. Mediante citometría de flujo se muestras de sangre periférica tomadas de la vena de la cola se determinó el porcentaje de Células Madre Hematopoyéticas en sangre. Se analizaron animales Wildtype (WT) que no recibieron el tratamiento y animales transgénicos tratados y sin tratar. Las extracciones se realizaron antes del tratamiento y 4 post-tratamiento, a los 75, 90 y 105 días de edad y al sacrificio. Se observó un aumento del porcentaje de CPLs en sangre periférica tras la tercera administración del tratamiento, de los animales transgénicos tratados respecto a los no tratados, acercando los valores de los animales transgénicos tratados a los valores del animal WT. Este efecto del tratamiento sobre las CPLs también se observó en el momento del sacrificio, ya que como se aprecia en la gráfica, el incremento de CPLs en sangre periférica de los animales transgénicos no tratados se ve corregido como efecto del tratamiento.

Figura 8 Porcentaje de Células Precursoras de Monocitos en sangre periférica. Mediante citometría de flujo se muestras de sangre periférica tomadas de la vena de la cola se determinó el porcentaje de Células Madre Hematopoyéticas en sangre. Se analizaron animales Wildtype (WT) que no recibieron el tratamiento y animales transgénicos tratados y sin tratar. Las extracciones se realizaron antes del tratamiento y 4 post-tratamiento, a los 75, 90 y 105 días de edad y al sacrificio. Se observó una reducción en el porcentaje de CPMs en sangre periférica respecto a los animales transgénicos no tratados tras la primera administración del tratamiento a los 75 días de edad. Y como ya ocurriera en las CPLs, se observó que el tratamiento bloquea el incremento de CPMs que se produce en los animales transgénicos no tratados en el momento del sacrificio.

Figura 9 Porcentaje de Linfocitos en sangre periférica. Mediante citometría de flujo se muestras de sangre periférica tomadas de la vena de la cola se determinó el porcentaje de Células Madre Hematopoyéticas en sangre. Se analizaron animales Wildtype (WT) que no recibieron el tratamiento y animales transgénicos tratados y sin tratar. Las extracciones se realizaron antes del tratamiento y 4 post-tratamiento, a los 75, 90 y 105 días de edad y al sacrificio. Se observó que ninguna de las administraciones del tratamiento afectó de manera significativa al porcentaje de células madre hemapotoyécticas en sangre periférica si comparamos los animales transgénicos tratados frente a los no tratados. Sí que se observaron diferencias significativas a la edad de 105 días en el porcentaje de linfocitos de los animales WT respecto a los animales transgénicos.

Figura 10 Porcentaje de Monocitos en sangre periférica. Mediante citometría de flujo se muestras de sangre periférica tomadas de la vena de la cola se determinó el porcentaje de Células Madre Hematopoyéticas en sangre. Se analizaron animales Wildtype (WT) que no recibieron el tratamiento y animales transgénicos tratados y sin tratar. Las extracciones se realizaron antes del tratamiento y 4 post-tratamiento, a los 75, 90 y 105 días de edad y al sacrificio. Se observó una reducción en el porcentaje de monocitos en los animales transgénicos tratados frente a los no tratados tras la primera administración del tratamiento. A partir de los 90 días de edad, se observó un incremento en el porcentaje de monocitos en sangre periférica de los animales transgénicos respecto a los Wildtype.

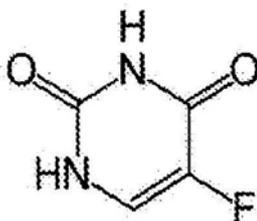
Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto cómo sorprendentemente el anti-metabolito 5-fluoracilo, hasta la fecha utilizado como tratamiento antineoplásico, es capaz de prolongar la supervivencia del ratón SOD1G93A, modelo animal de la Esclerosis Lateral Amiotrófica. En este sentido, los autores de la presente invención han establecido como el tratamiento con 5-fluorouracilo retrasa la aparición de los síntomas de la Esclerosis Lateral Amiotrófica, mejora la capacidad motora de dicha enfermedad y prolonga la supervivencia de aquellos sujetos que padecen de esclerosis lateral amiotrófica.

De esta forma, la presente invención proporciona una composición y una terapia combinada que es útil en el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica así como de otras enfermedades relacionadas de las motoneuronas tal y como la esclerosis lateral primaria, la atrofia muscular progresiva, la enfermedad de Kennedy o atrofia muscular progresiva espinobulbar y/o la Atrofia muscular espinal (AME), evitando o minimizando los efectos secundarios de otros tratamientos.

Por tanto, un primer aspecto se refiere al uso de una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende:

- a) un compuesto o una cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables ó profármacos, donde dicho compuesto tiene la fórmula (I):



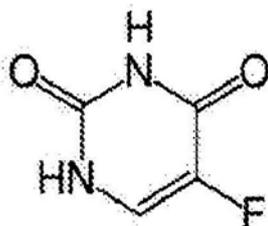
Fórmula (I),

; y/o

- b) un antagonista de la pirimidina derivado del compuesto de fórmula I o de cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, capaz de bloquear la reacción de metilación del ácido desoxiuridílico para convertirlo en ácido timidílico mediante la inhibición de la enzima timidilato sintasa;

para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de las motoneuronas. Alternativamente, la presente invención se refiere a una composición que comprende:

- 5 a) un compuesto o una cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde dicho compuesto tiene la fórmula (I):



Fórmula (I),

; y/o

10

- b) un antagonista de la pirimidina derivado del compuesto de fórmula I o de cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, capaz de bloquear la reacción de metilación del ácido desoxiuridílico para convertirlo en ácido timidílico mediante la inhibición de la enzima timidilato sintasa;

15

para su uso en el tratamiento de una enfermedad de las motoneuronas. Preferiblemente, dicha composición se utiliza en el tratamiento de un sujeto humano, más preferiblemente en el tratamiento de un sujeto humano que no padece de cáncer de forma concurrente a la enfermedad de las motoneuronas.

20

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el derivado se selecciona de la lista que consiste en capecitabina, carmofur, doxifluridina, tegafur, alfa-fluoro-beta-alanina, floxuridina, ftorafur, y oligómeros de los mismos.

25

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la enfermedad de las motoneuronas se selecciona de la lista que consiste en esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, enfermedad de Kennedy o atrofia muscular progresiva espinobulbar y atrofia muscular espinal (AME). Preferiblemente, la enfermedad es la esclerosis lateral amiotrófica.

30

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la composición comprende un compuesto de fórmula I y la enfermedad de las motoneuronas es la esclerosis lateral amiotrófica. Preferiblemente, la composición comprende un compuesto de fórmula I, la enfermedad de las motoneuronas es la esclerosis lateral amiotrófica y el tratamiento se efectúa en un sujeto humano que no padece de cáncer de forma concurrente a la esclerosis lateral amiotrófica.

35

40

Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de los componentes a) y b) según se describen en el primer aspecto de la invención, para su uso en la preparación de una preparación combinada que comprende dichos componentes yuxtapuestos para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades definidas en la reivindicación 1 ó 3. Alternativamente, el segundo aspecto de la invención se refiere a una preparación combinada que comprende los componentes a) y b) según se describen en el primer

aspecto de la invención, yuxtapuestos para su uso en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades definidas en la reivindicación 1 ó 3. Preferiblemente, dicha preparación se utiliza en el tratamiento de un sujeto humano, más preferiblemente en el tratamiento de un sujeto humano que no padece de cáncer de forma concurrente a la enfermedad de las motoneuronas.

Debe enfatizarse que el término "preparación combinada" o también denominada "yuxtaposición", en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición verdadera, para poder encontrarse disponibles para su aplicación combinada, separada o secuencial. De esta manera, la expresión "yuxtapuesta" implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el derivado se selecciona de la lista que consiste en capecitabina, carmofur, doxifluridina, tegafur, alfa-fluoro-beta-alanina floxuridina, ftorafur, y oligómeros de los mismos.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, la enfermedad de las motoneuronas se selecciona de la lista que consiste en esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, enfermedad de Kennedy o atrofia muscular progresiva espinobulbar y atrofia muscular espinal (AME). Preferiblemente, la enfermedad es la esclerosis lateral amiotrófica.

Todos los compuestos de la presente invención (incluyendo por lo tanto cualquiera de los componentes a) o b) de la presente invención, anteriormente descritos, incluyen sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, amidas y profármacos, incluyendo pero no limitado a sales carboxílicas, sales de adición de amino ácidos, ésteres, amidas, y profármacos de los compuestos de la presente invención que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para su uso en pacientes sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, con una relación beneficio / riesgo razonable, y eficaces para su uso pretendido, así como las formas de ion híbrido (zwitterionic forms, en inglés), cuando sea posible, de los compuestos de la presente invención. El término "sales" hace referencia a las sales de adición de ácido relativamente inocuas, inorgánicas y orgánicas de los compuestos de la presente invención. Estas sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento final y purificación de los compuestos o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal así formada. Ejemplos representativos de dichas sales incluyen las sales bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato mesilato, glucoheptonato, lactobsonate, laurilsulfonato, y similares. Éstas pueden incluir cationes basados en metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y amonio como, así como amonio inocua, amonio cuaternario, y cationes de amina incluyendo, pero no limitada a amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, y similares (véase por ejemplo, Berge S.M, *et al*, "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 1977;66:1-19, el contenido del cual se incorpora en la presente solicitud por referencia).

El término "profármaco" se refiere a compuestas que se transforman rápidamente *in vivo* para producir el compuesto parental de las fórmulas anteriores, por ejemplo, por hidrólisis

5 en la sangre. Una discusión detallada de profármacos se proporciona en T. Higuchi and V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Val. 14 of the A.C.S. Symposium Series, and in Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, ambas incorporadas aquí por referencia. En una realización preferida de cualquiera de los aspectos de la invención, la composición a la preparación combinada de la presente invención es una composición farmacéutica. En otra realización preferida, la composición a la preparación además comprende otra principio activa.

10 Otra aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende la composición de la invención, la preparación combinada de la invención, cualquiera de las componentes a) a b) de la preparación combinada de la invención, a simultáneamente, las componentes a) y b) de la preparación combinada de la invención para su uso en los tratamientos especificadas
15 en el primer aspecto de la invención.

De acuerdo con la presente invención, la forma farmacéutica es la disposición individualizada a que se adaptan los fármacos (principios activos) y excipientes (materia farmacológicamente inactiva) para constituir un medicamento. Ejemplos de formas
20 farmacéuticas líquidas pueden ser soluciones (soluciones orales), aguas aromáticas, jarabes, elixires, colutorios, enjuagues bucales, pociones, mucílago, emulsiones, suspensiones, colirios, lociones, tinturas, extractas fluidas, inyecciones, gargarismos, etc...

25 Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una a más compuestas de la invención descritas anteriormente junta a un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para su administración, las compuestas se combinan normalmente con una a más adyuvantes apropiadas para la ruta de administración indicada. Las compuestas pueden mezclarse con lactosa,
30 sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, acacia, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, y/o alcohol polivinílico. Alternativamente los compuestos de esta invención se pueden disolver en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de
35 carboximetilcelulos, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma de tragacanto, y/o diversos tampones. Otros adyuvantes y modos de administración son bien conocidos en la técnica farmacéutica. El vehículo o diluyente puede incluir material de retardo temporal, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera, u otros materiales bien
40 conocidos en la técnica.

Por otro lado, la dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia, ... del mamífero. En el sentido la cantidad terapéuticamente efectiva de los
45 componentes de la invención, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos profármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

50

Como se emplea aquí, el término "principio activo", significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores.

Ejemplo 1: La administración del 5-fluorouracilo retrasa el comienzo de los síntomas de la esclerosis lateral amiotrófica y prolonga la supervivencia en ratones SOD1G93A.

Para la realización de este experimento se utilizaron ratones transgénicos SOD1G93A. Estos ratones son ratones transgénicos clásicos de alta copia para el gen SOD1 humano mutado (G93A) con fondo genético de la cepa B6SJL. Dichos ratones transgénicos fueron obtenidos en "*The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) (B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J*)" y alojados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza bajo ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y con una humedad relativa del 55%. La comida y el agua fueron suministrados *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Zaragoza.

La identificación de los animales transgénicos y los de tipo silvestre (del inglés "*wildtype*") se realizó empleando la técnica de PCR sobre el DNA procedente de la cola de los ratones. La extracción de DNA y su posterior amplificación se realizaron siguiendo el protocolo descrito por "*The Jackson Laboratory*". A los 70 días de edad, se inyectó por vía intraperitoneal el producto 5-fluorouracilo. La dosis administrada fue de 150 mg/kg de peso de ratón diluido en suero fisiológico. Se administraron 3 inyecciones distanciadas 15 días entre ellas. Los ratones control recibieron suero fisiológico. Se utilizaron 80 animales balanceados por sexo y tratamiento.

A continuación se realizó el test de rotarod que es una prueba de la rejilla y supervivencia. La prueba de la rejilla se utilizó para determinar la fuerza muscular y el comienzo de los síntomas de ELA. Los animales realizaron este test una vez por semana desde la novena semana. Cada ratón fue colocado sobre una rejilla que posteriormente fue girada, quedando el ratón suspendido de sus extremidades. Se cronometró el tiempo que tardaba cada ratón en caer. Cada uno de los ratones dispuso de tres intentos y se registró el periodo de tiempo más largo hasta un máximo de 180 segundos. El test de rotarod fue empleado para evaluar la coordinación motora, la fuerza y el equilibrio. Los

animales fueron colocados sobre la barra giratoria del aparato y se registró el tiempo que el animal era capaz de permanecer sobre la barra a velocidad constante de 12 rpm. Cada animal dispuso de tres intentos tomando como límite 180 segundos. Se estableció como punto de eutanasia el momento en el que el animal no era capaz de darse la vuelta por sí mismo en el transcurso de 30 segundos cuando era colocado de cúbito supino.

Para evitar la variabilidad en el peso que presentaba cada ratón al empezar el tratamiento, el peso se refirió al peso inicial de cada animal.

Como resultado del tratamiento con 5-fluorouracilo 150 mg/kg IP 3 veces cada 15 días se pudieron obtener los siguientes resultados. En primer lugar, el retraso en la aparición de los síntomas, en segundo lugar la mejora en la capacidad motora de los ratones y por último la prolongación en la supervivencia de los ratones. La aparición de los síntomas se estableció como la semana en que los animales comenzaban a perder peso (como el primer día que los animales no pudieron mantenerse sujetos en la rejilla invertida durante tres minutos). La supervivencia máxima se alcanzó en el grupo tratado con 5-fluorouracilo, que alcanzaron una media de 136 días, 8 días más que los controles que vivieron una media de 128 días ($p=0.0003$) (ver Figura 2 y Tabla 1).

Tabla 1.

	Control	5-Fluoracilo	Valor P
Supervivencia	128±1.3	136±1.7	0.0003

Entre la semana 13 y 14 se observó un descenso notable en la actividad sobre el rotarod en el grupo control, mientras que en el grupo de animales tratados se observaron estas deficiencias a partir de la semana 15. Además, los ratones del grupo control comenzaron a perder peso a partir de la semana 12, mientras que los ratones del grupo tratado presentaron una ligera pérdida de peso justo después de la primera inyección, pero esta pérdida de peso fue pasajera y los ratones recuperaron su peso inicial e incluso lo superaron, alcanzando su peso máximo en la semana 14.

Ejemplo 2: La administración de 5-fluorouracilo por vía intraperitoneal modifica el número de células madre sanguíneas detectadas en sangre periférica.

Para la realización de este experimento se utilizaron ratones transgénicos SOD1G93A. Estos ratones son ratones transgénicos clásicos de alta copia para el gen SOD1 humano mutado (G93A) con fondo genético de la cepa B6SJL. Dichos ratones transgénicos fueron obtenidos en "*The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) (B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J*)" y alojados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza bajo ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y con una humedad relativa del 55%. La comida y el agua fueron suministrados *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Zaragoza.

La identificación de los animales transgénicos y los de tipo silvestre (del inglés "*wildtype*") se realizó empleando la técnica de PCR sobre el DNA procedente de la cola de los ratones. La extracción de DNA y su posterior amplificación se realizaron siguiendo el protocolo descrito por "*The Jackson Laboratory*". A los 70 días de edad, se inyectó por

vía intraperitoneal el producto 5-fluorouracilo. La dosis administrada fue de 150 mg/kg de peso de ratón diluido en suero fisiológico. Se administraron 3 inyecciones distanciadas 15 días entre ellas. Los ratones control recibieron suero fisiológico.

- 5 A partir de los 4 días tras la administración de 5-fluorouracilo, momento en el que la reducción tanto de células de la serie blanca como de la serie roja en sangre periférica es mayor; se estudió la presencia de células madre hematopoyéticas, precursores linfáticos y mieloides, así como de linfocitos y monocitos. Se utilizaron 20 animales balanceados por sexo y tratamiento. Así, a los 75, 90 y 105 días de edad se extrajo sangre mediante
- 10 punción de la vena de la cola. La sangre se recogió en un tubo capilar con EDTA Se centrifugó la sangre para obtener la fracción celular y se re-suspendieron las células en 50 microlitros de PBS. Se evaluó la presencia de células madre hematopoyéticas en la sangre periférica. Para ello aproximadamente 40 ul de sangre fue diluida en 1 ml PBS (1% BSA y 0,1% Azida Sódica). Tras un pulso de centrifuga, el plasma fue eliminado y la
- 15 fracción celular re-suspendida en 50 ml de PBS (1% BSA y 0,1% Azida Sódica) que contenía 1 ul de los siguientes anticuerpos: Anti-Mouse Ly-6A/E (Sca-1) PE (12-5981 eBioscience), Anti-Mouse CD117 (e-Kit) APC (17-1171 eBioscience), Mouse Hematopoietic Lineage eFluor® 450 Cocktail (88-7772 eBioscience) y PE-Cy™7 Rat Anti-Mouse CD127 (560733 BD Biosciences). Tras una incubación de 30 minutos, los
- 20 eritrocitos fueron lisados con un buffer de lisis casero consistente en 8.99 g/l de NH₄Cl, 1 g/l KHCO₃, 0,372 g/l de EDTA, pH=3 durante 15 minutos en oscuridad. A continuación, mediante centrifugación a 400g durante 5 minutos, se recogió el pellet de leucocitos marcados, se lavaron con ml de PBS (1% BSA y 0,1% Azida Sódica) y se centrifugaron de nuevo durante 1 minuto a velocidad máxima. Finalmente, las células se diluyeron en
- 25 500 ul de ml PBS (1% BSA y 0,1% Azida Sódica) y se analizaron mediante citometría de flujo en un Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter) para las siguientes subpoblaciones en función de su inmunofenotipo: Células madre hematopoyéticas (CMHs) (lin⁻, Sca-1⁺, e-kit⁺); Células Precursoras Mieloides (CPMs) (lin⁻, Sca-1⁻, e-kit⁺); y Células Precursoras Linfoides (CPLs) (Lin⁻, CD127⁺). Las subpoblaciones de monocitos y linfocitos fueron
- 30 positivas para el coctel de anticuerpos de linaje sanguíneo y se separaron en función de su complejidad. Los datos fueron analizados con el software de análisis citométrico Kaluza y los datos se mostraron como el porcentaje de células de cada subpoblación respecto al total de eventos seleccionados.
- 35 Los resultados obtenidos indican que tras la primera inyección de 5-fluorouracilo, disminuye el porcentaje de células precursoras mieloides en sangre periférica de los animales SOD tratados. Esta disminución se observó también en el momento del sacrificio, cuando los ratones transgénicos presentan un incremento de monocitos en su sangre periférica comparados con los animales wild-type de la misma edad.
- 40 Consecuentemente al descenso de precursores mieloides, el porcentaje de monocitos también se vio reducido a los 75 días en el grupo tratado respecto al grupo control. A partir de los 90 días de edad, en los animales transgénicos se incrementó el porcentaje de monocitos en sangre periférica comparado con los animales wildtype, pero no se observaron diferencias entre los ratones SOD tratados y no tratados.
- 45 En el caso de las células precursoras linfoides, el tratamiento con 5-fluorouracilo incrementó el porcentaje de dichas células en sangre periférica a los 105 días de edad observándose dicha tendencia desde los 90 días de edad. Sin embargo, en el momento del sacrificio en los animales SOD no tratados se observó un incremento en el porcentaje
- 50 de las células progenitoras mientras que los animales SOD no tratados no se observó dicho incremento.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende:

- 5 a) un compuesto o una cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde dicho compuesto tiene la fórmula (1):



Fórmula (I),

10

; y/o

- 15 b) un antagonista de la pirimidina derivado del compuesto de fórmula I o de cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, capaz de bloquear la reacción de metilación del ácido desoxiuridílico para convertirlo en ácido timidílico mediante la inhibición de la enzima timidilato sintasa;

20 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de las motoneuronas.

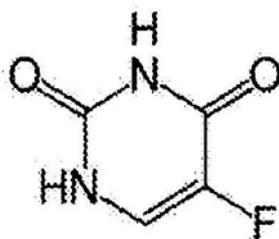
25 2. Uso de la composición según la reivindicación 1, donde dicho derivado se selecciona de la lista que consiste en capecitabina, carmofur, doxifluridina, tegafur y alfa-fluoro-beta-alanina, floxuridina, ftorafur, y oligómeros de los mismos.

30 3. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la enfermedad de las motoneuronas se selecciona de la lista que consiste en esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, enfermedad de Kennedy o atrofia muscular progresiva espinobulbar y atrofia muscular espinal (AME).

35 4. Uso de los componentes a) y b) según se describen en la reivindicación 1 o 2, para la preparación de una preparación combinada que comprende dichos componentes yuxtapuestos para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades definidas en la reivindicación 1 ó 3.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicha enfermedad de las motoneuronas es la esclerosis lateral amiotrófica.

40 6. Uso de una composición que comprende un compuesto o una cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde dicho compuesto tiene la fórmula (I):



Fórmula (I),

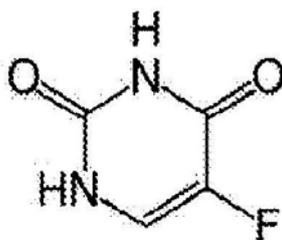
en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la esclerosis lateral
amiotrófica.

5

7. Uso de una composición que comprende:

a) un compuesto o una cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde
dicho compuesto tiene la fórmula (I):

10



Fórmula (I),

; y/o

15

b) un antagonista de la pirimidina derivado del compuesto de fórmula I o de cualquiera
de sus sales farmacéuticamente aceptables, capaz de bloquear la reacción de
metilación del ácido desoxiuridílico para convertirlo en ácido timidílico mediante la
inhibición de la enzima timidilato sintasa,

20

en la elaboración de un medicamento para el tratamiento en un sujeto humano de una
enfermedad de las motoneuronas, donde dicho sujeto humano no padece de cáncer de
forma concurrente a la enfermedad de las motoneuronas.

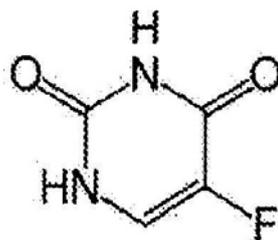
25

8. Uso de la composición según la reivindicación 7, donde dicho derivado se selecciona
de la lista que consiste en capecitabina, carmofur, doxifluridina, tegafur, alfa-fluoro-beta-
alanina, floxuridina, ftorafur, y oligómeros de los mismos

30

9. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde la
enfermedad de las motoneuronas se selecciona de la lista que consiste en esclerosis
lateral amiotrófica, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular progresiva, enfermedad de
Kennedy o atrofia muscular progresiva espinobulbar y atrofia muscular espinal (AME).

10. Uso de los componentes a) y b) según se describen en la reivindicación 1 o 2, para la preparación de una preparación combinada que comprende dichos componentes yuxtapuestos para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades definidas en la reivindicación 1 ó 3 en un sujeto humano que no padece de cáncer de forma concurrente a la enfermedad de las motoneuronas.
- 5
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-10, donde dicha enfermedad de las motoneuronas es la esclerosis lateral amiotrófica.
- 10
12. Uso de una composición que comprende un compuesto o una cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde dicho compuesto tiene la fórmula (I):



Fórmula (I),

- 15 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto humano que no padece de cáncer de forma concurrente a la esclerosis lateral amiotrófica.
13. Uso de la composición o la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde la composición o la preparación combinada además comprende otro principio activo.
- 20
14. Uso de la composición o la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde dicha composición o preparación combinada se administra vía intravenosa o vía intra-arterial.
- 25

Fig. 1

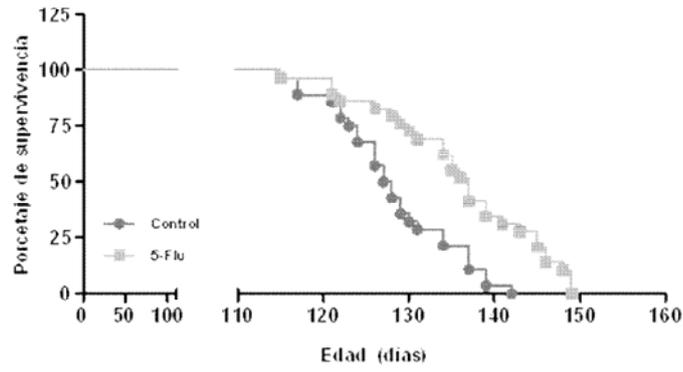


Fig. 2

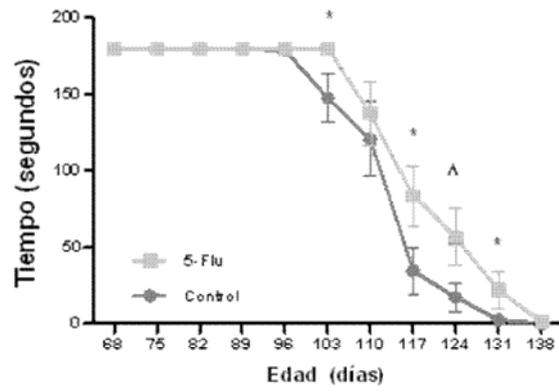


Fig. 3

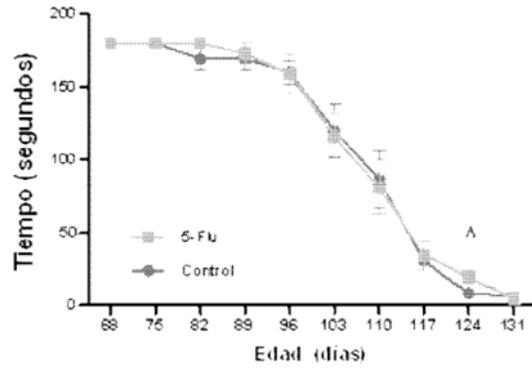


Fig. 4

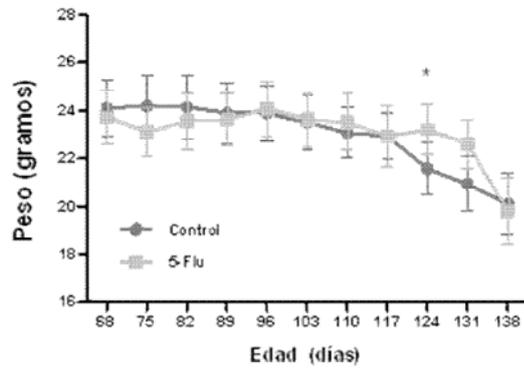


Fig. 5

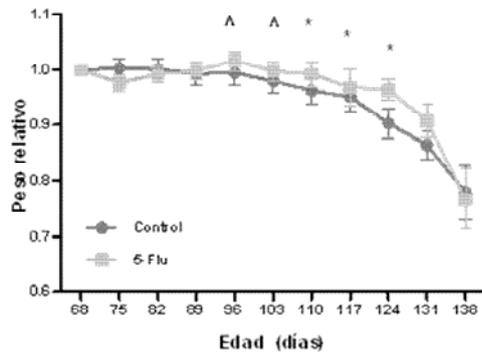


Fig. 6

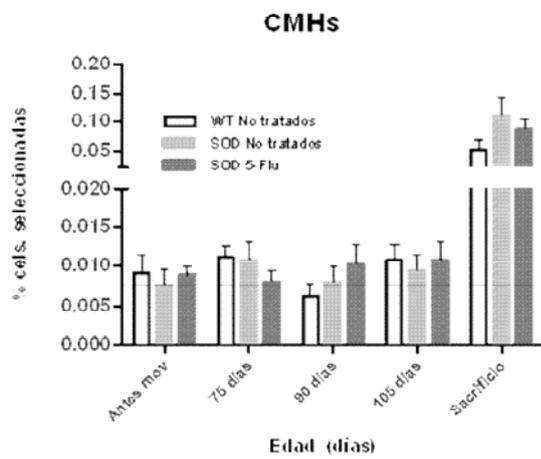


Fig. 7

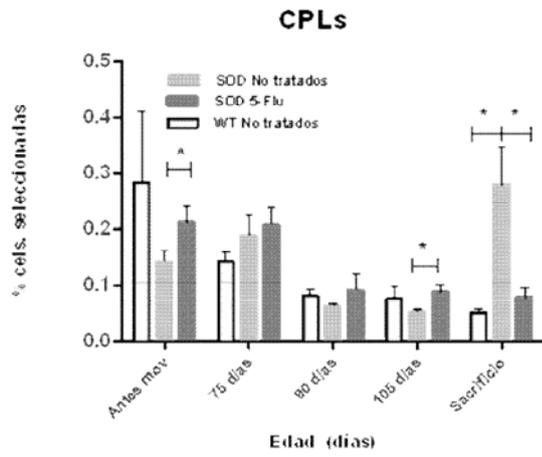


Fig. 8

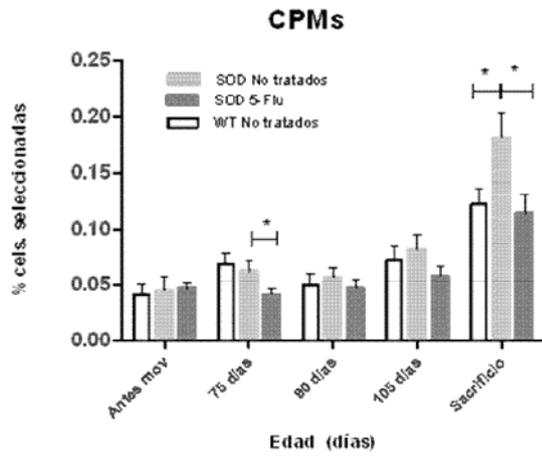


Fig. 9

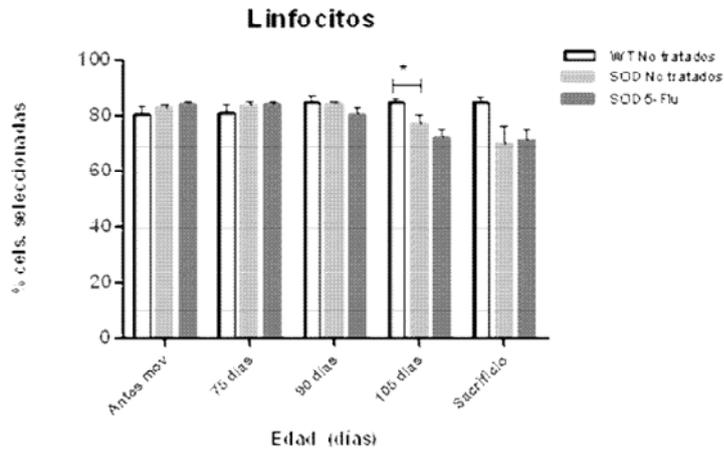


Fig. 10

