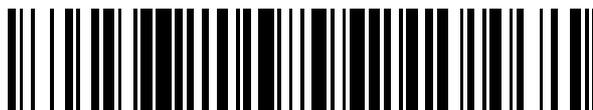


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 843**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4704 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 25/22 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 31/138 (2006.01)

A61K 31/428 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2010 E 10808442 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2467372**

54 Título: **Tratamiento de trastornos relacionados con BDNF usando laquinimod**

30 Prioridad:

10.08.2009 US 273920 P

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

19.10.2016

73 Titular/es:

**TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD.
(100.0%)
5 Basel Street P.O. Box 3190
49131 Petah Tiqva, IL**

72 Inventor/es:

HAYARDENY, LIAT

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 586 843 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

Tratamiento de trastornos relacionados con BDNF usando laquinimod

Antecedentes

5 Los factores neurotróficos tienen una profunda influencia sobre los acontecimientos del desarrollo tales como muerte celular de origen natural, diferenciación y el proceso consecuente (Snider, 1989). El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es un factor neurotrófico que pertenece a la familia de las neurotrofinas de factores de crecimiento. El BDNF actúa en ciertas neuronas del sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP), ayudando a dar soporte a la supervivencia de neuronas existentes y a fomentar el crecimiento y la diferenciación de nuevas neuronas y sinapsis (Acheson, 1995; Huang, 2001). El aumento de BDNF se ha asociado con el tratamiento de varios trastornos incluyendo la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington (EH), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), trastornos depresivos, la retinitis pigmentosa, la disfunción eréctil, trastornos de la memoria, el síndrome de Rett, la enfermedad de Alzheimer, el trastorno bipolar y la hipermanía.

15 La enfermedad de Parkinson es una enfermedad degenerativa crónica y progresiva del cerebro que deteriora el control motor, el habla y otras funciones. Una de las características más llamativas de la enfermedad de Parkinson es que afecta principalmente a una población neuronal restringida en el cerebro. Aunque otras neuronas también se ven afectadas, las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta de la sustancia negra son las más vulnerables al proceso de la enfermedad (Chesselet, 2003). El BDNF tiene potentes efectos sobre la supervivencia y la morfología de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, aumentando su supervivencia y, por lo tanto, su pérdida podría contribuir a la muerte de estas células en la enfermedad de Parkinson (EP) (Hyman, 1991; Howell, 2000).

20 La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por síntomas motores, cognitivos y psiquiátricos y por una degeneración progresiva de las neuronas en los ganglios basales en la corteza cerebral. Los pacientes que padecen EH tienen niveles significativamente más bajos de BDNF en el suero en comparación con los controles sanos (Ciammola, 2007).

25 La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa crónica y debilitante que implica la degeneración de neuronas motoras corticales, bulbares y medulares. El riluzol (2-amino-6-[trifluorometoxi]benzotiazol) es un antagonista de la neurotransmisión glutamatérgica que prolonga la supervivencia en la ELA (Riviere, 1998). También se ha demostrado que el riluzol aumenta significativamente los niveles de BDNF en el cerebro de ratas, promoviendo así la proliferación de precursores (Kato-Semba, 2002).

30 La depresión es otra indicación en la que se ha demostrado que el BDNF tiene efecto. En un meta-análisis que abarca muchos estudios, pacientes con depresión mostraron tener niveles inferiores de BDNF que los sujetos sanos de control, y se ha demostrado que el tratamiento antidepresivo aumenta los niveles de BDNF en pacientes con depresión después del tratamiento (Sen, 2008).

35 La retinitis pigmentosa es una enfermedad asociada con la pérdida de células fotorreceptoras de la retina. Se ha demostrado que el cultivo con BDNF de explantes de retina procedentes de ratones *rd*, que parecen una mutación en el mismo gen que se ha encontrado mutado en retinitis pigmentosa recesiva autosómica humana, mostraba un aumento en el número de núcleos fotorreceptores en la capa nuclear externa (Caffe Romeo, 2001). Esto sugiere que aumentar los niveles de BDNF en seres humanos que padecen retinitis pigmentosa puede ralentizar la progresión de la enfermedad.

40 La disfunción eréctil es otra enfermedad que ha mostrado estar asociada con BDNF. En la patente de EE. UU. n.º 7.485.311, ejemplo 3, se demostró que el tratamiento de ratas en el modelo de congelación del nervio cavernoso bilateral usando inyección intracavernosa de AAV-BDNF mejora la presión intracavernosa máxima en respuesta a la electroestimulación del nervio cavernoso bilateral.

45 El BDNF también se ha asociado con el aprendizaje y la memoria. En un modelo de ratón transgénico de ratones knockout para BDNF, se ha demostrado que el deterioro en la producción de BDNF causa deterioro en el aprendizaje y la memoria en la fase adulta y especialmente durante el desarrollo temprano (Monteggia, 2007). En un modelo de rata, se demostró que el BDNF endógeno en el hipocampo está implicado en la formación de la memoria. Mientras que la infusión de anticuerpos anti-BDNF de bloqueo de función mostró deteriora la memoria a corto plazo y a largo plazo en un modelo de aprendizaje motivado por el miedo, la infusión de BDNF humano recombinante facilitó la retención de la memoria a largo plazo (Alonsa, 2005). Aumentar los niveles de BDNF en pacientes humanos con necesidad de aprendizaje o mejora de la memoria también puede mejorar la memoria a corto y largo plazo.

55 El síndrome de Rett (SR) es un trastorno del desarrollo neurológico ligada al cromosoma X y la principal causa de retraso mental grave en mujeres, afectando a 1:10.000-15.000 nacimientos en todo el mundo (Amaral, 2007). La enfermedad está asociada con mutaciones en el gen MeCP2. Una de las dianas de MeCP2 es el gen de BDNF. Esto sugiere que la desregulación de la expresión de BDNF en el síndrome de Rett puede ser la causa de anomalías estructurales observados en los pacientes, especialmente la ramificación dendrítica reducida y la pérdida de espinas dendríticas (Amaral, 2007). Esto sugiere que el aumento de los niveles de BDNF en el síndrome de Rett puede ser una terapia viable en el tratamiento de la enfermedad.

En pacientes con trastorno bipolar que padecen hipermanía, se demostró que los niveles de BDNF variaban dependiendo de si el paciente estaba tratado o sin tratar. Antes del tratamiento con los tratamientos conocidos para la manía, se encontró que los niveles de BDNF eran menores que en los controles sanos, pero tras el tratamiento, la diferencia entre los niveles de BDNF en el suero de los pacientes tratados y los controles ya no era significativa (Tramontina, 2009). Puede ser posible tratar la hipermanía aumentando los niveles de BDNF en pacientes que lo necesiten.

Yinghui Hu et al. (Journal of Neurochemisrty, 2008, Vol. 105, páginas 1-17) instruye sobre la implicación de BDNF en varias afecciones patológicas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, el síndrome de Rett, la depresión, la ansiedad y disfunciones cognitivas.

Se han identificado varios agentes para aumentar los niveles de BDNF, incluyendo riluzol y antidepresivos tales como fluoxetina (Prozac®) (Kato-Semba, 2002; Molteni, 2006).

Sumario de la invención

En el presente documento se divulga otro agente, es decir, laquinimod, que se ha demostrado que aumenta el BDNF en los seres humanos. Laquinimod es un compuesto sintético novedoso con una alta biodisponibilidad oral, que se ha sugerido como una formulación oral para la esclerosis múltiple remitente recidivante (EMRR). No se ha informado de la relación entre laquinimod y BDNF. Laquinimod es un compuesto cuyo nombre químico es N-etil-N-fenil-1,2-dihidro-4-hidroxi-5-cloro-1-metil-2-oxoquinolina-3-carboxamida, y su número de registro químico es 248281-82-7. El procedimiento de síntesis de laquinimod y la preparación de su sal de sodio se divulga en la patente de EE. UU. n.º 6.077.851. Se divulga un procedimiento adicional de síntesis de laquinimod en la patente de EE. UU. n.º 6.875.869 y en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2007-0088050. Se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden laquinimod de sodio en la publicación de la solicitud internacional PCT n.º WO 2005/074899, así como en las publicaciones de las solicitudes de patente de EE. UU. 2007-0293537 y 2009-0162432.

La presente solicitud proporciona un procedimiento para aumentar el nivel en suero del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en un sujeto humano, que comprende administrar periódicamente al sujeto una cantidad de laquinimod, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, eficaz para aumentar el nivel en suero de BDNF en el sujeto humano. El procedimiento puede comprender, además, administrar periódicamente al sujeto una cantidad de un segundo agente que aumenta el BDNF.

La presente solicitud también proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto humano que padece una enfermedad relacionada con el BDNF, seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, trastornos depresivos, trastornos de ansiedad, retinitis pigmentosa, disfunción eréctil, trastornos de la memoria, síndrome de Rett, enfermedad de Alzheimer, trastorno bipolar e hipermanía, que comprende administrar periódicamente laquinimod o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad eficaz para tratar al sujeto humano.

La presente solicitud también proporciona el uso de laquinimod en la fabricación de un medicamento para aumentar el nivel en suero de BDNF en un sujeto humano.

La presente solicitud también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de laquinimod eficaz para su uso en el aumento del nivel en suero de BDNF en un sujeto humano.

La presente solicitud también proporciona una preparación farmacéutica que comprende una cantidad de laquinimod y una cantidad de un segundo agente que aumenta el BDNF, eficaz para su uso en el aumento del nivel en suero de BDNF en un sujeto humano.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Muestra el análisis unidireccional de BDNF que compara el grupo de placebo y el grupo de laquinimod a 0,6 mg al inicio del estudio.

Figura 2: Muestra el análisis unidireccional de BDNF que compara el grupo de placebo y el grupo de laquinimod a 0,6 mg en la semana 112 (V3).

Figura 3: Muestra el análisis unidireccional de BDNF que compara el grupo de placebo y el grupo de laquinimod a 0,6 mg en la semana 36 (V9).

Figura 4: Muestra los resultados de la prueba de natación forzada realizada en el Ejemplo 2.1. (N = 5/grupo) Laquinimod (1-25 mg/kg/dx3d p.o.) mostró actividad antidepresiva siendo la dosis de 1 mg/kg p.o. la más activa.

4A: Efecto de laquinimod (1; 5; 10; 25 mg/kg/dx4, p.o., -90) y fluoxetina (10 mg/kg/dx4, -90 min, p.o.) en la PNF sobre la distancia recorrida [cm] en ratones Balb C [4 min]

4B: Efecto de laquinimod (1; 5; 10; 25 mg/kg/dx4, p.o., -90) y fluoxetina (10 mg/kg/dx4, -90 min, p.o.) en la PNF sobre la velocidad (cm/s) en ratones Balb C [4 min]

4C: Efecto de laquinimod (1; 5; 10; 25 mg/kg/dx4, p.o., -90) y fluoxetina (10 mg/kg/dx4, -90 min, p.o.) en la PNF sobre el movimiento (duración en movimiento) en ratones Balb C [4 min]

4D: Efecto de laquinimod (1; 5; 10; 25 mg/kg/dx4, p.o., -90) y fluoxetina (10 mg/kg/dx4, -90 min, p.o.) en la PNF sobre la duración total de inmovilidad [10 %] en ratones Balb C [4 min]

5 **Figura 5:** Muestra los resultados de la prueba de natación forzada realizada en el Ejemplo 2.2. (* p <0,01 frente al control) Laquinimod (0,5-25 mg/kg/dx3d p.o.) mostró actividad antidepressiva con dosis en 5 y 25 mg/kg induciendo actividad antidepressiva significativa.

5A: Efecto de laquinimod (0,5; 1; 5; 25 mg/kg, p.o., -90) y fluoxetina (10 mg/kg, -90 min, p.o.) en la PNF sobre la distancia recorrida [cm] en ratones Balb C [4 min]

10 5B: Efecto de laquinimod (0,5; 1; 5; 25 mg/kg, p.o., -90) y fluoxetina (10 mg/kg, -90 min, p.o.) en la PNF sobre la velocidad en ratones Balb C [4 min]

5C: Efecto de laquinimod (0,5; 1; 5; 25 mg/kg, p.o., -90) y fluoxetina (10 mg/kg, -90 min, p.o.) en la PNF sobre el movimiento (duración total) en ratones Balb C [4 min]

15 5D: Efecto de laquinimod (0,5; 1; 5; 25 mg/kg, p.o., -90) y fluoxetina (10 mg/kg, -90 min, p.o.) en la PNF sobre la duración total de inmovilidad [10 %] en ratones Balb C [4 min]

Figura 6: Muestra la prueba de campo abierto - resultados de los parámetros de motilidad realizados en el Ejemplo 3.1. (N = 5/grupo) Laquinimod (1-25 mg/kg/dx3d p.o.) no modificó los parámetros generales de movilidad en campo abierto en ratones Balb/c.

20 6A: Efecto de laquinimod (1; 5; 10; 25 mg/kg, p.o.; -90 min) y fluoxetina (10 mg/kg, p.o.; -90 min) y combinación en la prueba de campo abierto sobre la distancia recorrida [cm] en ratones BALB/c [20 min]

6B: Efecto de laquinimod (1; 5; 10; 25 mg/kg, p.o.; -90 min) y fluoxetina (10 mg/kg, p.o.; -90 min) y combinación en la prueba de campo abierto sobre la distancia media [cm/s] en ratones BALB/c [20 min]

6C: Efecto de laquinimod (1; 5; 10; 25 mg/kg, p.o.; -90 min) y fluoxetina (10 mg/kg, p.o.; -90 min) y combinación en la prueba de campo abierto sobre la duración total de inmovilidad en ratones BALB/c [20 min]

25 6D: Efecto de laquinimod (1; 5; 10; 25 mg/kg, p.o.; -90 min) y fluoxetina (10 mg/kg, p.o.; -90 min) y combinación en la prueba de campo abierto sobre la duración total de movilidad fuerte [s] en ratones BALB/c [20 min]

Figura 7: Muestra la prueba de campo abierto - resultados de los parámetros de ansiedad (en la zona 2) realizados en el Ejemplo 3.1. (N = 5/grupo) Laquinimod (1-25 mg/kg/dx3d p.o.) mostró tendencia hacia un efecto ansiolítico siendo los animales más activos en el centro (zona 2).

30 **Figura 8:** Muestra la prueba de campo abierto - resultados de los parámetros de ansiedad (en la zona 2 + 3) realizados en el Ejemplo 3.1. (N = 5/grupo) Laquinimod (1-25/kg/dx3d p.o.) mostró tendencia hacia un efecto ansiolítico siendo los animales más activos en el centro (zonas 2 + 3). Se demostró que 1 mg/kg era la dosis más potente.

35 8C: Efecto de laquinimod (1; 5; 10; 25 mg/kg, p.o.; -90 min) y fluoxetina (10 mg/kg, p.o.; -90 min) y combinación en la prueba de campo abierto sobre la frecuencia de ponerse a dos patas en ratones BALB/c [20 min]

Figura 9: Muestra la prueba de campo abierto - resultados de los parámetros de motilidad realizados en el Ejemplo 3.2. (N = 5/grupo; *p <0,05 frente al control) Laquinimod (0,5-25 mg/kg/dx3d p.o.) indujo un ligero aumento en la motilidad (0,5-5 mg/kg) en el campo abierto en ratones Balb/c.

40 **Figura 10:** Muestra la prueba de campo abierto - resultados de los parámetros de ansiedad (en las zonas 2 + 3) realizados en el Ejemplo 3.2. Laquinimod (0,5-25 mg/kg/dx3d d.o.) muestra un efecto ansiolítico significativo mostrando los animales más actividad en el centro (zonas 2 + 3). Tanto la fluoxetina como el laquinimod (0,5-5 mg/kg) mostraron efectos ansiolíticos significativos frente al control. La dosis más potente fue laquinimod a 5 mg/kg.

45 **Figura 11:** Muestra los resultados del modelo de laberinto en cruz elevado realizado en el Ejemplo 4.1. Laquinimod (5 y 25 mg/kg/dx3d p.o.) mostró efecto ansiolítico significativo. Laquinimod mostró un aumento dependiente de la dosis en la actividad sobre el brazo abierto. La dosis a 25 mg/kg p.o. fue la más activa.

Figura 12: Muestra los resultados del modelo de laberinto en cruz elevado realizado en el Ejemplo 4.2. (Parámetros del brazo abierto en ratones Balb/c -5 min; N = 5/grupo) Laquinimod (5-25 mg/kg/dx3d p.o.) mostró efecto ansiolítico significativo.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención se define por las reivindicaciones. La materia no englobada por el alcance de las

reivindicaciones no forma parte de la invención actualmente reivindicada.

La presente solicitud proporciona un procedimiento para aumentar el nivel en suero del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en un sujeto humano, que comprende administrar periódicamente al sujeto una cantidad de laquinimod, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, eficaz para aumentar el nivel en suero de BDNF en el sujeto humano.

5

En un modo de realización, la cantidad de laquinimod o sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra al sujeto humano una vez al día. En otro modo de realización, la administración periódica continúa durante al menos 3 días.

En un modo de realización, la cantidad de laquinimod administrada es 0,1 mg/día-40,0 mg/día. En otro modo de realización, la cantidad de laquinimod administrada es 0,6 mg/día. En otro modo de realización, la cantidad de laquinimod se administra por vía oral.

10

En un modo de realización, el sujeto está padeciendo una enfermedad relacionada con el BDNF. En otro modo de realización, la enfermedad relacionada con el BDNF es la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, un trastorno depresivo, un trastorno de ansiedad, la retinitis pigmentosa, la disfunción eréctil, un trastorno de la memoria, el síndrome de Rett, la enfermedad de Alzheimer, el trastorno bipolar o la hipermanía.

15

En un modo de realización, el trastorno depresivo es la depresión, la depresión en pacientes con cáncer, depresión en pacientes con enfermedad de Parkinson, la depresión posterior a infarto de miocardio, la depresión en pacientes con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la depresión sintomática subsindrómica, la depresión en mujeres estériles, la depresión pediátrica, la depresión mayor, la depresión de un único episodio, la depresión recidivante, la depresión inducida por abusos a los niños, la depresión posparto, la depresión mayor según el DSM-IV, la depresión mayor refractaria al tratamiento, la depresión severa, la depresión psicótica, la depresión posterior a apoplejía, el dolor neuropático, la enfermedad maníaco-depresiva incluyendo enfermedad maníaco-depresiva con episodios mixtos y enfermedad maníaco-depresiva con episodios de depresión, el trastorno afectivo estacional, la depresión bipolar BP I, la depresión bipolar BP II o la depresión mayor con distimia.

20

25

En otro modo de realización, el trastorno de ansiedad es la ansiedad generalizada, trastorno de pánico, fobia, trastorno de estrés postraumático, el trastorno obsesivo-compulsivo, la ansiedad por separación o la ansiedad infantil.

En un modo de realización, el procedimiento comprende, además, administrar periódicamente al sujeto una cantidad de un segundo agente que aumenta el BDNF.

30

En un modo de realización, la cantidad del segundo agente que aumenta el BDNF, cuando se toma en solitario, no es eficaz para aumentar el nivel en suero de BDNF en el sujeto.

En un modo de realización, la administración del laquinimod precede sustancialmente a la administración del segundo agente que aumenta el BDNF. En otro modo de realización, la administración del segundo agente que aumenta el BDNF precede sustancialmente a la administración del laquinimod.

35

En un modo de realización, el efecto sobre el sujeto es mayor que el efecto sobre un sujeto tratado con el segundo agente que aumenta el BDNF en solitario. En otro modo de realización, el aumento en el nivel en suero de BDNF en el sujeto es mayor que el aumento en el nivel en suero de BDNF en un sujeto tratado con el segundo agente que aumenta el BDNF en solitario.

40

En un modo de realización, la sal farmacéuticamente aceptable de laquinimod es laquinimod de sodio.

En un modo de realización, el diagnóstico del sujeto anterior a la administración excluía esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de la insulina, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, asma, aterosclerosis, apoplejía y enfermedad de Alzheimer.

La presente solicitud también proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto humano que padece una enfermedad relacionada con el BDNF, seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, trastornos depresivos, trastornos de ansiedad, retinitis pigmentosa, disfunción eréctil, trastornos de la memoria, síndrome de Rett, enfermedad de Alzheimer, trastorno bipolar e hipermanía, que comprende administrar periódicamente laquinimod o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad eficaz para tratar al sujeto humano.

45

La presente solicitud también proporciona el uso de laquinimod en la fabricación de un medicamento para aumentar el nivel en suero de BDNF en un sujeto humano.

50

La presente solicitud también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de laquinimod eficaz para su uso en el aumento del nivel en suero de BDNF en un sujeto humano.

La presente solicitud también proporciona una preparación farmacéutica que comprende una cantidad de laquinimod y una cantidad de un segundo agente que aumenta el BDNF, eficaz para su uso en el aumento del nivel en suero de BDNF en un sujeto humano.

5 Para los modos de realización anteriores, cada modo de realización divulgado en el presente documento se contempla como aplicable a cada uno de los otros modos de realización divulgados.

Términos

Como se usa en el presente documento, y a menos que se establezca de otro modo, cada uno de los siguientes términos tendrá la definición establecida a continuación.

10 Como se usa en el presente documento, "administrar al sujeto" significa la entrega de, la dispensación de, o la aplicación de medicamentos, fármacos o remedios a un sujeto para aliviar o curar una afección patológica. La administración oral es una forma de administración de los presentes compuestos al sujeto.

Como se usa en el presente documento, "BDNF" significa el factor neurotrófico derivado del cerebro, un factor neurotrófico que pertenece a la familia de las neurotrofinas de factores de crecimiento.

15 Como se usa en el presente documento, una "enfermedad relacionada con el BDNF" es una enfermedad en la que un paciente que padece la enfermedad tiene niveles en suero de BDNF que son más bajos que los de un individuo sano correspondiente y/o una enfermedad en la que la elevación de BDNF en un paciente que padece la enfermedad puede estar asociada con una mejora de la enfermedad o de los síntomas de la misma.

20 Como se usa en el presente documento, un "agente que aumenta el BDNF" es cualquier agente que eleva directa o indirectamente el nivel de BDNF en un sujeto. Por ejemplo, un agente que aumenta el BDNF puede ser riluzol o un antidepresivo, tal como fluoxetina. Como se usa en el presente documento, el término "agente" incluye cualquier molécula, compuesto, proteína, péptido, polipéptido, ácido nucleico, anticuerpo o fármaco o cualquier combinación de los mismos.

25 Como se usa en el presente documento, una "cantidad" o "dosis" de laquinimod, medida en miligramos, se refiere a los miligramos de ácido de laquinimod presentes en una preparación, independientemente de la forma de la preparación. Por ejemplo, 0,6 mg de laquinimod significa que la cantidad de ácido de laquinimod en una preparación es de 0,6 mg, independientemente de la forma de la preparación. Por lo tanto, cuando está en forma de una sal, por ejemplo, sal de sodio de laquinimod, el peso de la forma de sal necesaria para proporcionar una dosis de 0,6 mg de laquinimod sería mayor que 0,6 mg, debido a la presencia del ión adicional de la sal, pero sería una cantidad equivalente molar.

30 Como se usa en el presente documento, "eficaz", como en una cantidad eficaz para conseguir un fin, significa la cantidad de un componente que es suficiente para proporcionar una respuesta terapéutica indicada sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica) acorde con una proporción razonable de beneficio/riesgo cuando se usa en la manera de esta divulgación. Por ejemplo, una cantidad eficaz para tratar un síntoma de un trastorno o enfermedad sin causar efectos secundarios adversos indebidos. La cantidad eficaz específica variará con factores tales como la afección particular que se esté tratando, el estado físico del paciente, el tipo de mamífero que se esté tratando, la duración del tratamiento, la naturaleza del tratamiento concurrente (si lo hay) y las formulaciones específicas empleadas y la estructura de los compuestos o sus derivados.

35 Una "sal" es la sal de los presentes compuestos que se han modificado preparando sales de ácidos o bases de los compuestos. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" en este sentido, se refiere a las sales de adición de ácidos o de bases inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas, de compuestos de la presente invención.

40 Se puede usar una sal farmacéuticamente aceptable de laquinimod. Una sal farmacéuticamente aceptable de laquinimod, como se usa en la presente solicitud, incluye litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, manganeso, cobre, cinc, aluminio y hierro. Se describen formulaciones de sal de laquinimod y el procedimiento para preparar las mismas, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2005-0192315 y publicación de la solicitud internacional PCT n.º WO 2005/074899, que se incorporan por la presente por referencia en la presente solicitud.

45 Como se usa en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" engloba, por ejemplo, inducir la inhibición, la regresión o la estasis del trastorno y/o la enfermedad. Como se usa en el presente documento, "inhibición" de la progresión de la enfermedad o complicaciones de la enfermedad en un sujeto significa prevenir o reducir la progresión de la enfermedad y/o las complicaciones de la enfermedad en el sujeto.

50 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o excipiente que es adecuado para su uso con seres humanos y/o animales sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) acorde con una proporción razonable de beneficio/riesgo. Puede ser un disolvente, agente de suspensión o vehículo farmacéuticamente aceptable, para suministrar los presentes compuestos al sujeto.

Una unidad de dosificación, como se usa en el presente documento, puede comprender un único compuesto o mezclas de compuestos de los mismos. Una unidad de dosificación se puede preparar para formas orales de dosificación, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos y gránulos.

5 El laquinimod se puede administrar en mezcla con diluyentes, disolventes, excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados (denominados colectivamente en el presente documento como un vehículo farmacéuticamente aceptable) adecuadamente seleccionados con respecto a la forma pretendida de administración y de forma coherente con las prácticas farmacéuticas convencionales. La unidad puede estar en una forma adecuada para la administración oral. El laquinimod se puede administrar en solitario, pero en general se mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y se coadministra en la forma de un comprimido o cápsula, liposoma, o como un polvo aglomerado. Ejemplos de vehículos sólidos adecuados incluyen lactosa, sacarosa, gelatina y agar. Las cápsulas o comprimidos se pueden formular fácilmente y se pueden hacer fáciles de tragar o masticar; otras formas sólidas incluyen gránulos y polvos a granel. Los comprimidos pueden contener aglutinantes, lubricantes, diluyentes, agentes disgregantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes inductores de flujo y agentes de fusión adecuados.

10

15 Se describen ejemplos específicos de las técnicas, vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables que se pueden usar para formular formas orales de dosificación de la presente invención, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2005/0192315, las publicaciones de las solicitudes internacionales PCT n.º WO 2005/074899, WO 2007/047863 y WO 2007/146248, cada uno de las cuales se incorpora por la presente por referencia en la presente solicitud.

20 Las técnicas generales y composiciones para preparar formas de dosificación útiles en la presente invención se describen en las siguientes referencias: 7 Modern Pharmaceutics, capítulos 9 y 10 (Banker y Rhodes, Editores, 1979); Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets (Lieberman et al., 1981); Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms 2ª edición (1976); Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed. (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985); Avances in Pharmaceutical Sciences (David Ganderton, Trevor Jones, Eds., 1992); Avances in Pharmaceutal Sciences Vol. 7 (David Ganderton, Trevor Jones, James McGinity, Eds., 1995); Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Serie 36 (James McGinity, Ed., 1989); Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol 61 (Alain Rolland, Ed., 1993); Drug Delivery to the Gastrointestinal Tract (Ellis Horwood Books in the Biological Sciences. Series in Pharmaceutical Technology; J. G. Hardy, S. S. Davis, Clive G. Wilson, Eds.); Modern Pharmaceutics Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol. 40 (Gilbert S. Banker, Christopher T. Rhodes, Eds.). Estas referencias en su totalidad se incorporan en la presente como referencia en la presente solicitud.

25

30

Los comprimidos pueden contener aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes inductores de flujo y agentes de fusión adecuados. Por ejemplo, para administración oral en la forma de unidad de dosificación de un comprimido o cápsula, el componente de fármaco activo se puede combinar con un vehículo oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, inerte tal como lactosa, gelatina, agar, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, manitol, sorbitol, celulosa microcristalina y similares. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, almidón de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, povidona, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, ácido esteárico, estearilfumarato de sodio, talco y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana, croscarmelosa de sodio, almidón glicolato de sodio y similares.

35

40

Se entiende que, cuando se proporciona un intervalo de parámetros, todos los números enteros dentro de ese intervalo, y las décimas de los mismos, también se proporcionan por la invención. Por ejemplo, "0,1 mg-40,0 mg" incluye 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, etc. hasta 40,0 mg.

45

La presente invención se entenderá mejor por referencia a los detalles experimentales que siguen, pero los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los experimentos específicos detallados son sólo ilustrativos de la invención como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen después.

Detalles experimentales

50 **EJEMPLO 1: Ensayo clínico que muestra el efecto de laquinimod en los niveles de BDNF en sujetos humanos afectados por esclerosis múltiple remitente recidivante**

Se inició un estudio en pacientes con esclerosis múltiple remitente recidivante (EMRR) usando laquinimod, 0,6 mg al día, en forma de la sal de sodio, en una formulación de comprimido oral, una vez al día. El estudio era un estudio multinacional, multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, de grupos paralelos, controlado con placebo para evaluar la eficacia, la tolerabilidad y la seguridad de dos dosis de laquinimod en sujetos con EMRR. Los sujetos elegibles se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes tres grupos:

55

1. 0,6 mg de laquinimod por vía oral (p.o.) una vez al día;

2. 0,3 mg de laquinimod por vía oral (p.o.) una vez al día; y
3. Placebo concordante, por vía oral (p.o.) una vez al día.

Los sujetos deben cumplir los siguientes criterios de inclusión para incluirlos en el estudio:

1. un diagnóstico de EM confirmada como se define por los criterios de McDonald;
- 5 2. un curso de la enfermedad EMRR;
3. al menos una recidiva documentada en los 12 meses anteriores a la selección;
4. al menos una lesión acentuada por gadolinio en su exploración de RM en la selección;
5. deambulación con una puntuación EDSS de Kurtzke de 1,0-5,0 (modificada);
6. entre 18-50 años de edad inclusive;
- 10 7. libre de recidiva y sin corticoesteroides o ACTH durante al menos 30 días anteriores a la exploración de RM en la selección;
8. libre de recidiva y sin corticoesteroides entre la selección y la distribución aleatoria;
9. las mujeres de edad fértil practican un procedimiento anticonceptivo fiable;
10. dispuestos y capaces de cumplir con los requisitos del protocolo mientras dure el estudio; y
- 15 11. capaces de proporcionar el consentimiento firmado, por escrito e informado antes de entrar en el estudio.

Los sujetos que cumplían cualquiera de los siguientes criterios de exclusión se excluyeron del estudio:

1. padecían alguna forma de EM progresiva;
2. uso de tratamientos inmunosupresores o citotóxicos dentro de los 6 meses anteriores a la visita de selección (incluyendo azatioprina, ciclofosfamida y metotrexato);
- 20 3. uso de fármacos experimentales y/o participación en estudios clínicos de fármacos dentro de los 6 meses anteriores a la selección;
4. tratamiento previo con inmunomoduladores (incluyendo IFN- β 1a y 1b, acetato de glatiramer, laquinimod e IVIG) dentro de los 2 meses anteriores a la selección;
- 25 5. uso de inhibidores potentes de CYP3A4, por ejemplo, cetoconazol y eritromicina por vía oral dentro de 2 semanas anteriores a la visita inicial;
6. uso previo de amiodarona;
7. uso de fluoxetina un mes anterior a la visita inicial;
8. uso de sustratos de CYP1A2 tales como teofilina y warfarina dentro de 2 semanas anteriores a la selección;
9. tratamiento previo con cladribina en los últimos 2 años anteriores a la visita de selección;
- 30 10. sujetos para los que estaría contraindicada la inmunosupresión potencial, por ejemplo, hepatitis B/C o VIH.
11. irradiación corporal total o irradiación linfóide total previa,
12. tratamiento crónico con corticoesteroides (30 o más días consecutivos) dentro de los 2 meses anteriores a la selección;
13. embarazo o lactancia;
- 35 14. sujetos con una afección médica o quirúrgica clínicamente significativa o inestable que impediría la participación segura y completa en el estudio, según lo determinado por la historia clínica, exámenes físicos, ECG, pruebas anormales de laboratorio y radiografía de tórax.
15. incapacidad para dar su consentimiento informado o para completar el estudio, o si el sujeto está considerado por el investigador como un candidato inadecuado para el estudio, por cualquier razón;
- 40 16. antecedentes conocidos de sensibilidad a Gd; o
17. incapacidad de someterse con éxito a exploración de RM.

La duración del estudio fue de 40 semanas y consistía en 2 periodos: 4 semanas de período de selección (semana -4 [selección] a semana 0 [inicio del estudio]) y 36 semanas de tratamiento doble ciego (semana 0 [inicio del estudio] a semana 36 [terminación]).

5 Los sujetos se evaluaron en los sitios de estudio en las semanas -4, 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36. Las muestras para los marcadores inflamatorios se recogieron en todas las visitas entre 0 y 36 semanas.

Se midió la concentración BDNF en el suero en los pacientes en el grupo de placebo (102 pacientes estaban en el grupo) y en el grupo laquinimod de 0,6 mg (106 pacientes estaban en el grupo) en la semana 0 (V0), semana 12 (V3) y semana 36 (V9). El análisis del contenido de BDNF en el plasma se realizó usando el procedimiento de ELISA de tipo sándwich. La concentración de BDNF en el suero se expresa en términos de pg/ml.

10 **Resultados**

Los resultados en las tablas a continuación representan los niveles medios de BDNF tanto en el grupo de laquinimod de 0,6 mg/día como en el grupo de placebo.

Valores iniciales (en V0)

Tabla 1: Media y desviaciones estándar

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Media estándar	Error inferior al 95 %	Error superior al 95 %
Placebo	95	14110,7	6432,61	659,97	12800	15421
Laquinimod 0,6 mg	96	13892,7	7267,89	741,78	12420	15365

15 Tabla 2: Prueba t

Laquinimod 0,6 mg-placebo - Asumiendo varianzas desiguales

Diferencia	-218,0	Proporción t	-0,2196
Dif. error estándar	922,9	DF	186,6984
Dif. CL superior	1740,7	Prob > t	0,8264
Dif. CL inferior	-2176,7	Prob > t	0,5868
Confianza	0,95	Prob < t	0,4132

Valores de la semana 12 (en V3)

Tabla 3: Medias y desviaciones estándar

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Media estándar	Error inferior al 95 %	Error superior al 95 %
Placebo	96	13073,9	5712,02	582,98	11916	14231
Laquinimod 0,6 mg	100	15519,6	7204,47	720,45	14090	16949

Tabla 4: Prueba t

20 Laquinimod 0,6 mg-placebo - Asumiendo varianzas desiguales

Diferencia	2445,70	Proporción t	2,638935
Dif. error estándar	926,77	DF	187,3752
Dif. CL superior	4273,95	Prob > t	0,0090*
Dif. CL inferior	617,44	Prob > t	0,0045*
Confianza	0,95	Prob < t	0,9955

Valores de la semana 36 (en V9)

Tabla 5: Media y desviaciones estándar

Nivel	Número	Media	Desviación estándar	Media estándar	Error inferior al 95 %	Error superior al 95 %
Placebo	92	12783,6	6017,17	627,33	11538	14030
Laquinimod 0,6 mg	92	15335,8	6699,89	698,51	13948	16723

Tabla 6: Prueba t

Laquinimod 0,6 mg-placebo - Asumiendo varianzas desiguales

Diferencia	2552,21	Proporción t	2,718403
Dif. error estándar	938,86	DF	179,9376
Dif. CL superior	4404,81	Prob > t	0,0072*
Dif. CL inferior	699,61	Prob > t	0,0036*
Confianza	0,95	Prob < t	0,9964

Partiendo de V3 hay una elevación estadísticamente significativa de BDNF (al nivel de confianza del 95 %) entre el grupo de placebo y el grupo de laquinimod de 0,6 mg. La diferencia también fue estadísticamente significativa en V9.

5 El laquinimod es eficaz en el modelo experimental de encefalomiелitis autoinmunitaria (EAEa), y actualmente se está probando en pacientes con EM (en ensayo clínico de fase III), lo que sugiere, por lo tanto, la posibilidad de su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM). El laquinimod también es eficaz en aumentar los niveles de BDNF en los pacientes.

10 La capacidad del laquinimod de aumentar los niveles de BDNF es inesperada. No se ha establecido una conexión por sí misma entre el tratamiento de EM y el aumento de los niveles de BDNF. No todos los agentes que son eficaces en el tratamiento de EM son eficaces en la elevación de los niveles de BDNF. Un estudio reciente mostró que el tratamiento con interferón- β 1a e inmunoglobulinas, incluso después de 12 meses, e incluso en pacientes con EM que se benefician del tratamiento, no mostraba un aumento en los niveles en plasma de BDNF (Sarchielli, 2007). El hallazgo de que el laquinimod eleva los niveles de BDNF en pacientes después de sólo 12 semanas de tratamiento es inesperado.

15 EJEMPLO 2: El laquinimod muestra actividad antidepresiva en modelos de ratones - la prueba de natación forzada (PNF)

20 Los trastornos de depresión y ansiedad son afecciones onerosas con tasas de prevalencia de por vida de aproximadamente un 7-20 %. Los modelos animales son herramientas indispensables en la búsqueda para identificar nuevos fármacos antidepresivos. Diversos paradigmas se han desarrollado y son fundamentales en la detección del potencial antidepresivo de novedosos compuestos en entornos preclínicos (Cryan, 2002; Ganbarana, 2001).

La prueba de natación forzada (PNF) es una de las herramientas más ampliamente usadas para detectar actividad antidepresiva de forma preclínica. La prueba aguda se describió por primera vez por Porsolt et al. (1977).

25 La prueba se basa en la observación de que las ratas y los ratones desarrollan una postura inmóvil cuando se colocan en un cilindro ineludible de agua. Se considera que este comportamiento es una desesperación conductual en oposición a la forma activa de hacer frente a condiciones de estrés. Un antidepresivo reducirá la inmovilidad y aumentará el comportamiento motivado del roedor para escapar de las condiciones desesperadas. Esto se evidencia por el aumento en el tiempo de la natación, la distancia recorrida, la velocidad y los intentos por escalar por las paredes (fuerte movilidad).

30 La PNF está considerada como una herramienta de detección con una alta fiabilidad y validez predictiva. La prueba se puede realizar en ratones y ratas.

35 En el ejemplo 2.1 y 2.2 descritos a continuación, la PNF se realizó en ratones macho (Balb/c Harlan IL) después de 3 días de administración del fármaco, 90 minutos después de la última administración del fármaco. Se usaron cilindros redondos de vidrio de 18 cm de diámetro y 20 cm de profundidad. La temperatura del agua era de 24-28 °C. El comportamiento motivado se definió por inmovilidad, natación y fuerte movilidad.

40 La inmovilidad en los animales se definió por una actividad inferior a un 10 % de movimiento del centro de gravedad del animal, como se determina por el sistema Noldus. La natación se definió por la distancia y la velocidad del animal, y la escalada se relacionó con la fuerte movilidad (movimiento del centro de gravedad más de un 30 %). Los animales se liberaron en el cilindro durante 6 minutos y la puntuación se realizó en los últimos 4 minutos después de 2 minutos de adaptación.

Todos los resultados se analizaron mediante el sistema Noldus (Holanda) que incluye una cámara y un software para los análisis de comportamiento de los animales.

Ejemplo 2.1

45 Los ratones Balb/c se dividieron en 6 grupos (5/grupo) y se les administró diariamente durante 3 días laquinimod (1, 5, 10 y 2 5 mg/kg por vía oral en forma de solución de laquinimod de sodio a través de sonda oral), fluoxetina (control positivo 10 mg/kg por vía oral) o vehículo. En el tercer día, 90 min después de la administración, los ratones se expusieron a la prueba de natación forzada. El comportamiento se grabó en vídeo y se analizó usando el software Ethovision (Noldus Holanda). El resultado se muestra en la Fig. 4.

Conclusión:

Los resultados muestran que el laquinimod mostró una actividad antidepresiva significativa, que se expresa por la movilidad aumentada y la inmovilidad reducida a 1 mg/kg, y una tendencia a la significancia a dosis más altas (laquinimod a 25 mg/kg). En este experimento, el control positivo de fluoxetina no mostró efecto significativo, debido posiblemente a condiciones no óptimas de tiempo y de dosis.

Ejemplo 2.2

Los ratones Balb/c se dividieron en 6 grupos (5 ratones/grupo) y se les administró laquinimod diariamente durante 3 días con (0,5, 1, 5 y 25mg/kg p.o. en forma de solución de laquinimod de sodio a través de sonda oral), fluoxetina (control positivo 10 mg/kg p.o.) o vehículo. En el tercer día, 90 minutos después de la administración, los ratones se expusieron a la prueba de natación forzada. El comportamiento se grabó en vídeo y se analizó usando el software Ethovision (Noldus Holanda). El resultado se muestra en la Fig. 5.

Conclusión:

Los resultados muestran que el laquinimod mostró una actividad antidepresiva significativa, que se expresa por la movilidad aumentada y la inmovilidad reducida a 5 y 25 mg/kg. El control positivo de fluoxetina mostró una tendencia a la misma actividad. Esto es debido posiblemente a condiciones no óptimas de tiempo y de dosis.

EJEMPLO 3: El laquinimod muestra actividad ansiolítica en modelos de ratón - la prueba de campo abierto

Los trastornos de ansiedad son términos colectivos que cubren varias formas diferentes de miedo y ansiedad anormal y patológica. Los criterios de diagnóstico psiquiátrico actuales reconocen una amplia variedad de trastornos de ansiedad. Estudios recientes han encontrado que hasta un 18 % de los estadounidenses puede verse afectado por uno o más de ellos (Kessler et al.). Los trastornos se dividen en varias clases que incluyen: ansiedad generalizada, trastornos de pánico, fobias, trastornos de estrés postraumático (TEPT), trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), ansiedad de separación y ansiedad infantil.

Los fármacos antidepresivos administrados crónicamente, particularmente inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (5-HT) (SSRI), son clínicamente eficaces en el tratamiento de todos los trastornos de ansiedad, incluyendo trastorno de estrés postraumático (TEPT) y trastorno obsesivo-compulsivo (TOC). Mientras que la eficacia clínica de los ansiolíticos tradicionales, como las benzodiazepinas (BZD), está limitada al trastorno de ansiedad generalizada o ataques agudos de pánico (Borsini et al.). Por lo tanto, el efecto ansiolítico potencial de los antidepresivos es de gran relevancia.

La prueba de campo abierto - actividad locomotora exploratoria usada en los Ejemplos 3.1 y 3.2 descritos a continuación es uno de los más populares en la evaluación del comportamiento de los animales. Pone a prueba tanto los parámetros de motilidad como la ansiedad (Prut et al.). Un ratón individual se coloca en una novedosa pista circular de plexiglás de 50 x 50cm cuyo suelo está dividido en 3 zonas digitales: la zona externa periférica 1, la zona media 2 y la zona más central 3. El comportamiento del animal en el campo abierto se registra por grabación en vídeo durante 20 minutos y posteriormente se analiza digitalmente usando el software Noldus para el comportamiento animal. Las mediciones incluyen la motilidad general (distancia recorrida, la velocidad y fuerte movilidad) y los parámetros de ansiedad (incluyendo la frecuencia de las visitas al área central, el tiempo transcurrido en el campo interno y el número de eventos de ponerse a dos patas en el centro). Cuanto más tiempo permanece y actúa el animal en el centro, menos ansioso está.

Ejemplo 3.1

Los ratones Balb/c macho se dividieron en 6 grupos (5/grupo) y se les administró laquinimod (1, 5, 10 y 25 mg/kg p.o. en forma de solución de laquinimod de sodio a través de sonda oral), fluoxetina (control positivo 10 mg/kg p.o.) o vehículo diariamente durante 3 días. En el tercer día, 90 min después de la administración, los ratones se expusieron al campo abierto durante 20 min. El comportamiento se grabó en vídeo y se analizó usando el software Ethovision (Noldus Holanda). Los resultados con respecto a los parámetros de motilidad se muestran en la **Fig. 6**. Los resultados con respecto a los parámetros de ansiedad se muestran en las **Fig. 7 y 8**.

Conclusión:

Parámetros de motilidad - el laquinimod y la fluoxetina no modificaron significativamente los parámetros de motilidad en el campo en este modelo.

Parámetros de ansiedad (zona 2) - los animales tratados con laquinimod y con fluoxetina tendían actuar más en el centro en términos de frecuencia, tiempo transcurrido, distancia recorrida y el número de elevaciones a dos patas. Los resultados muestran que 1 mg/kg y 5 mg/kg eran las más potentes.

Parámetros de ansiedad (zonas 2 y 3) - los animales tratados con laquinimod tendían a actuar más en el centro, como se evidencia por el tiempo transcurrido, la distancia recorrida y el número de elevaciones a dos patas. Los resultados muestran que 1 mg/kg fue la dosificación más potente de laquinimod en este experimento.

Este modelo muestra que el laquinimod muestra efectos ansiolíticos.

Ejemplo 3.2

5 Los ratones Balb/c macho se dividieron en 6 grupos (5/grupo) y se les administró laquinimod (0,5, 1, 5 y 25mg/kg p.o. en forma de solución de laquinimod de sodio a través de sonda oral), fluoxetina (control positivo 10 mg/kg p.o.) o vehículo diariamente durante 3 días. En el tercer día, 90 min después de la administración, los ratones se expusieron al campo abierto durante 20 minutos. El comportamiento se grabó en vídeo y se analizó usando el software Ethovision (Noldus Holanda). Los resultados de los parámetros de motilidad se muestran en la **Fig. 9**. Los resultados de los parámetros de ansiedad se muestran en la **Fig. 10**.

Conclusión:

10 Parámetros de motilidad - laquinimod (0,5-25 mg/kg/dx3d p.o.) indujo un ligero aumento en la motilidad (0,5-5 mg/kg) en el campo abierto en ratones Balb/c.

Parámetros de ansiedad - los animales tratados con laquinimod (0,5-5 mg/kg p.o.) y con fluoxetina (10 mg/kg p.o.) actuaron significativamente más en el centro, a juzgar por la frecuencia, el tiempo transcurrido y el número de elevaciones a dos patas. 5 mg/kg fue la más potente.

15 Este modelo muestra que el laquinimod muestra efectos ansiolíticos.

EJEMPLO 4: El laquinimod muestra actividad ansiolítica en modelo de ratón - laberinto en cruz elevado (LCE)

20 El modelo de LCE usado en los Ejemplos 4.1 y 4.2 descritos a continuación utiliza el miedo natural de los roedores a evitar lugares abiertos y elevados. El aparato consiste en un laberinto en cruz con dos brazos cerrados y dos opuestos abiertos, elevado por encima del suelo. Los animales ingenuos pasan sólo aproximadamente un 30 % del tiempo de la prueba en los brazos abiertos, mientras que el tratamiento con benzodiazepinas aumenta significativamente la exploración en los brazos abiertos (Pellow et al.). Este es uno de los modelos más ampliamente usados para estudiar los efectos del comportamiento de ansiedad.

25 El laberinto consistía en dos brazos opuestos abiertos (40 x 10 cm) y dos brazos cerrados opuestos (40 x 10 cm, con paredes de 40 cm) sobre una plataforma de 50 cm por encima del suelo. Los ratones se colocaron en el cuadrante central (10 x 10 cm) frente a un brazo abierto y se grabaron en vídeo durante una exploración de 5 min. Se puntuaron las entradas en los brazos y la duración cuando las cuatro patas entraban en el brazo.

Ejemplo 4.1

30 Los ratones Balb/c macho se dividieron en 6 grupos (5/grupo) y se les administró laquinimod (0,5, 1, 5 y 25mg/kg p.o. en forma de solución de laquinimod de sodio a través de sonda oral), fluoxetina (control positivo 10 mg/kg p.o.) o vehículo diariamente durante 3 días. En el tercer día, 90 min después de la administración, los ratones se expusieron al LCE durante 5 minutos. Los ratones se colocaron en el cuadrante central (10 x 10 cm) frente a un brazo abierto y se grabaron en vídeo durante una exploración de 5 minutos. Se puntuaron las entradas en los brazos y la duración cuando las cuatro patas entraban en el brazo. El comportamiento se grabó en vídeo y se analizó usando el software Ethovision (Noldus Holanda). Los resultados se muestran en la **Fig. 11**.

35 Conclusión:

Los ratones tratados con laquinimod muestran actividad ansiolítica de una manera dependiente de la dosis. El efecto máximo se obtuvo con la dosis de 25 mg/kg p.o.

Ejemplo 4.2

40 Los ratones Balb/c macho se dividieron en 6 grupos (5/grupo) y se les administró laquinimod (0,5, 1, 5 y 25mg/kg p.o. en forma de solución de laquinimod de sodio a través de sonda oral), fluoxetina (control positivo 10 mg/kg p.o.) o vehículo diariamente durante 3 días. En el tercer día, 90 min después de la administración, los ratones se expusieron al LCE durante 5 min. El comportamiento se grabó en vídeo y se analizaron los parámetros de los brazos abiertos usando el software Ethovision (Noldus Holanda). Los resultados se muestran en la **Fig. 12**.

Conclusión:

45 Los ratones tratados con laquinimod muestran actividad ansiolítica de una manera dependiente de la dosis. El efecto máximo se obtuvo con 5-25 mg/kg p.o.

Referencias

1. Publicación de la solicitud internacional PCT n.º WO 2007/047863, publicada el 26 de abril de 2007, fecha de presentación internacional de 18 octubre de 2006.
2. Publicación de la solicitud internacional PCT n.º WO 2007/146248, publicada el 21 de diciembre de 2007, fecha de presentación internacional de 12 junio de 2007.
3. Acheson, A, et al. (1995). "A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death". Nature, 374(6521):450-3.
4. Alonso, M, et al. (2005) "Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex". Learning & Memory, 12:504-510.
5. Amaral, MD, et al. (2007) "TRPC channels as novel effectors of BDNF signaling: Potential implications for Rett syndrome". Pharmacol Ther, 113(2):394-409.
18. Borsini F, et al. (2002) "Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants?" Psychopharmacology. 163:121-41.
6. Caffè Romeo, A, et al. (2001) "A combination of CNTF and BDNF rescues rd photoreceptors but changes rod differentiation in the presence of RPE in retinal explants". Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42:275-82.
7. Chesselet, MF (2003) "Dopamine and Parkinson's disease: is the killer in the house?" Molecular Psychiatry, 8:369-370.
8. Ciammola, A, et al. (2007) "Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients". Am J Med Genet Part B, 144b:574-577.
9. Cryan JF, et al. (2002) "Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs". Trend in Pharmacological Science. 23:238-45.
10. Gambarana, C, et al. (2001) "Animal models for the study of antidepressant activity". Brain Res. Protocol. 7:11-20.
11. Howells, DW, et al. (2000) "Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra". Experimental Neurology, 166(1):127-135.
12. Huang, EJ and Reichardt, LF (2001) "Neurotrophins: roles in neuronal development and function". Annu. Rev. Neurosci, 24:677-736.
13. Hyman, C. et al., (1991) "BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic, neurons of the substantia nigra". Nature, 350(6315):230-2.
14. Kato-Semba, R, et al. (2002) "Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus". FASEB J, 16:1328-30.
19. Kessler RC, et al. (junio de 2005) "Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication". Arch. Gen. Psychiatry. 62(6):617-27.
15. Molteni, R, et al. (2006) "Abstract: Chronic treatment with fluoxetine [Prozac®] up-regulates cellular BDNF mRNA expression in rat dopaminergic regions". Int J Neuropsychopharmacol. 9(3):307-17.
16. Monteggia, LM (2007) "Elucidating the role of brain-derived neurotrophic factor in the brain". Am J Psychiatry, 164:1790.
20. Pellow S, et al. (1985) "Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat". J Neurosci Methods. 14:149-167.
21. Porsolt R.D., et al. (1977) "Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants". Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 229: 327-33 6.
22. Prut L, y Belzung C. (2003) "The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review". Eur J Pharmacol. 463:3-33.
17. Riviere, M (1998) "An analysis of extended survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis treated with riluzole". Arch Neurol, 55:526-8.
18. Sarchielli, P, et al. (2007) "Production of Brain-derived neurotrophic factor by mononuclear cells of patients with multiple sclerosis treated with glatiramer acetate, interferon- β , and high doses of immunoglobulins". Multiple

Sclerosis, 13:313-331.

19. Sen, S, et al. (2008) "Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications". Biol Psychiatry, 64:527-532.
20. Snider, et al., (1989) "Neurotrophic molecules". Ann Neurol, 26 (4): 489-506.
- 5 21. Tramontina, JF, et al. (2009) "brain-derived neurotrophic factor serum levels before and after treatment for acute mania". Neuroscience Letters, 452:111-3.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Laquinimod o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad eficaz para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que padece una enfermedad relacionada con el BDNF, que es la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, un trastorno depresivo, un trastorno de ansiedad, la retinitis pigmentosa, la disfunción eréctil, un trastorno de la memoria, el síndrome de Rett, el trastorno bipolar o hipermanía, en el que el laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable se formula para administración periódica al sujeto.
2. Laquinimod o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 1, en el que la administración periódica comprende administración una vez al día.
- 10 3. Laquinimod o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que la administración periódica continúa durante al menos 3 días.
4. Laquinimod o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la cantidad de laquinimod o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo es de 0,1 mg/día-40,0 mg/día.
- 15 5. Laquinimod o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 4, en el que la cantidad de laquinimod o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo es de 0,6 mg/día.
6. Laquinimod o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el laquinimod o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se formula para administrarse por vía oral.
- 20 7. Laquinimod o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la enfermedad relacionada con el BDNF es un trastorno depresivo y el trastorno depresivo es la depresión, la depresión en pacientes con cáncer, la depresión en un paciente con enfermedad de Parkinson, la depresión posterior a infarto de miocardio, la depresión en un paciente con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la depresión sintomática subsindrómica, la depresión en una mujer estéril, la depresión pediátrica, la depresión mayor, la depresión de un único episodio, la depresión recidivante, la depresión inducida por abusos a los niños, la depresión posparto, la depresión mayor según el DSM-IV, la depresión mayor refractaria al tratamiento, la depresión severa, la depresión psicótica, la depresión posterior a apoplejía, el dolor neuropático, la enfermedad maniaco-depresiva incluyendo enfermedad maniaco-depresiva con episodios mixtos y enfermedad maniaco-depresiva con episodios de depresión, el trastorno afectivo estacional, la depresión bipolar BP I, la depresión bipolar BP II o la depresión mayor con distimia.
- 25 8. Laquinimod o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la enfermedad relacionada con el BDNF es un trastorno de ansiedad y el trastorno de ansiedad es la ansiedad generalizada, el trastorno de pánico, la fobia, el trastorno de estrés postraumático, el trastorno obsesivo-compulsivo, la ansiedad por separación o la ansiedad infantil.
- 30 9. Laquinimod o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además administrar periódicamente al sujeto un segundo agente que aumenta el BDNF, que es riluzol o fluoxetina.
- 35 10. Laquinimod o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la sal farmacéuticamente aceptable de laquinimod es laquinimod de sodio.
- 40 11. Uso de laquinimod en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto humano que padece una enfermedad relacionada con el BDNF, que es la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, un trastorno depresivo, un trastorno de ansiedad, la retinitis pigmentosa, la disfunción eréctil, un trastorno de la memoria, el síndrome de Rett, el trastorno bipolar o la hipermanía.
- 45 12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de laquinimod para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que padece una enfermedad relacionada con el BDNF, que es la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, un trastorno depresivo, un trastorno de ansiedad, la retinitis pigmentosa, la disfunción eréctil, un trastorno de la memoria, el síndrome de Rett, el trastorno bipolar o la hipermanía.
- 50 13. Una preparación farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de laquinimod y una cantidad eficaz de un segundo agente que aumenta el BDNF, que es riluzol o fluoxetina, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que padece una enfermedad relacionada con el BDNF, que es la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, un trastorno depresivo, un trastorno de ansiedad, la retinitis pigmentosa, la disfunción eréctil, un trastorno de la memoria, el síndrome de Rett, el trastorno bipolar o la hipermanía.
14. Laquinimod o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la enfermedad relacionada con el BDNF es la enfermedad de Huntington.

15. Uso de la reivindicación 11 o la composición farmacéutica de la reivindicación 12 o la preparación farmacéutica de la reivindicación 13, en el que la enfermedad relacionada con el BDNF es la enfermedad de Huntington.

FIGURA 1

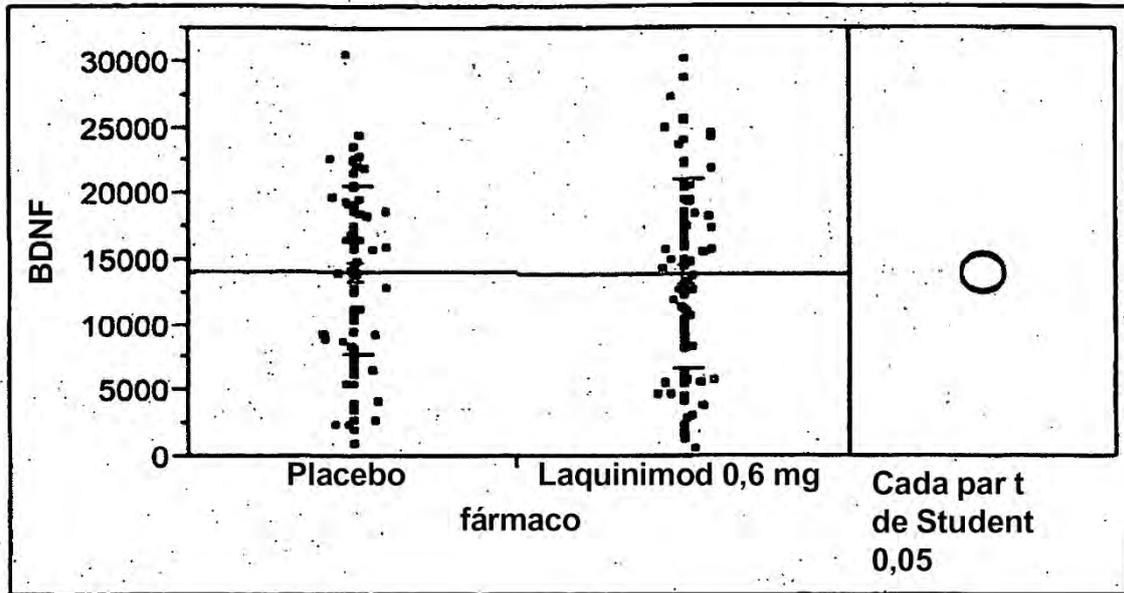


FIGURA 2

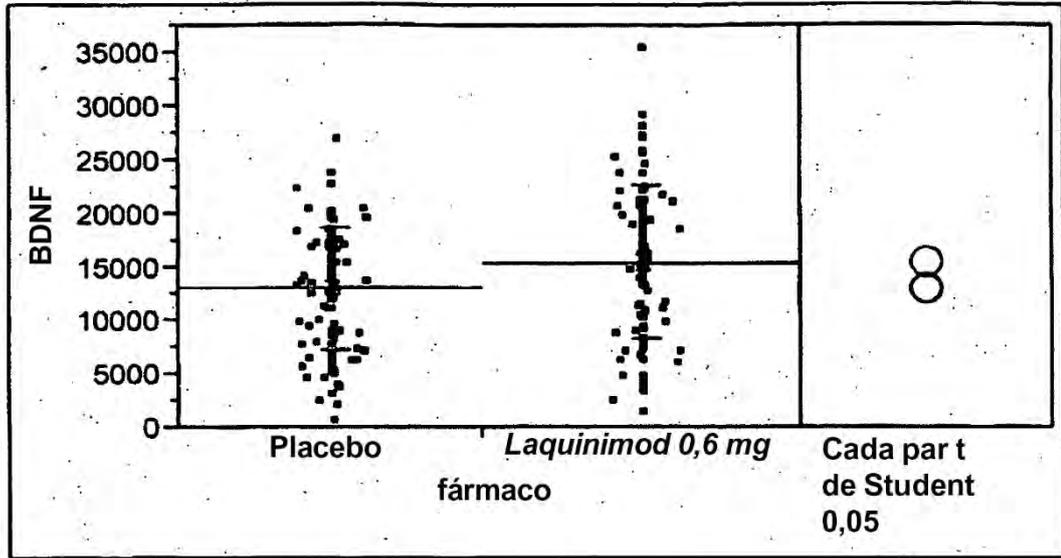


FIGURA 3

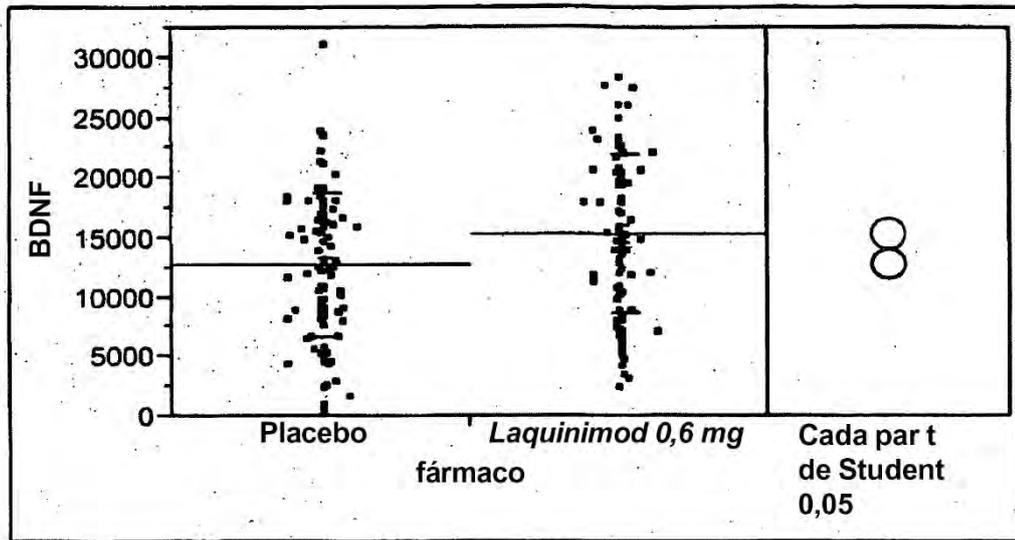


FIGURA 4

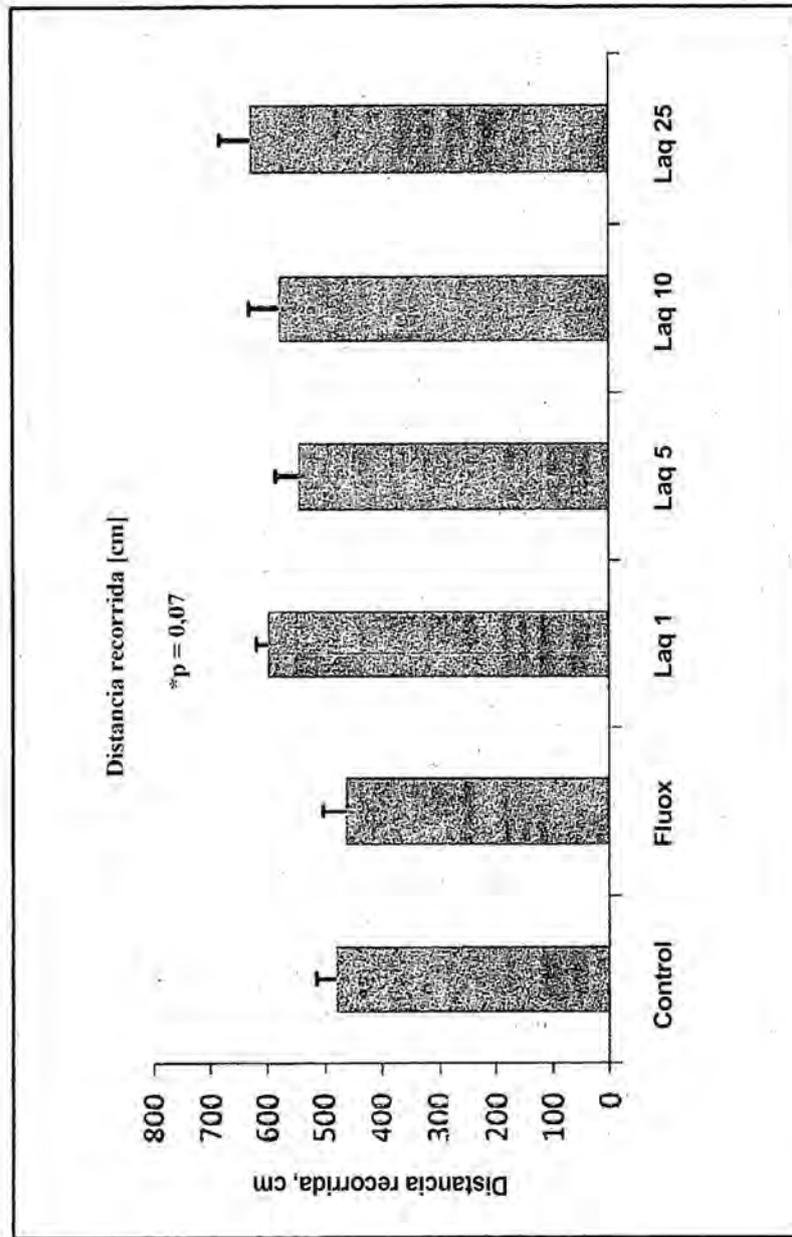


Fig. 4A

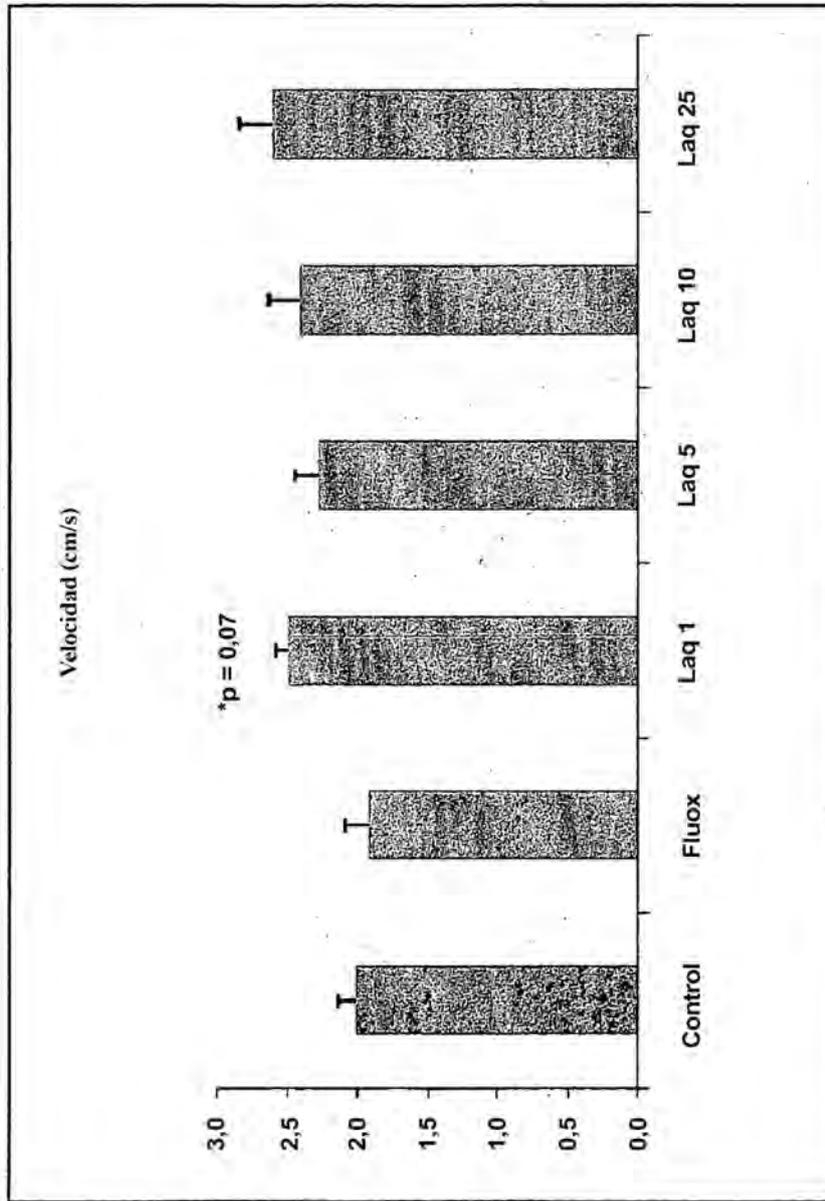


Fig. 4B

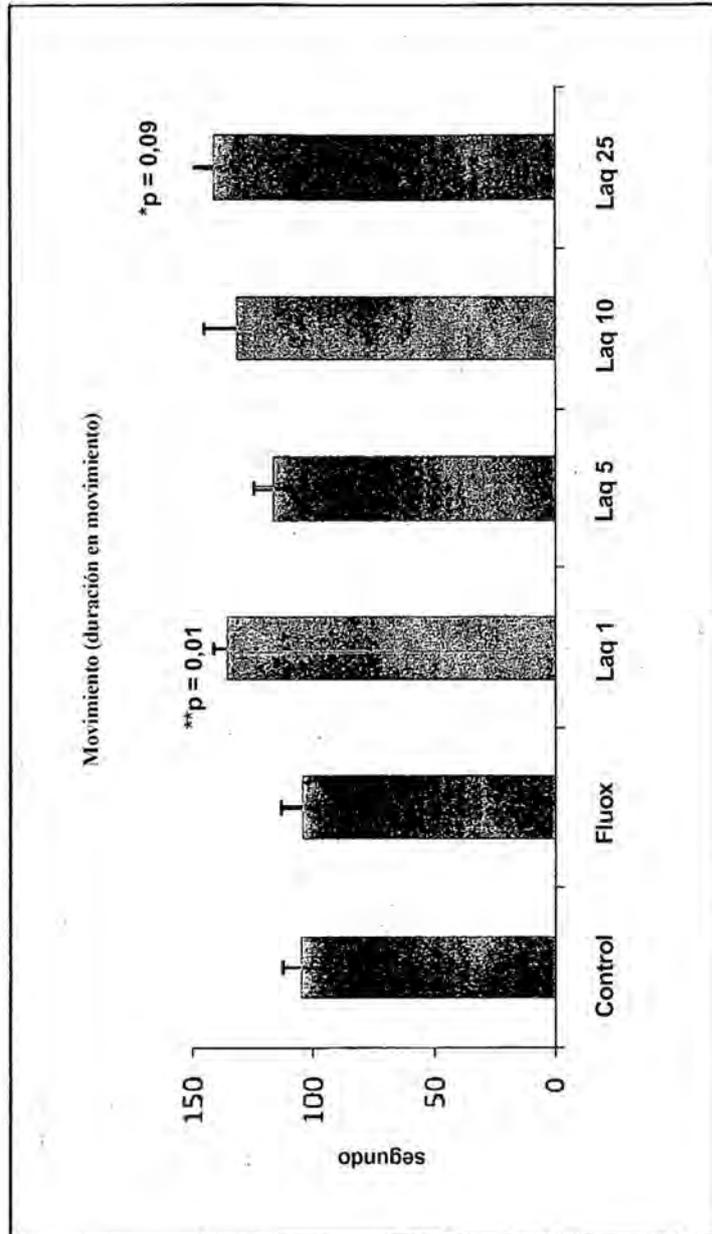


Fig. 4C

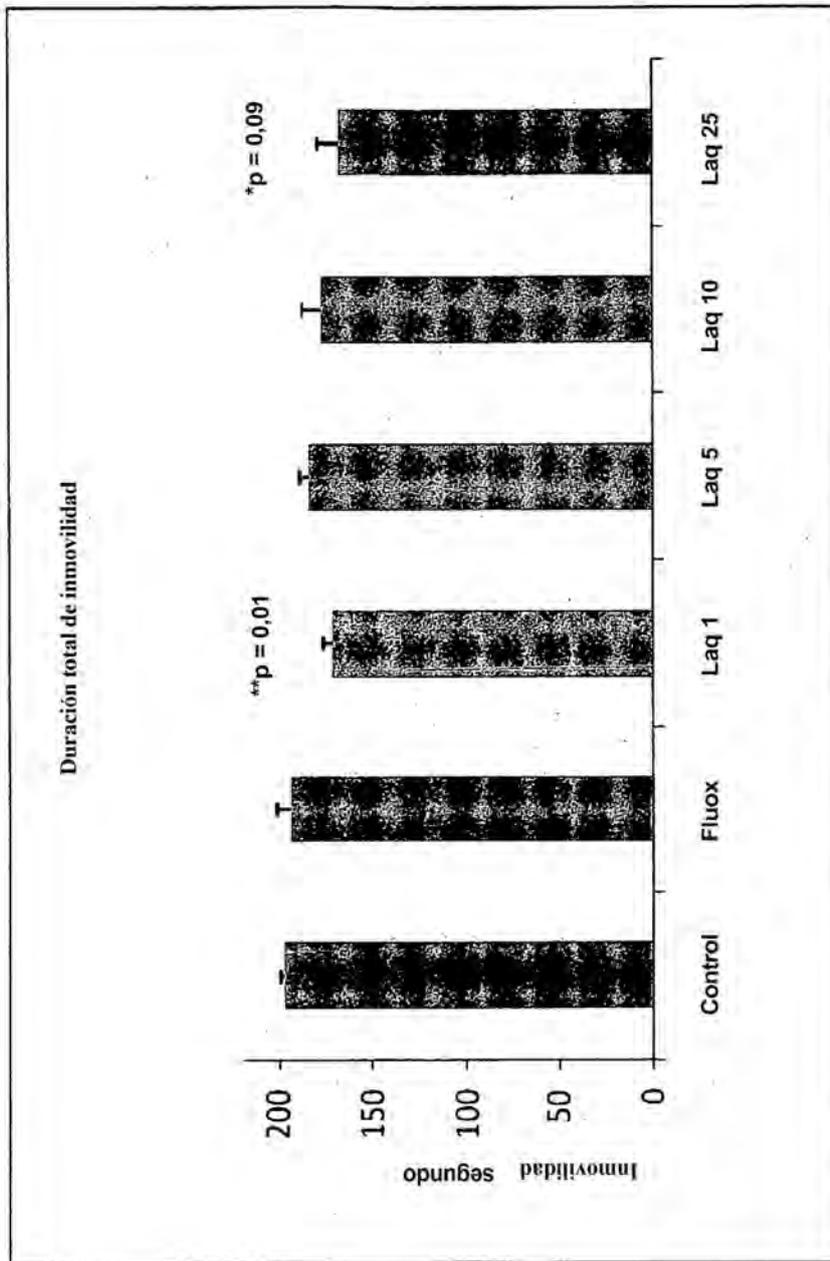


Fig. 4D

FIGURA 5

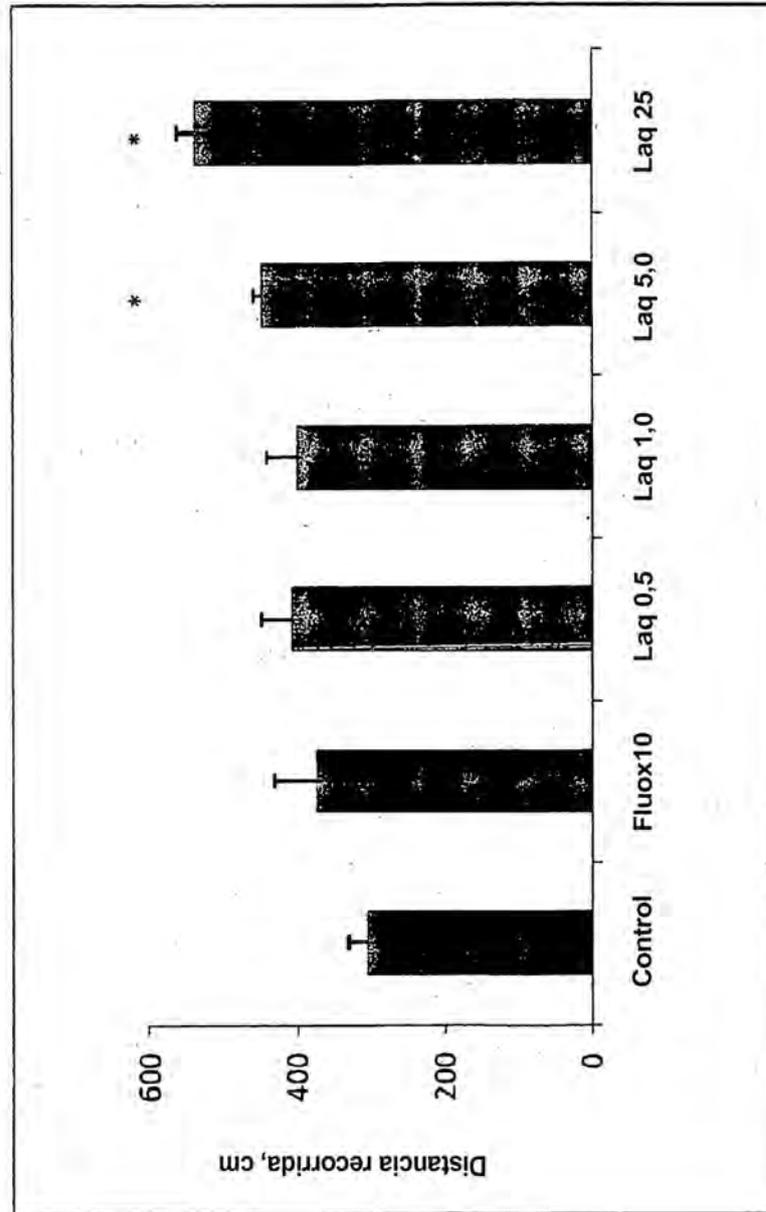


Fig. 5A

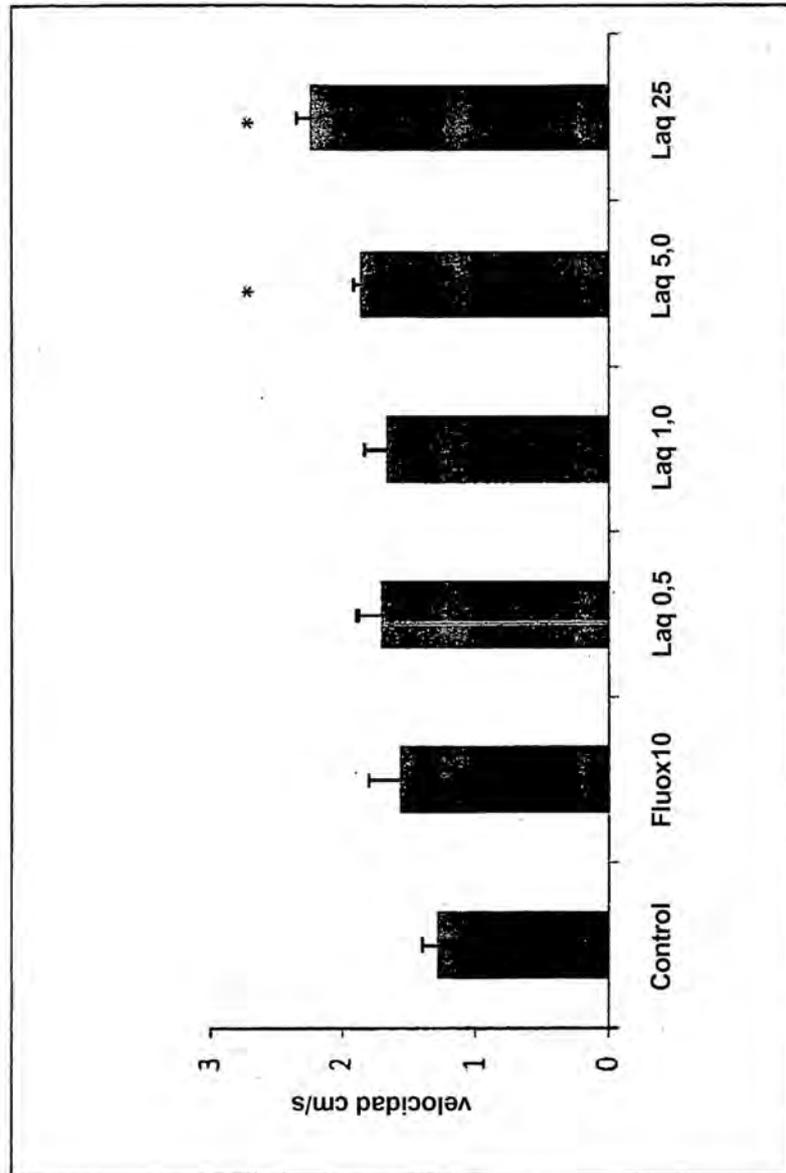


Fig. 5B

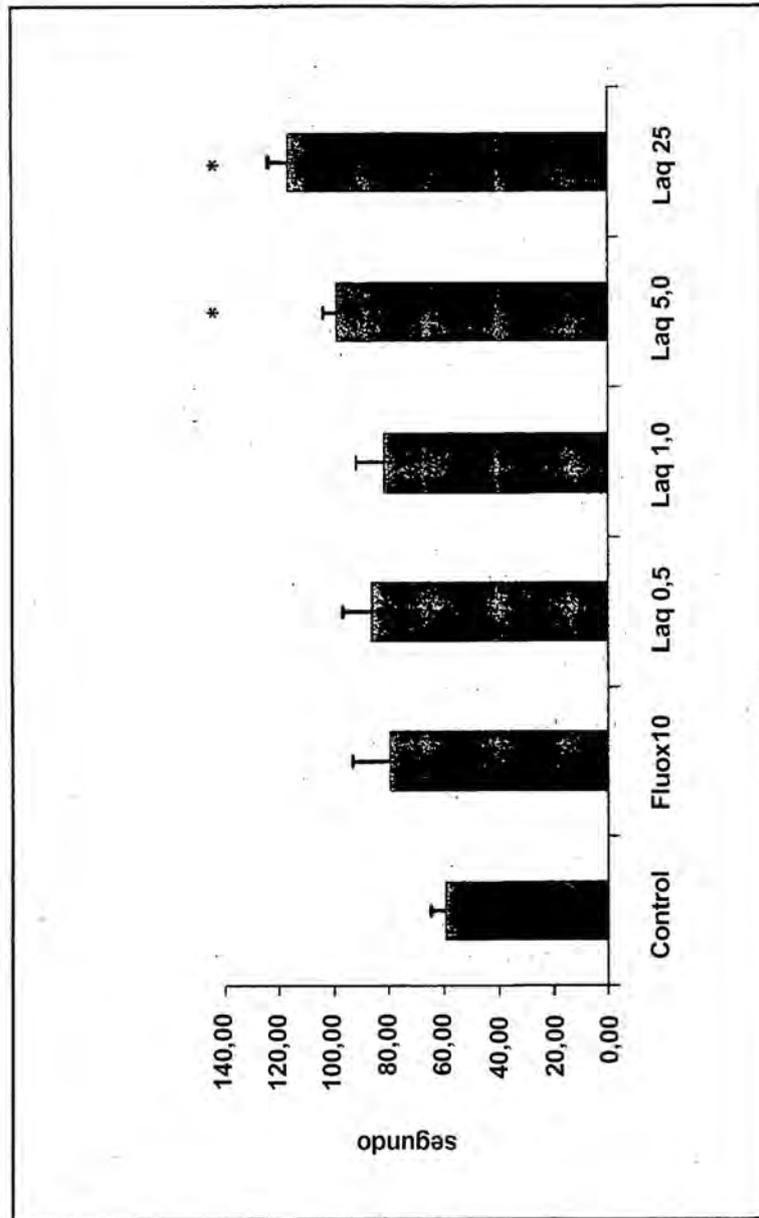


Fig. 5C

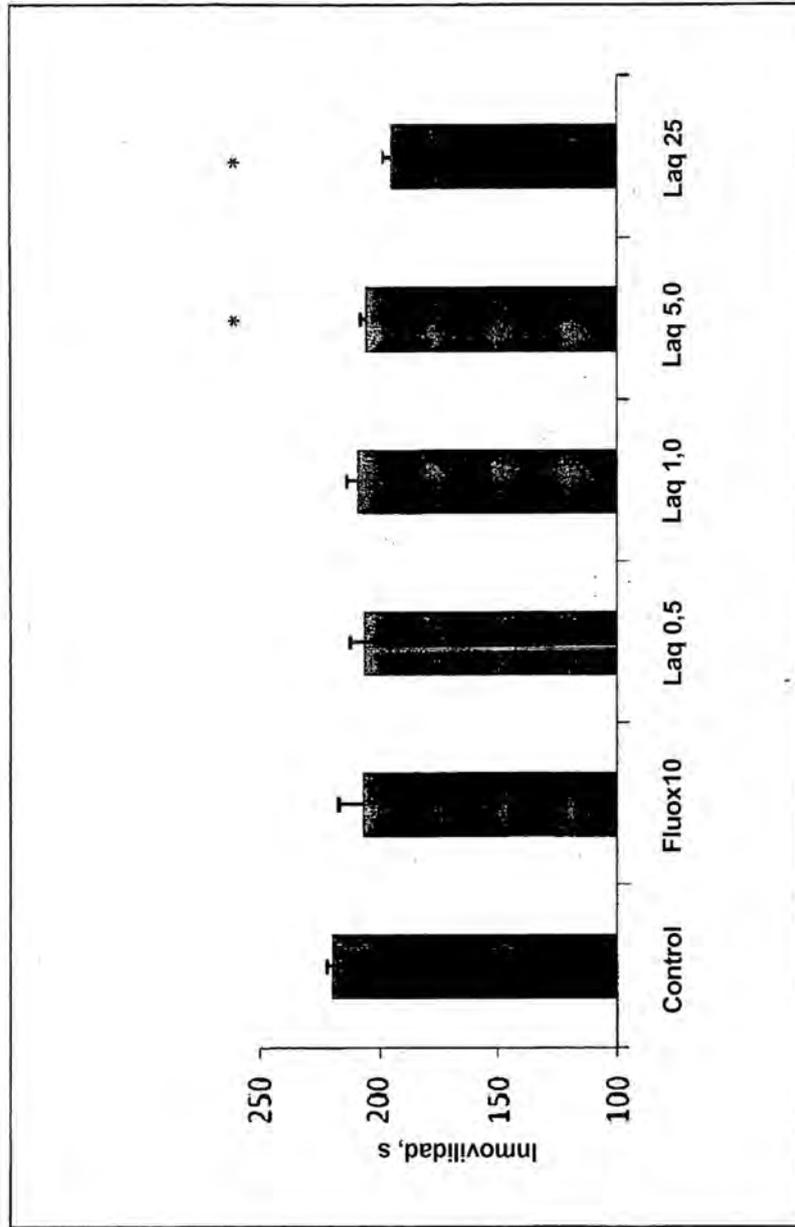


Fig. 5D

FIGURA 6

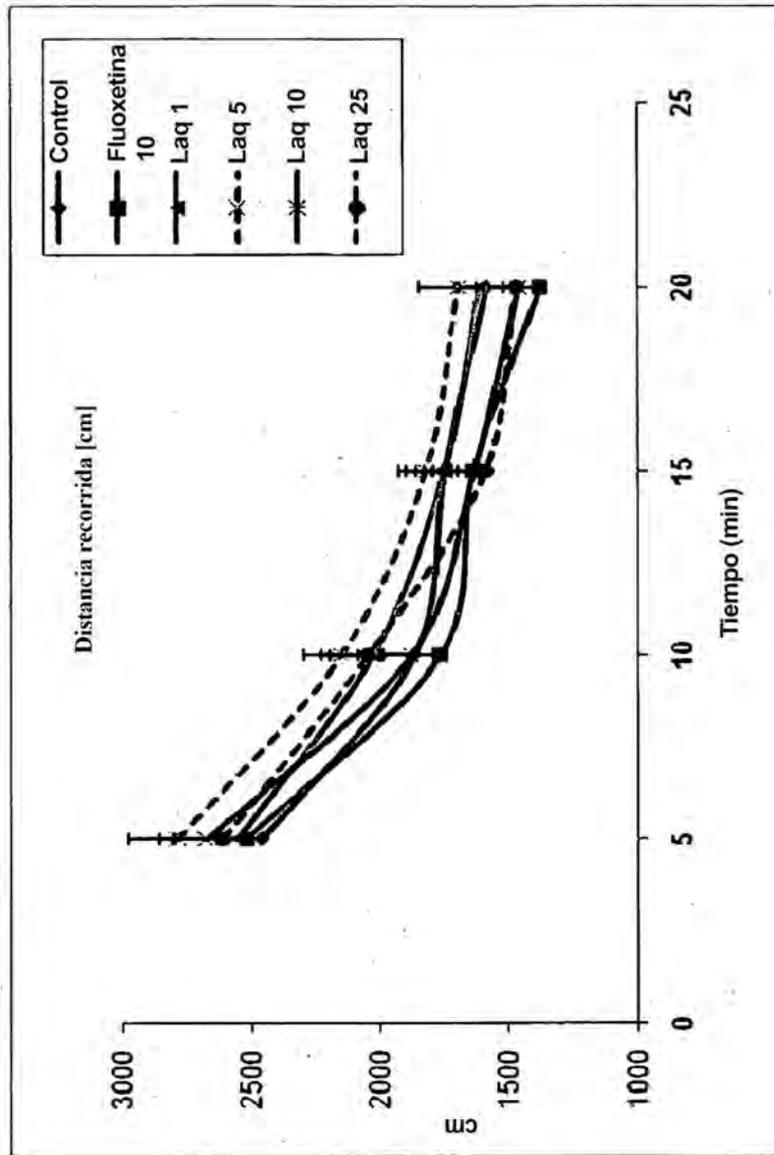


Fig. 6A

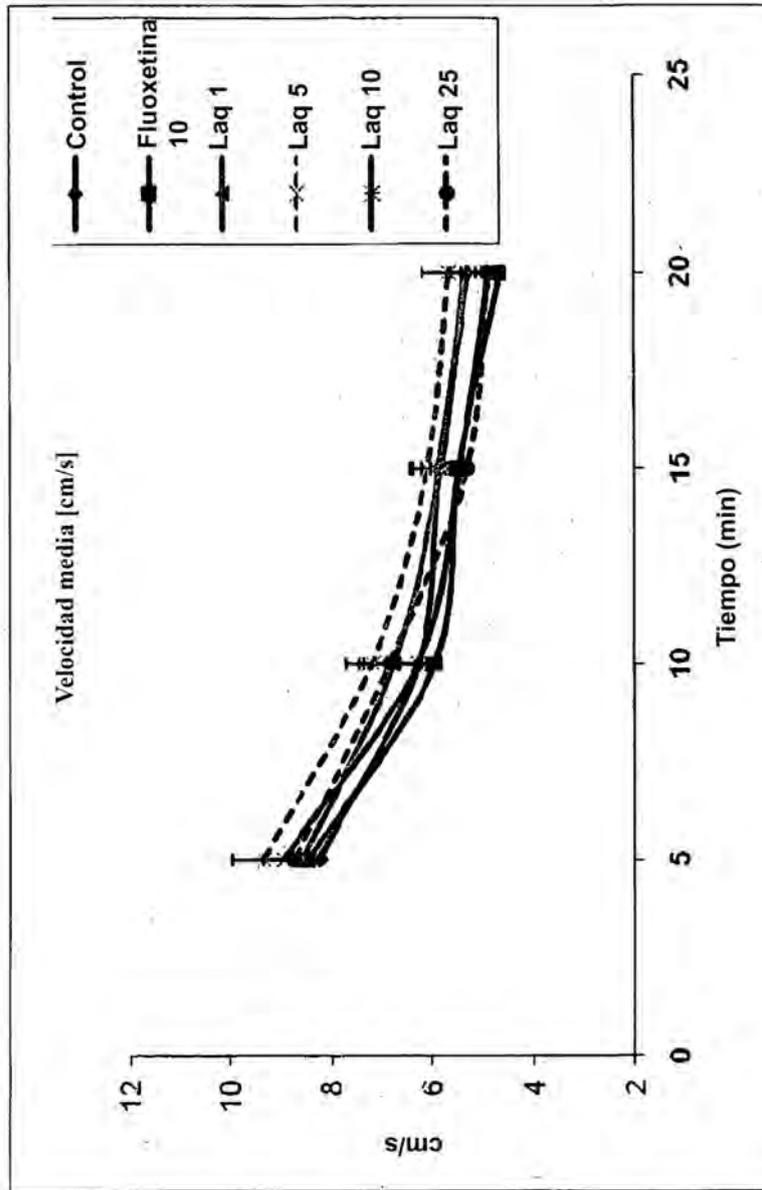


Fig. 6B

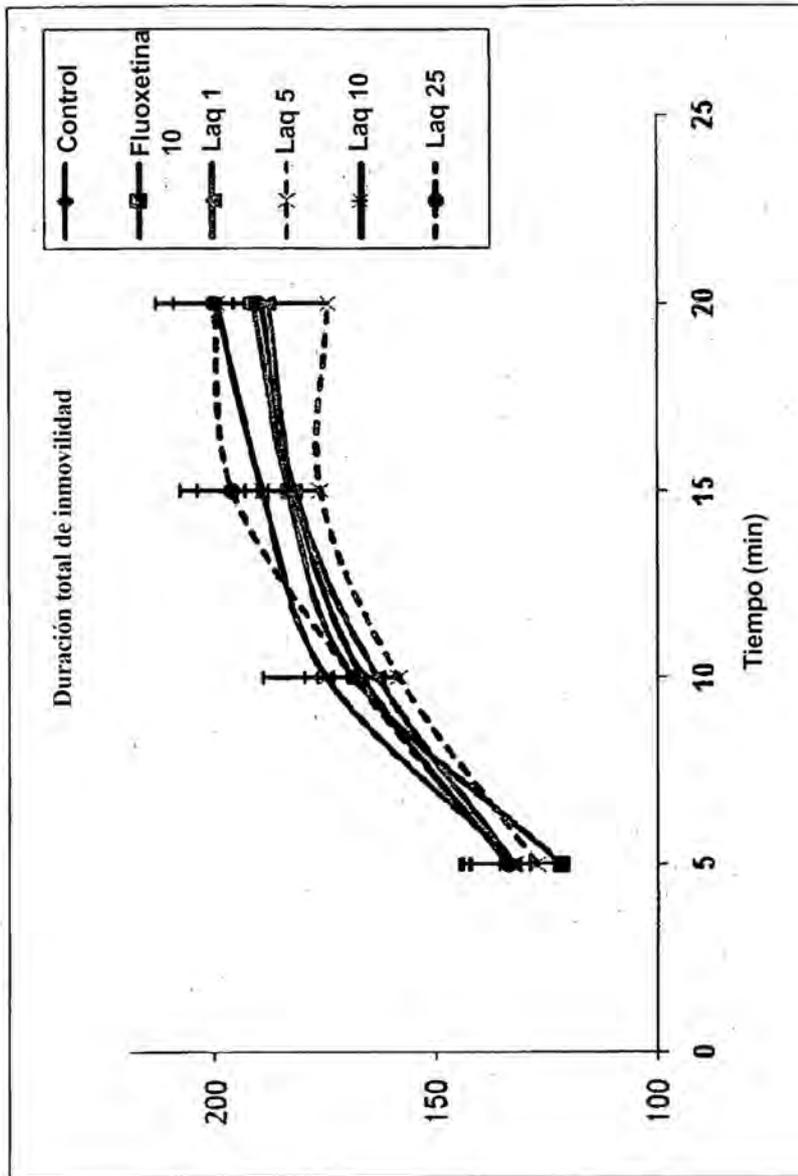


Fig. 6C

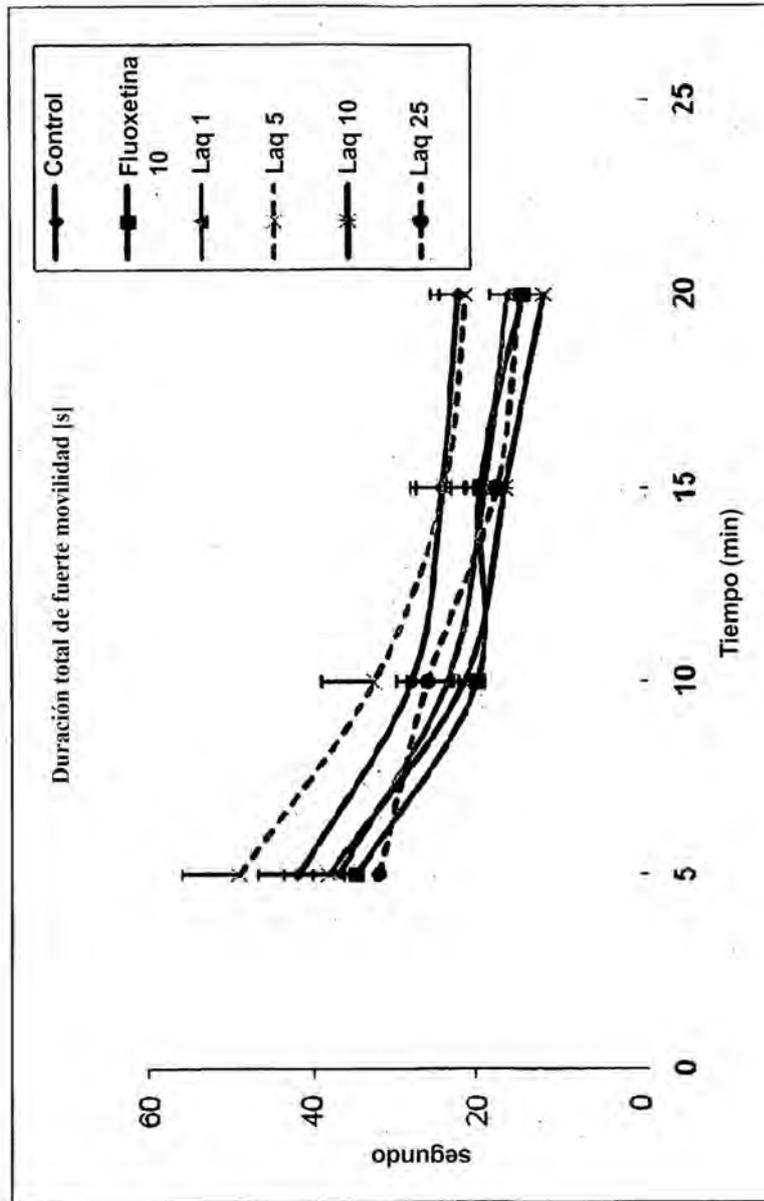


Fig. 6D

FIGURA 7

Frecuencia en la zona (zona 2)

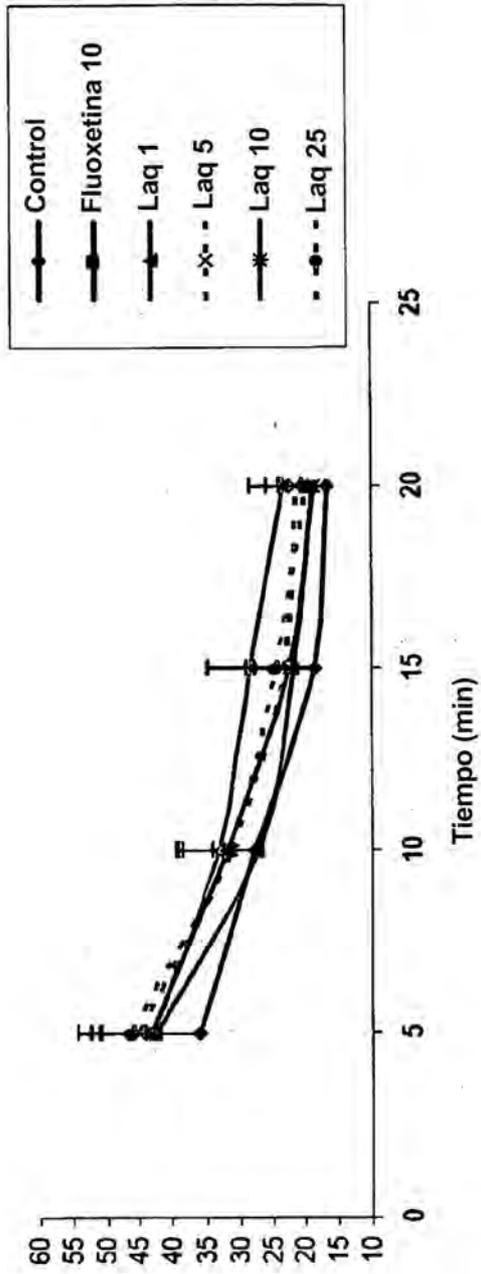


Fig. 7A

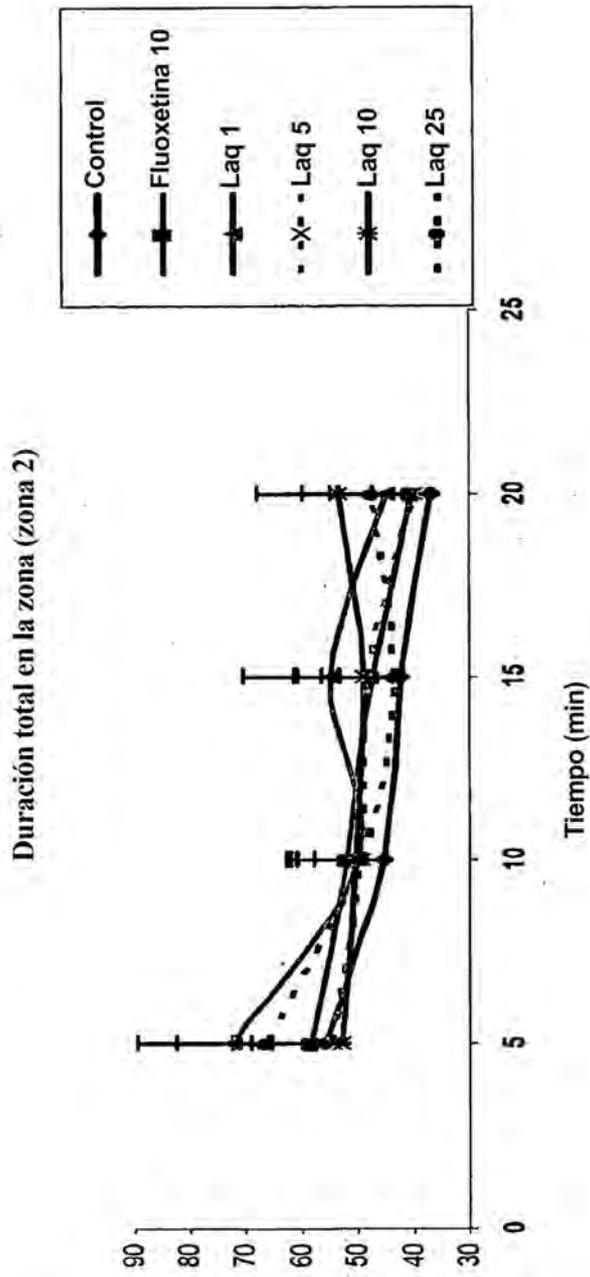


Fig. 7B

Frecuencia de ponerse a dos patas (zona 2)

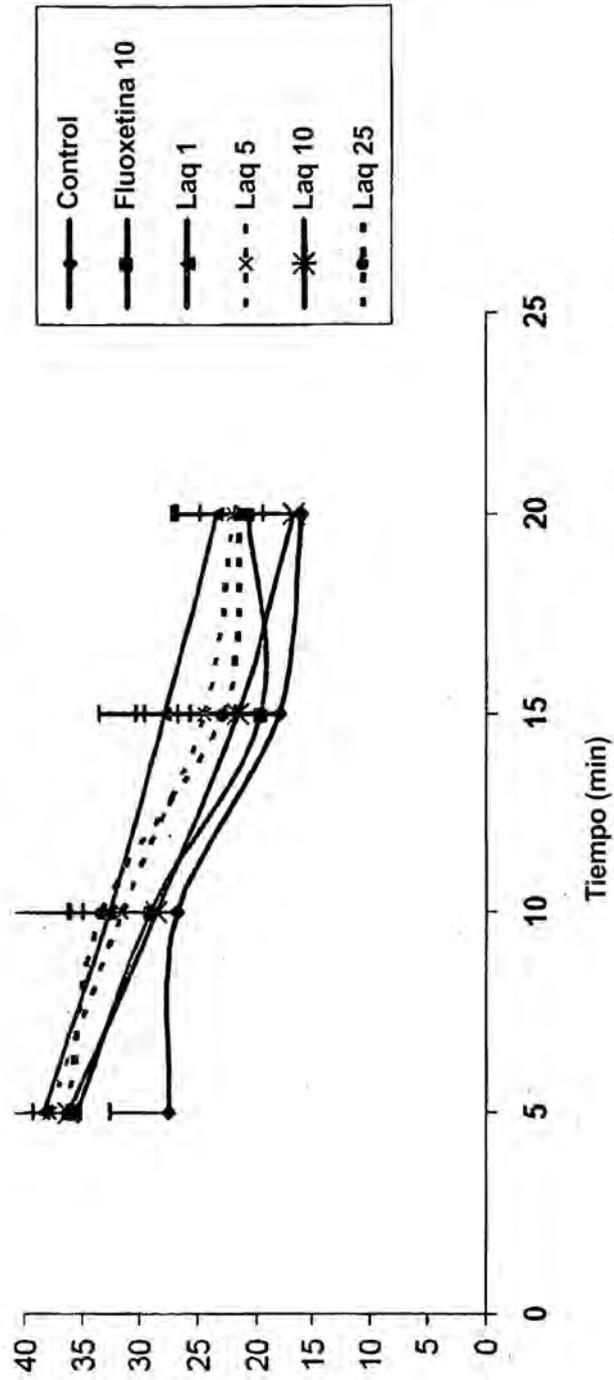


Fig. 7C

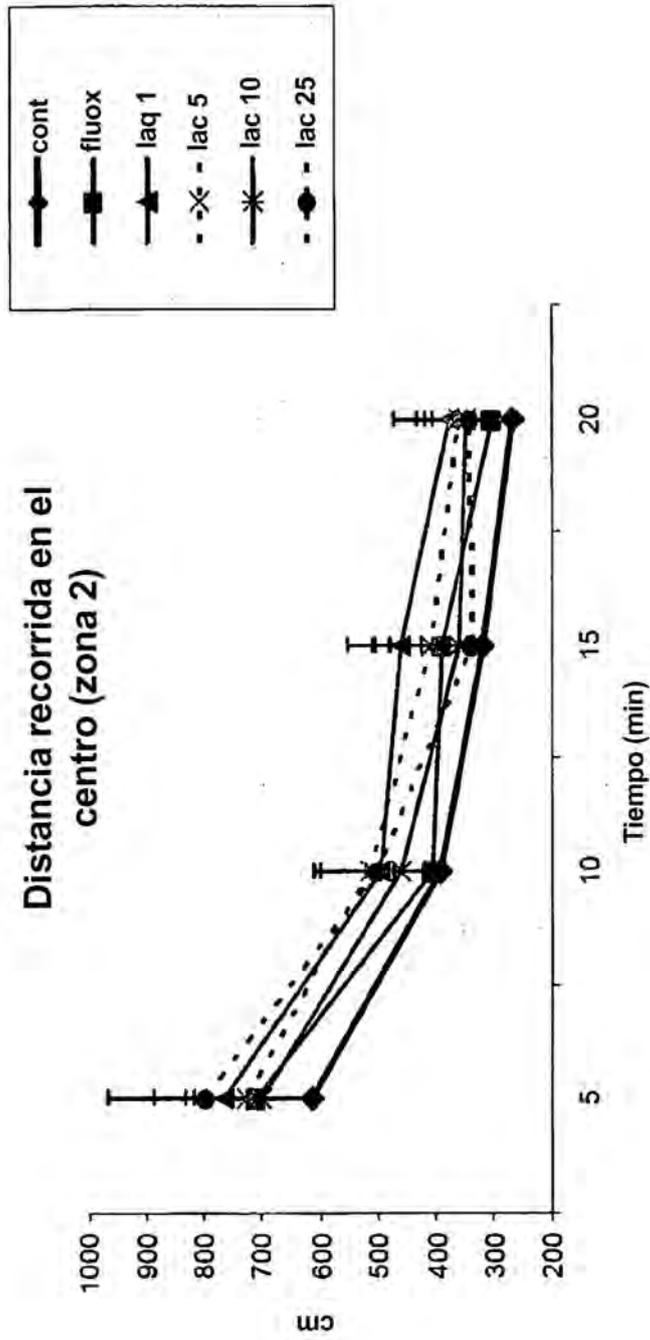


Fig. 7D

FIGURA 8

Duración total en la zona (zona 3)

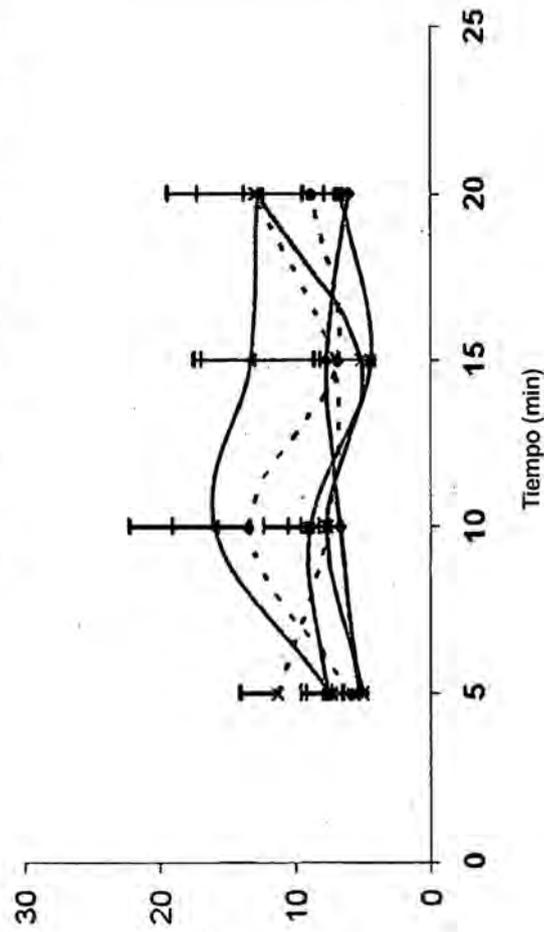


Fig. 8A

Distancia recorrida en el centro (zona 3)

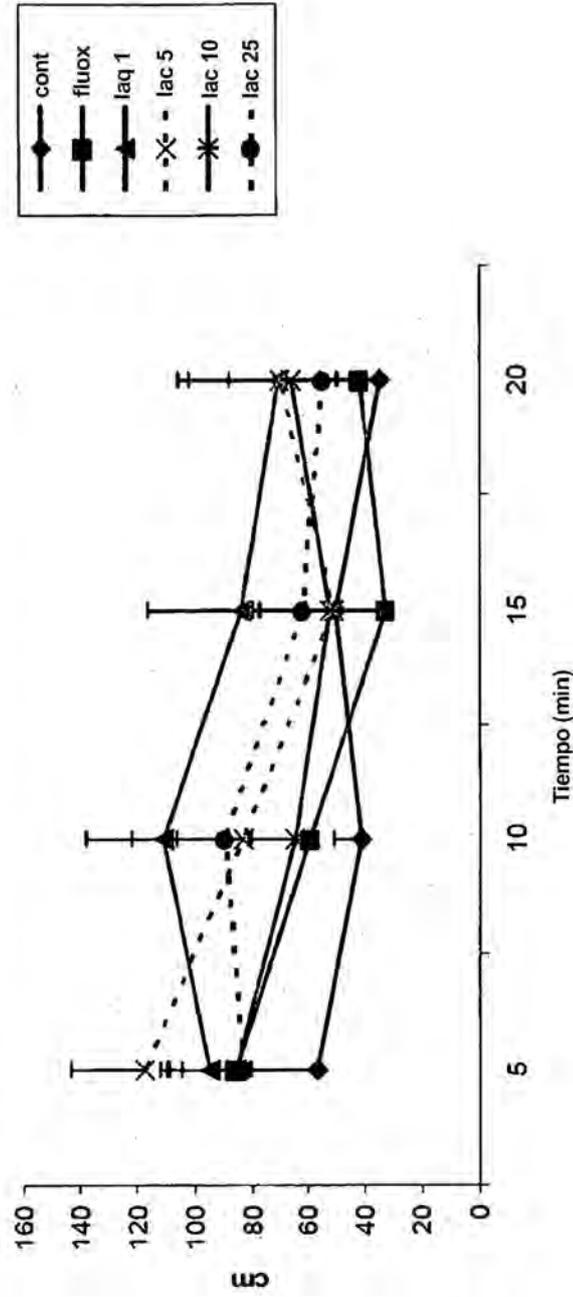


Fig. 8B

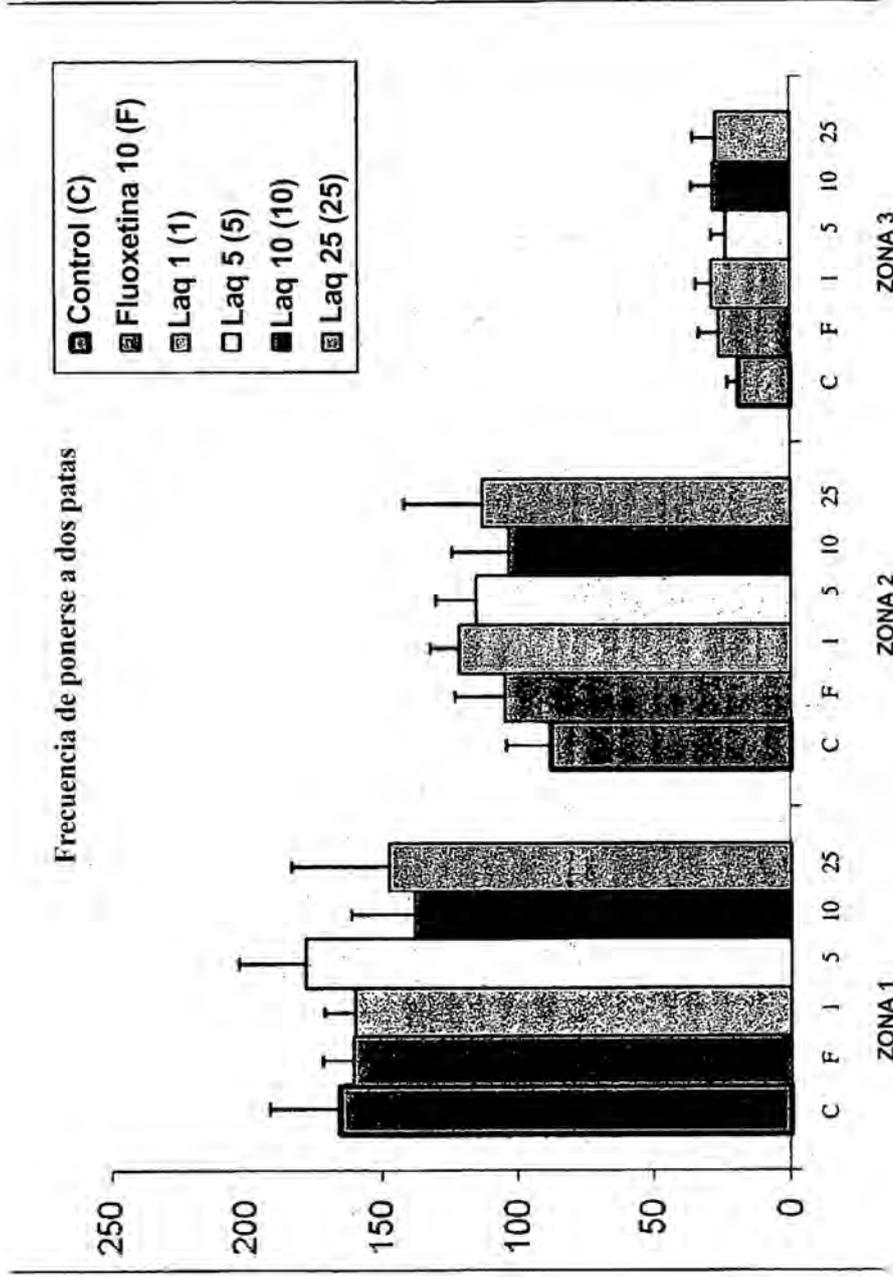


Fig. 8C

FIGURA 9

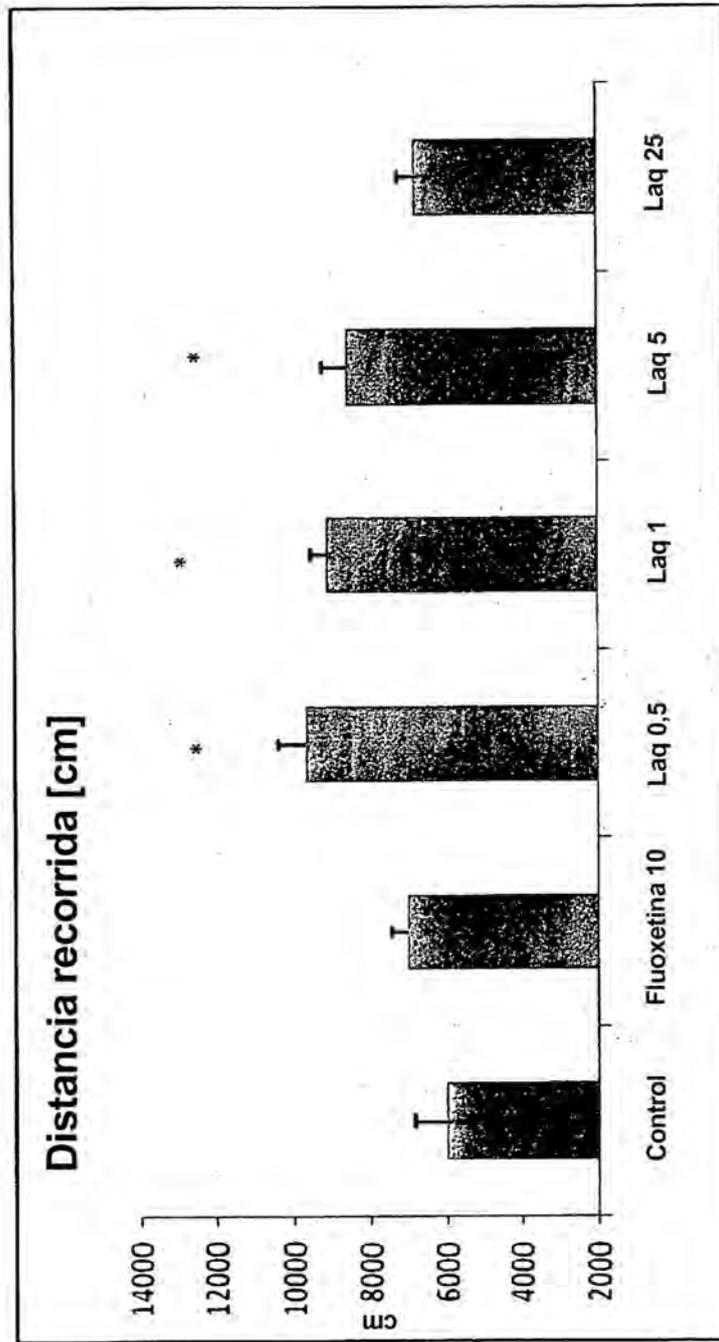


Fig. 9A

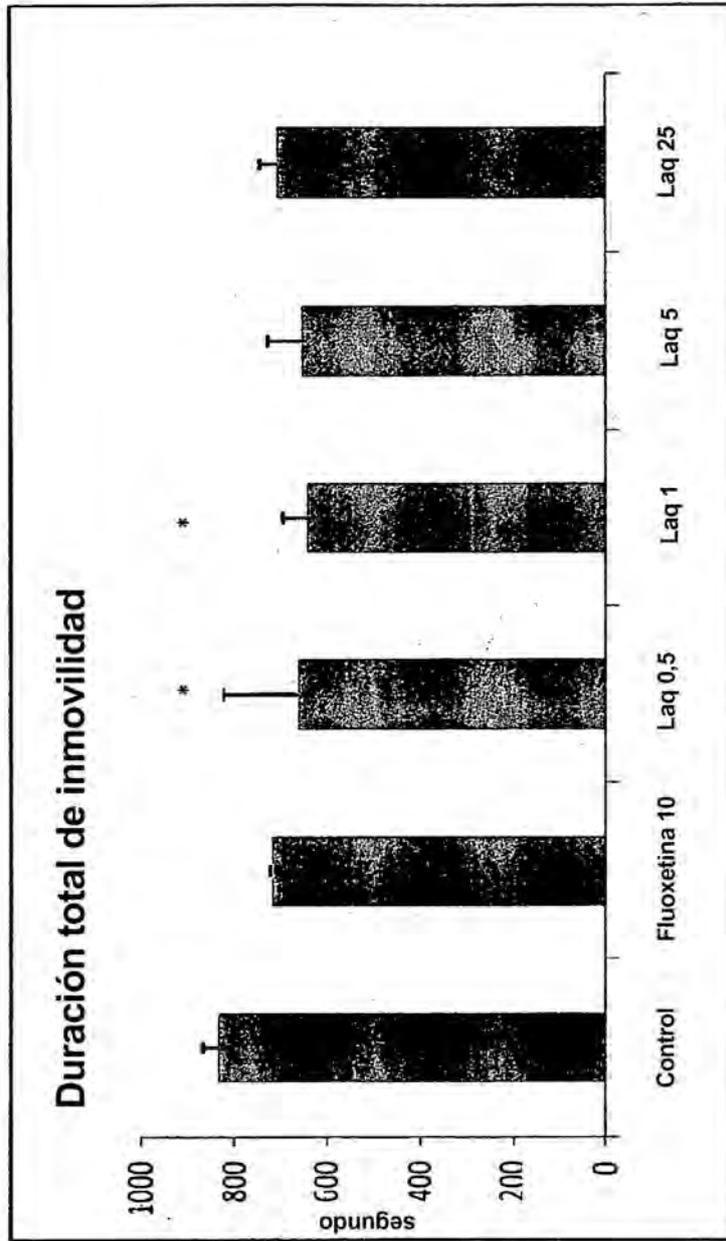


Fig. 9B

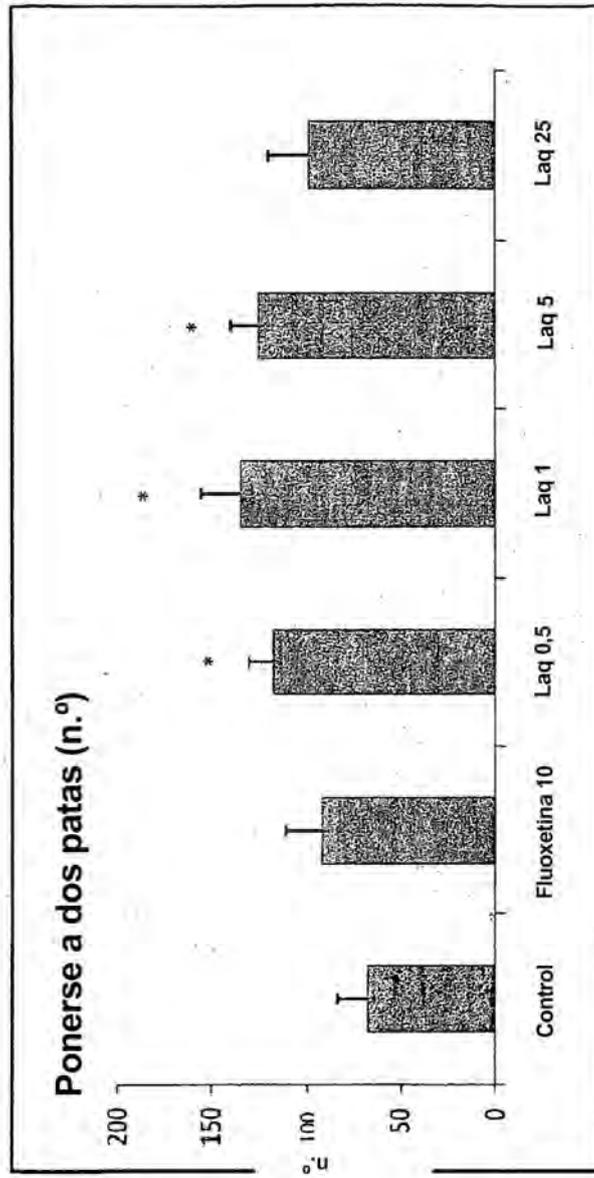


Fig. 9C

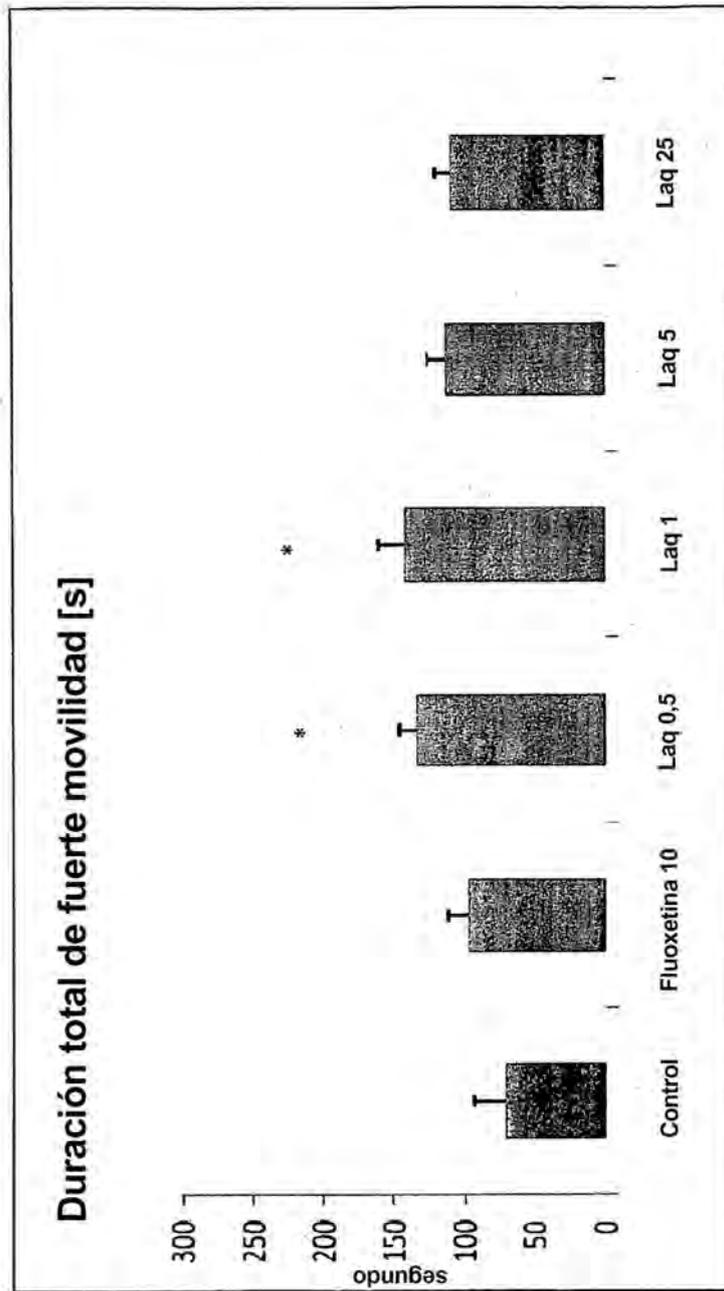


Fig. 9D

FIGURA 10

Frecuencia en la zona (zona 2 + 3)

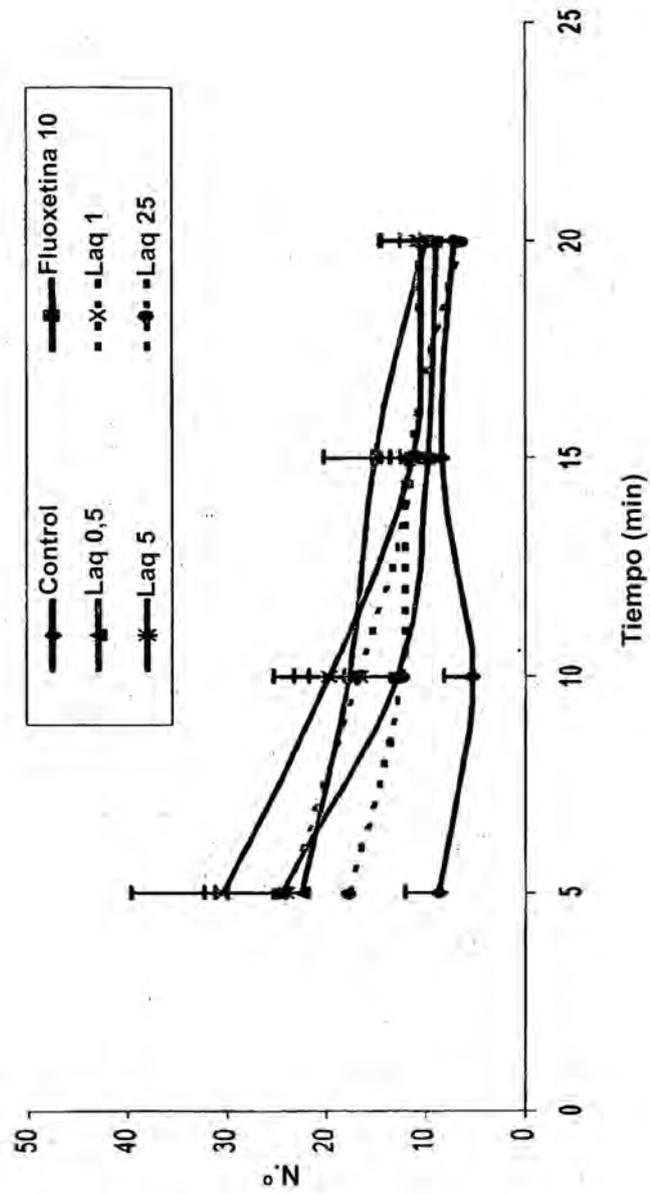


Fig. 10A

Duración total en la zona (zona 2 + 3)

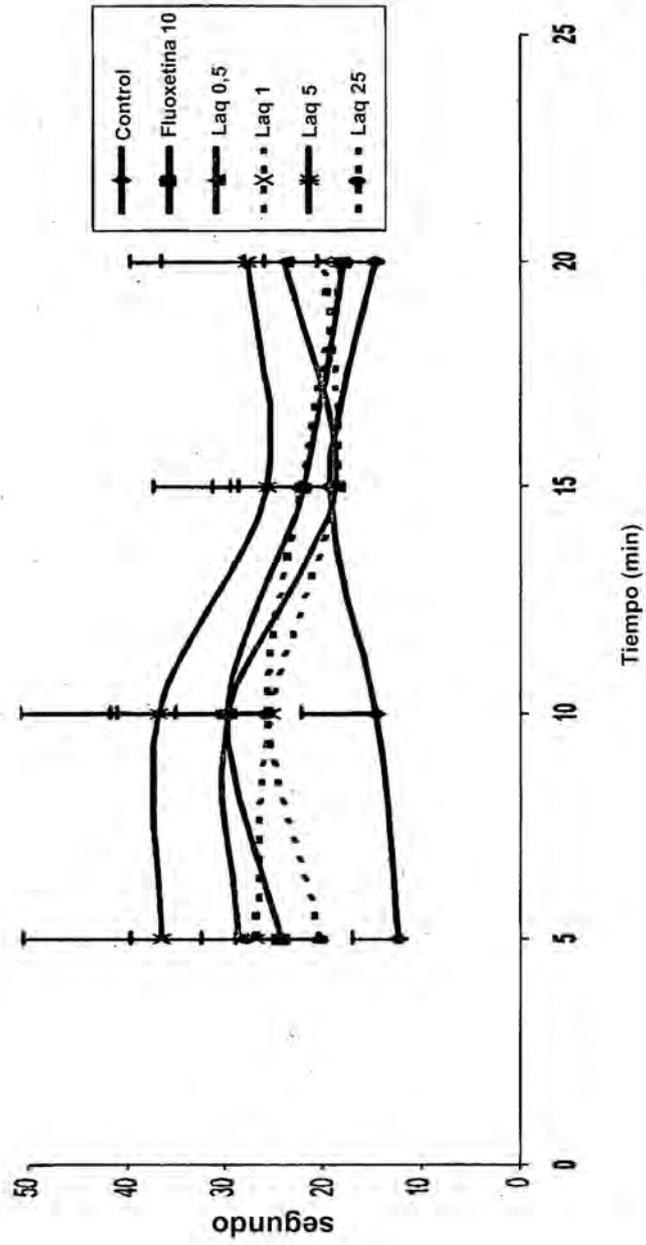


Fig. 10B

Ponerse a dos patas (zona 2 + 3)

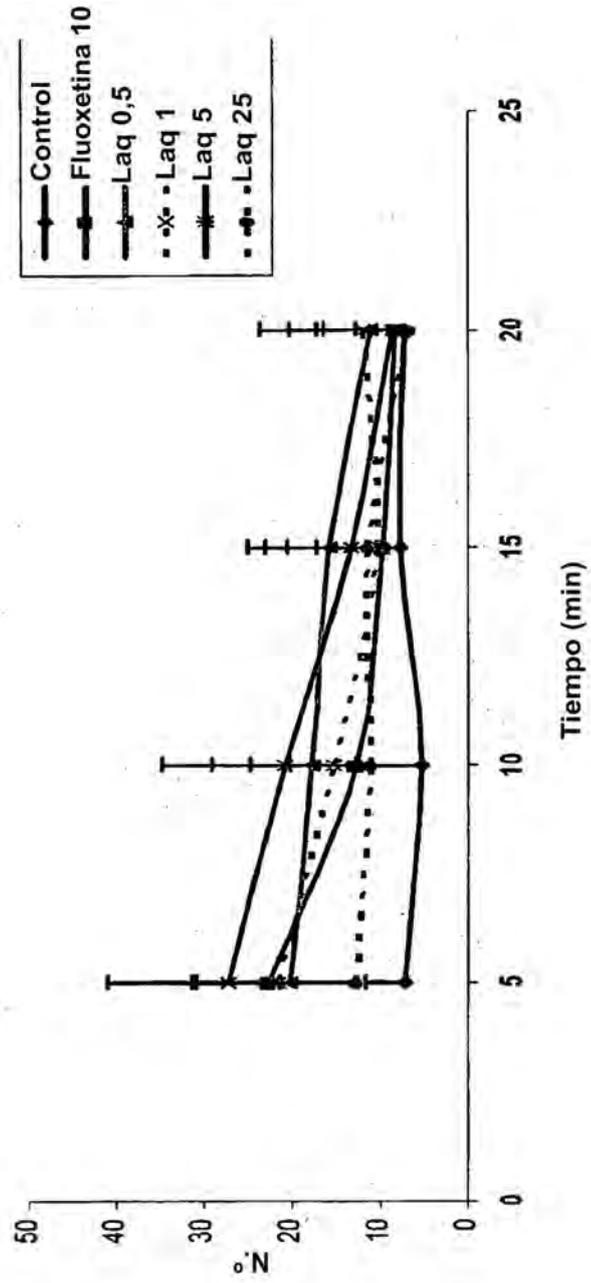


Fig. 10C

FIGURA II

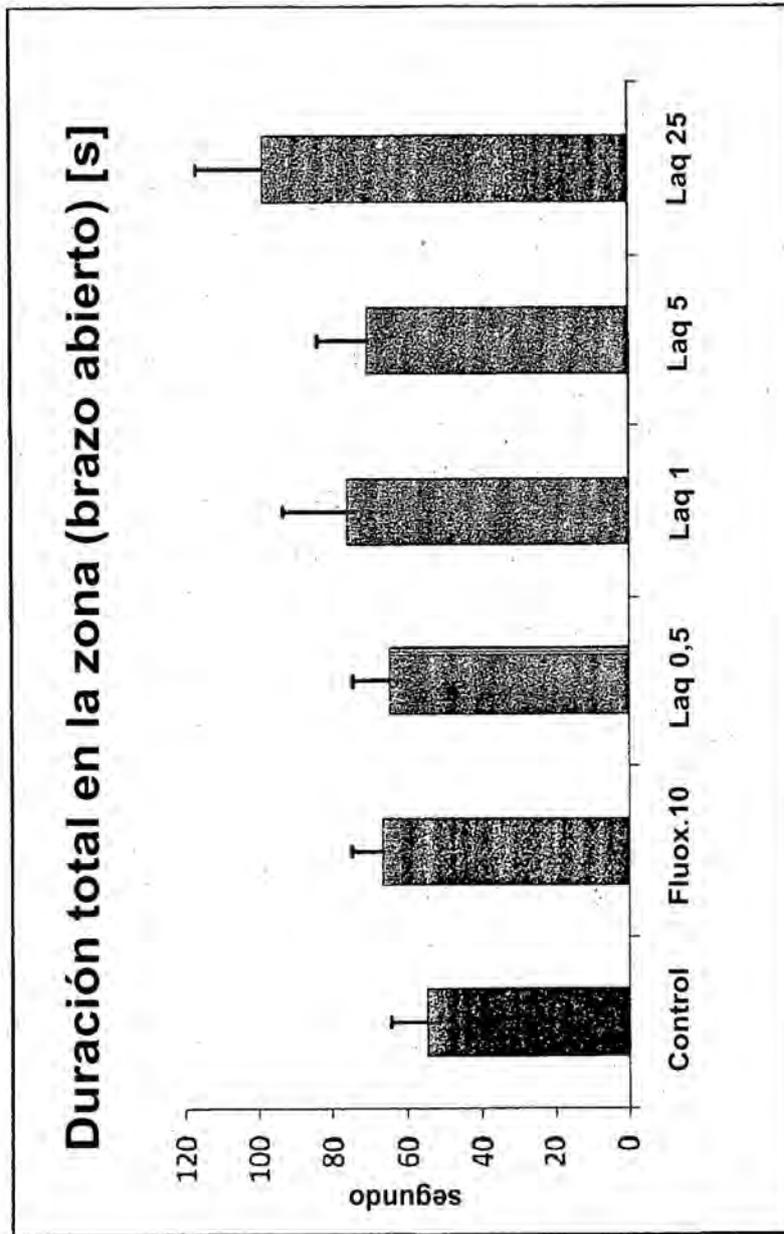


Fig. 11A

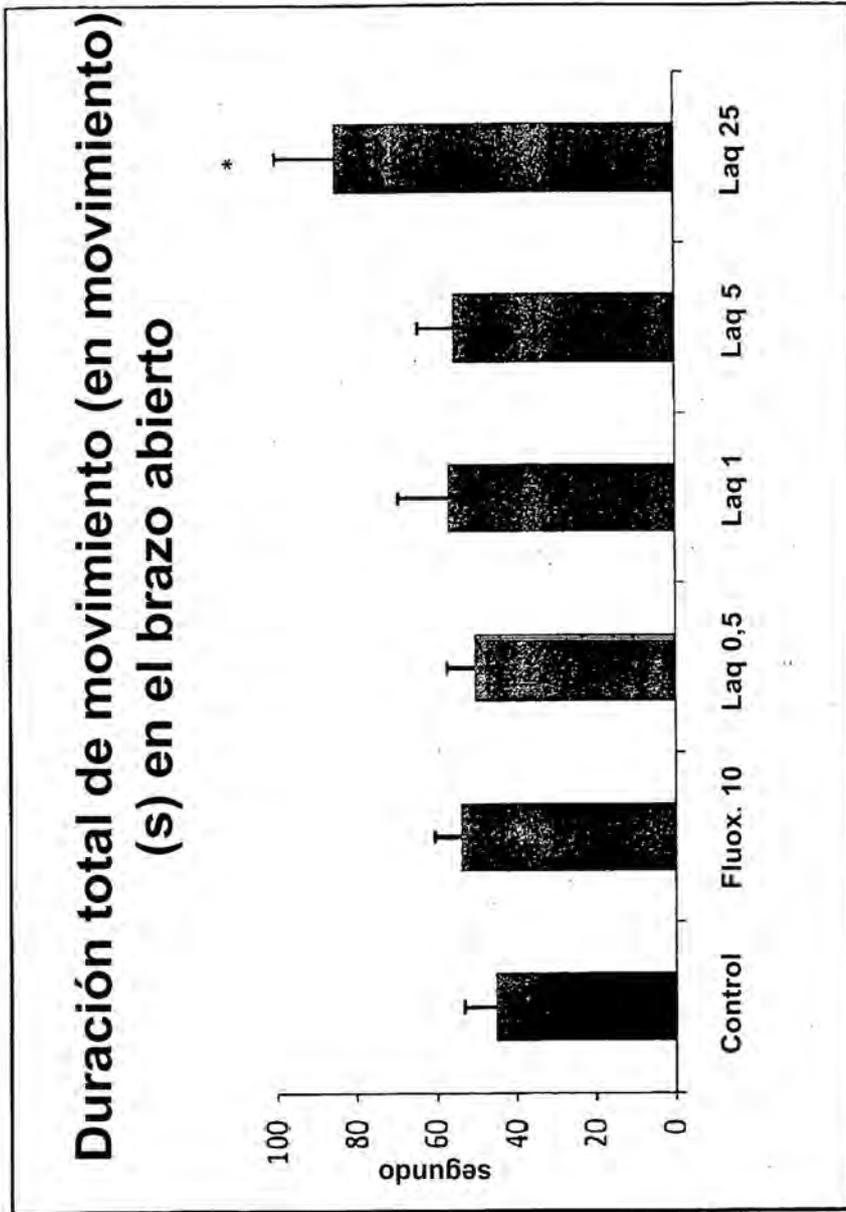


Fig. 11B

Frecuencia de fuerte movilidad (brazo abierto)

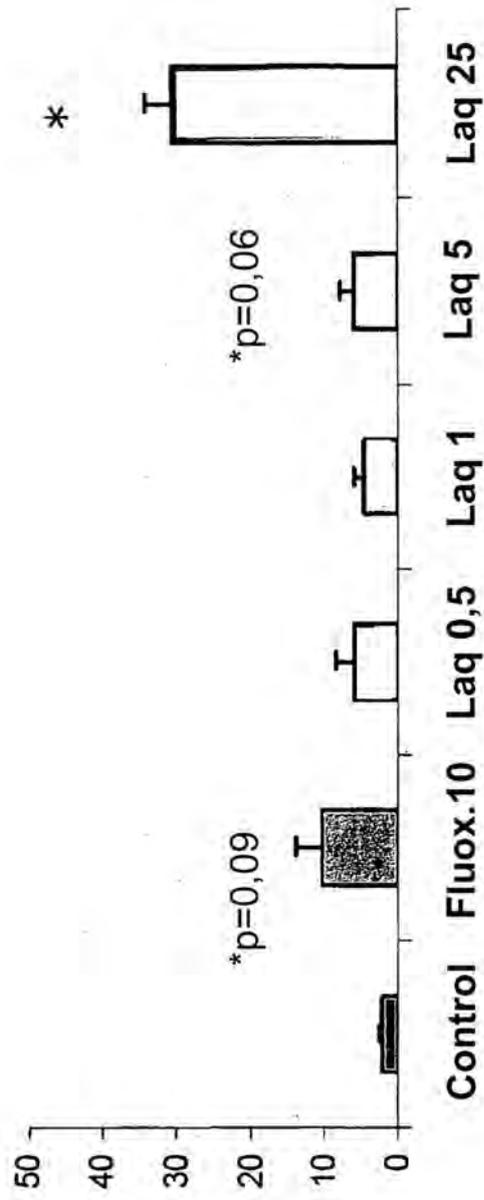


Fig. 11C

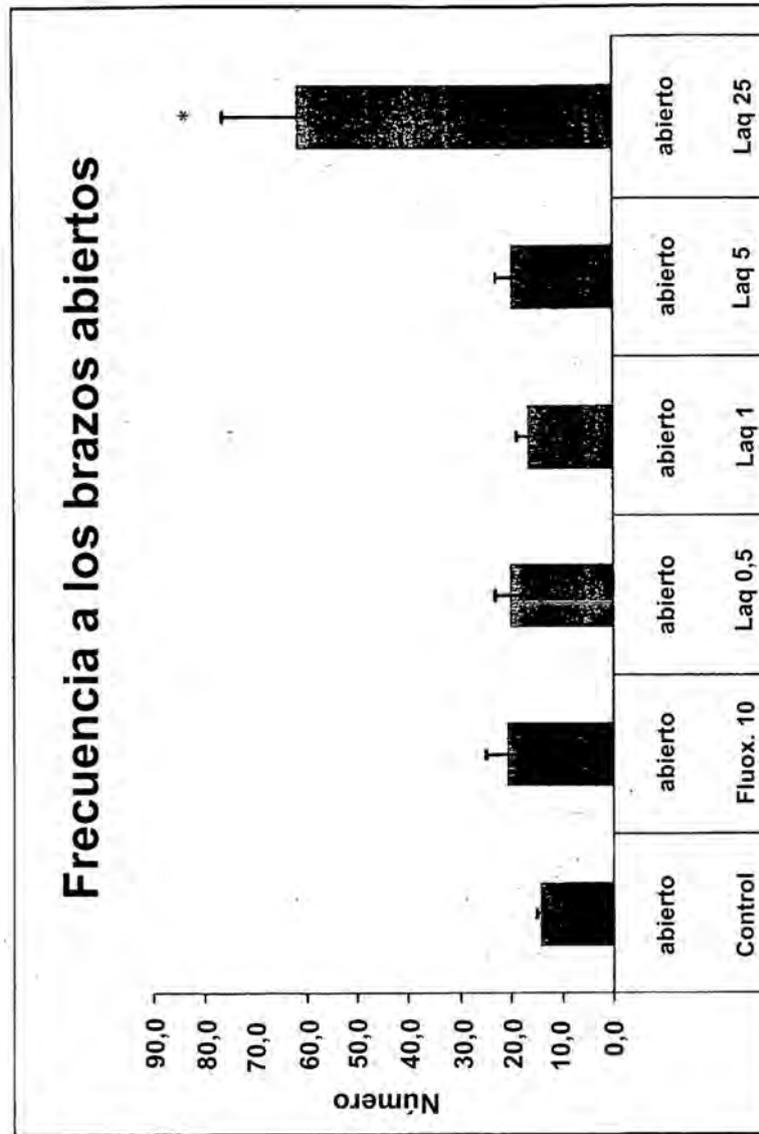


Fig. 11D

FIGURA 12

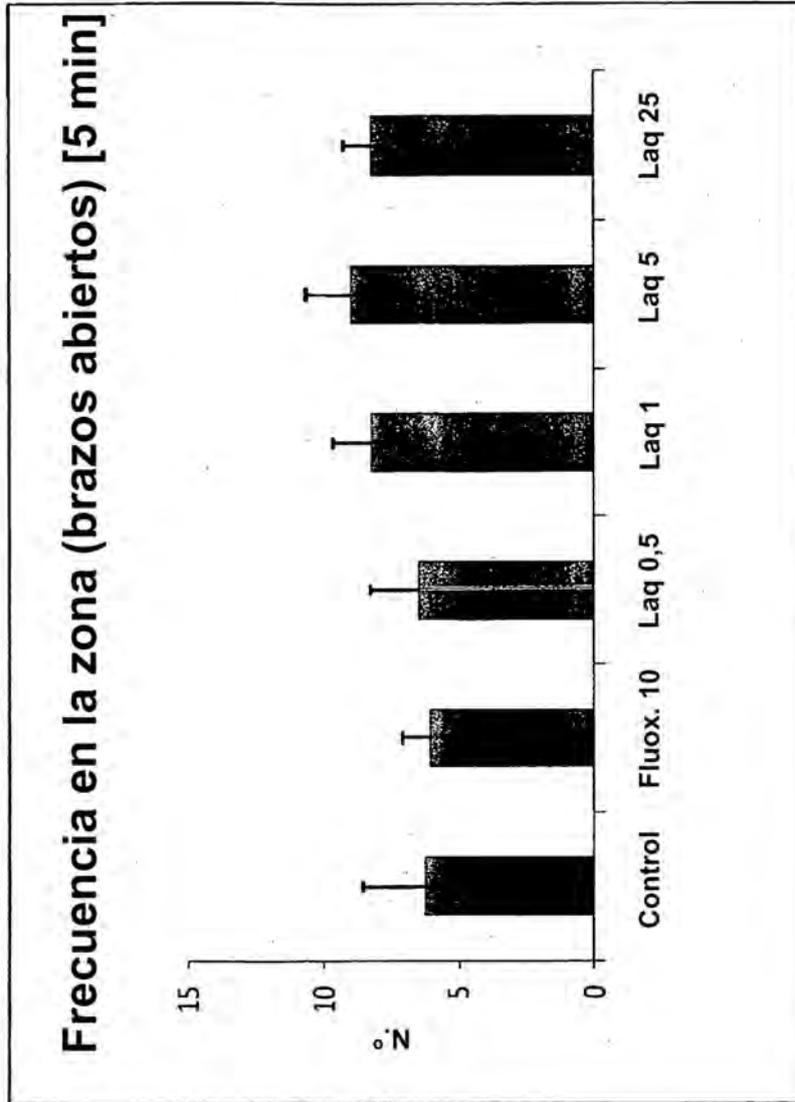


Fig. 12A

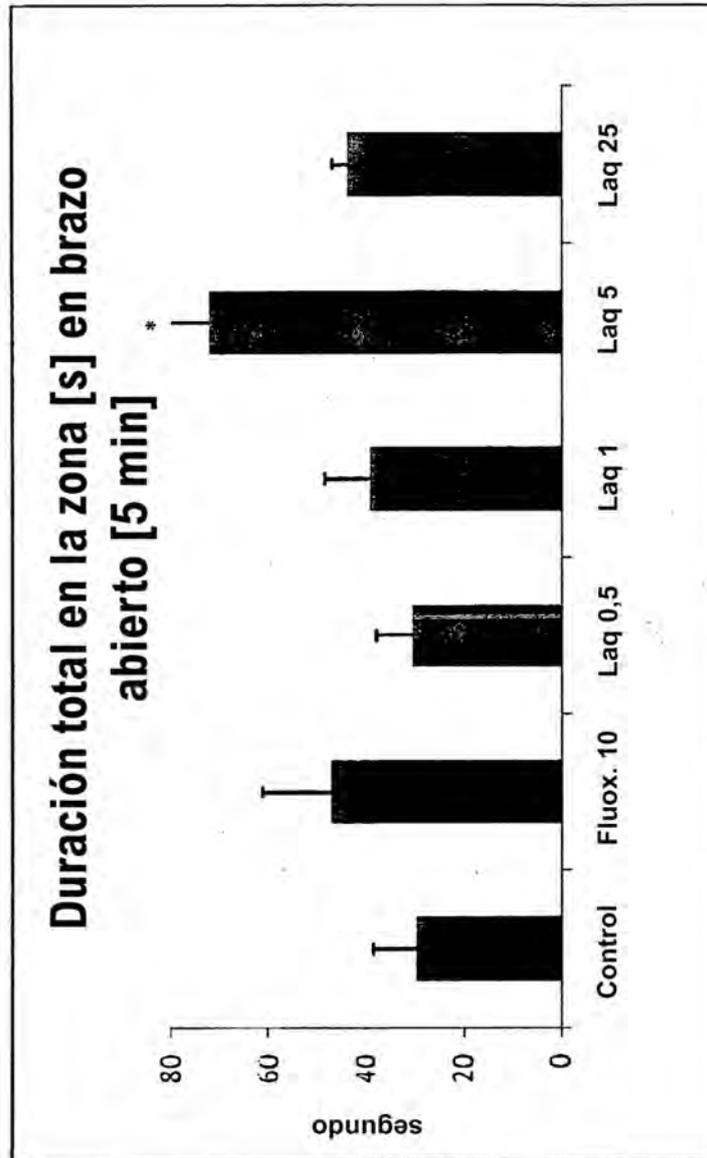


Fig. 12B

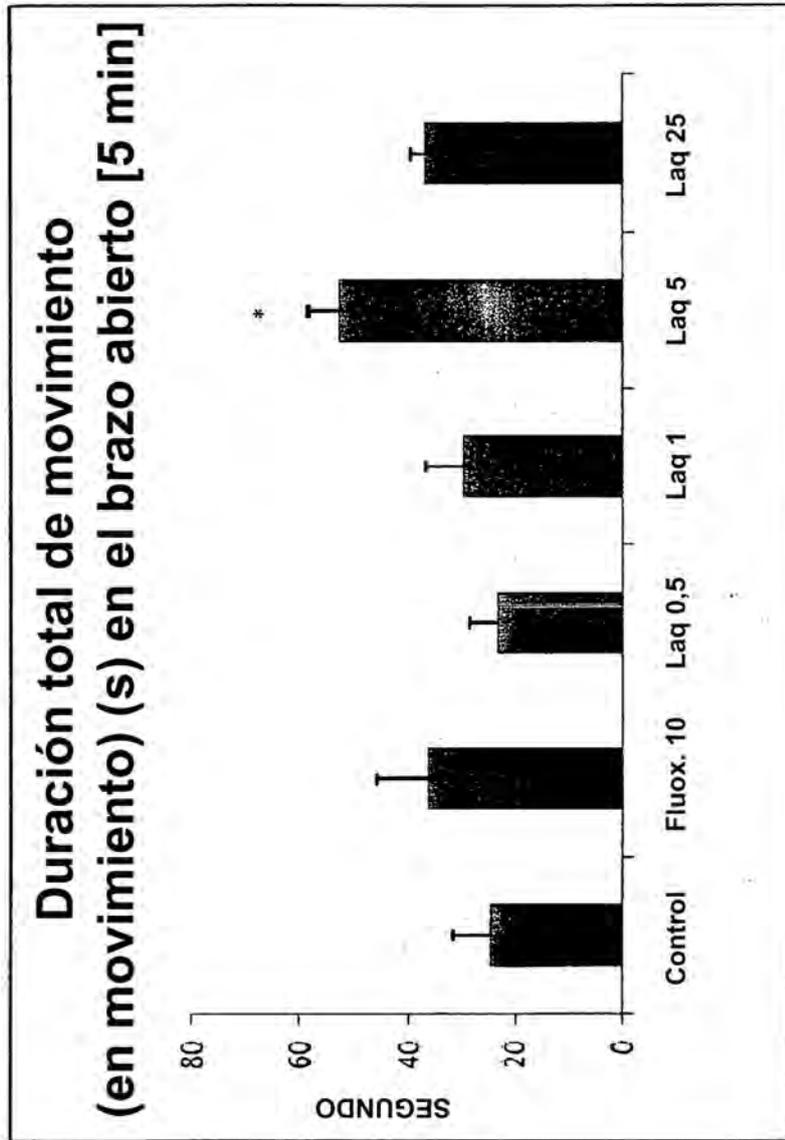


Fig. 12C

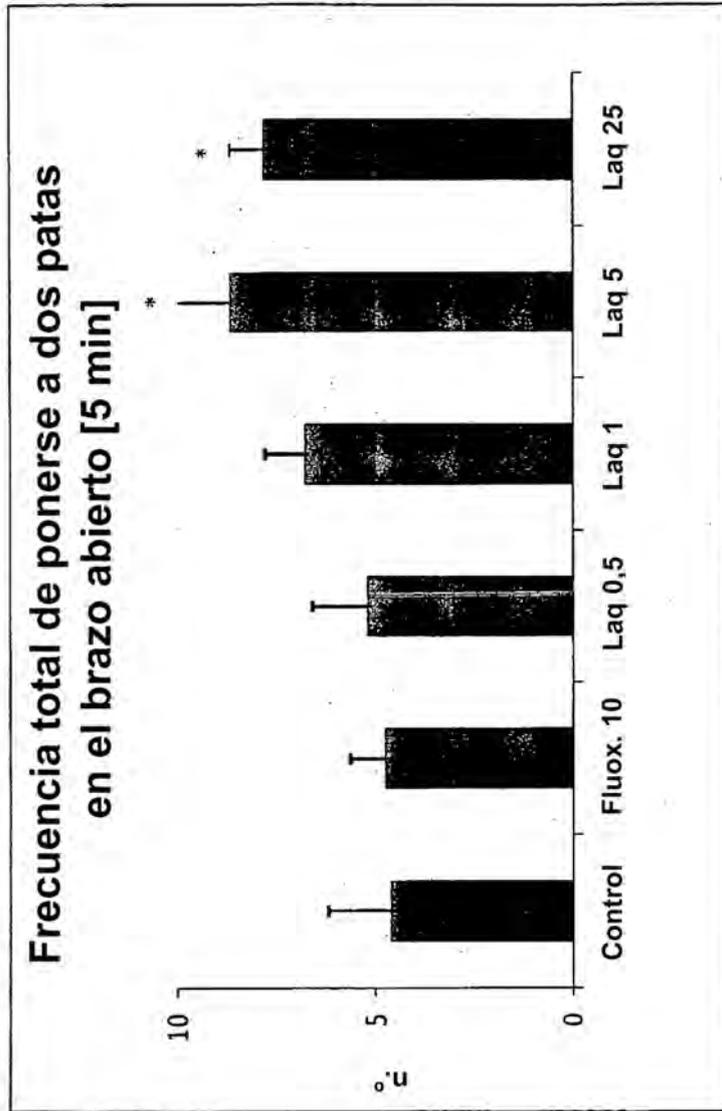


Fig. 12D