

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 780**

51 Int. Cl.:

A61K 31/428 (2006.01)

A61K 31/135 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2003** **E 12166065 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016** **EP 2526944**

54 Título: **Uso de rasagilina con o sin riluzol para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica**

30 Prioridad:

15.11.2002 US 426543 P

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

04.11.2016

73 Titular/es:

**TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LIMITED
(100.0%)
5 Basel Street, Box 3190
Petah Tikvah 49131, IL**

72 Inventor/es:

**BLAUGRUND, ERAN y
LEVY, RUTH**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 588 780 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de rasagilina con o sin riluzol para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica

A lo largo de esta memoria descriptiva se mencionan diversas publicaciones entre paréntesis. Las citas completas de estas publicaciones pueden encontrarse recogidas por orden alfabético al final de la memoria descriptiva, inmediatamente antes de las reivindicaciones.

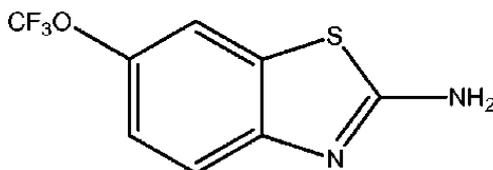
Antecedentes de la invención

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, es una enfermedad neurodegenerativa que se produce cuando las motoneuronas degeneran, provocando que los músculos bajo su control se atrofién (página de información sobre la esclerosis lateral amiotrófica, National Institute of Neurological Disorders and Stroke). Algunos síntomas pueden incluir la pérdida del control motor en las extremidades, fasciculaciones, calambres y dificultades para hablar, tragar y respirar. La muerte se produce habitualmente a los 5 años del diagnóstico. El tratamiento neuroprotector de los pacientes con ELA está en sus etapas tempranas (Ludolph, A. C. et al.). La etiología y la patogenia de la ELA no se conocen, aunque se han avanzado diversas hipótesis (Physician's Desk Reference, 2002). Una hipótesis es que las motoneuronas, que se han vuelto vulnerables debido a una predisposición genética o a factores medioambientales, son lesionadas por el glutamato (Id.). Existen pruebas de que el daño mitocondrial y el estrés oxidante juegan un papel en la ELA esporádica humana (Ludolph A. C. et al.; Vielhaber S. et al.). En algunos casos de ELA familiar, se ha averiguado que la enzima dismutasa de superóxido es defectuosa (Physician's Desk Reference, 2002).

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

Los estudios neuropatológicos de los ratones G93A apoyan las actuales ideas que señalan que el daño mitocondrial y el estrés oxidante son unos importantes factores patógenos para las enfermedades de las células del asta anterior, dado que el hinchamiento y la vacuolización mitocondrial son algunas de las características patológicas más tempranas observadas (Ferrante R. J. et al.; Wong P. C. et al.; Kong J. et al.). Existen pruebas de que este mecanismo también juega un papel en la ELA esporádica humana (Ludolph A. C. et al.; Vielhaber S. et al.).

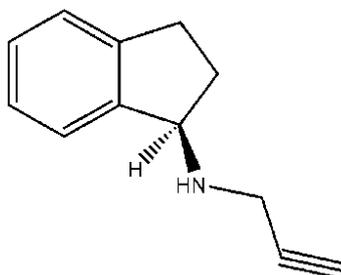
Se ha demostrado que el riluzol, un fármaco estabilizador de la membrana, tiene un efecto terapéutico sobre la ELA. El riluzol es un miembro de la clase de los benzotiazoles (Physician's Desk Reference, (2002)). Químicamente, el riluzol es el 2-amino-6-trifluorometoxi benzotiazol, y tiene una fórmula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



Tiene un peso molecular de 234,2. Algunas de las propiedades farmacológicas del riluzol incluyen un efecto inhibitor sobre la liberación de glutamato (Id.) mediado por la inactivación de los canales de sodio dependientes de voltaje y por su capacidad para interferir con los acontecimientos intracelulares que siguen a la unión del trasmisor a los receptores de aminoácidos excitatorios.

RILUTEK®, que ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de ELA, es un comprimido recubierto con película de color blanco con forma de cápsula para su administración oral que contiene 50 mg de riluzol. La dosis recomendada de RILUTEK® es de 50 mg cada 12 horas. (Physician's Desk Reference, (2002), págs. 772-775).

Se ha demostrado que la rasagilina tiene un cierto efecto neuroprotector. La rasagilina tiene el nombre químico de R(+)-N-propargil-1-aminoindano, y su fórmula estructural es:



Se cree que la rasagilina reduce el estrés oxidante mediante la inhibición de la monoaminoxidasa B (MAO-B) (Youdim M. B. H. et al.). Sin embargo, la neuroprotección con rasagilina también se ha relacionado con una apoptosis, presumiblemente mediante un efecto de tipo bcl-2 sobre el potencial de membrana mitocondrial (Maruyama W. et al.). Se ha demostrado la neuroprotección con rasagilina en modelos de apoplejía (Speiser Z. et al.; Eliash S. et al.) y en modelos de traumatismo craneal (Huang W. et al.). Sin embargo, no se ha sugerido que la rasagilina sea eficaz en el tratamiento de la ELA.

La rasagilina, sus sales, su preparación y su uso para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, de trastornos de la memoria y de otros trastornos neurológicos, han sido objeto de numerosas patentes, que incluyen las Patentes de EE.UU. nº 5.387.612, 5.453.446, 5.457.133, 5.668.181, 5.576.353, 5.532.415, 5.599.991, 5.786.390, 5.519.061, 5.891.923, 5.744.500 y 6.316.504.

Un informe titulado "Parkinson's Disease - rasagiline" (Anónimo, "manufacturing Chemist", Morgan-Grampian Ltd, Londres, GB, Vol. 72, nº 4, 1 de abril de 2001, página 27) establece que los estudios preclínicos también han demostrado que la rasagilina tiene actividad en modelos de depresión, de apoplejía, de traumatismo craneal, de ADHD, de esclerosis lateral amiotrófica y en otras enfermedades neurológicas. La naturaleza de la actividad no se divulga.

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

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

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

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

En el presente documento se divulga que la rasagilina es eficaz para el tratamiento de la ELA. También se divulga que la combinación de rasagilina con riluzol es más eficaz para el tratamiento de la ELA que cualquiera de los fármacos por separado. En particular, los resultados de la rasagilina usada en ratones G93A sola o junto con riluzol indicaron que la administración oral de rasagilina produjo una mejora dependiente de la dosis en el comportamiento motor y prolongó convincentemente la supervivencia de estos ratones.

Sumario de la invención

La invención se refiere al uso de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la elaboración de un medicamento que contiene una cantidad eficaz de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la mejora de la función motora en un sujeto que padece esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

La invención también se refiere al uso de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la elaboración de un primer medicamento en un envase que contiene una cantidad eficaz de R(+)-N-propargil-1-aminoindano para el aumento de la función motora en un sujeto que padece esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

- 5 La invención también se refiere a R(+)-N-propargil-1-aminoindano o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad eficaz para su uso en el aumento de la actividad motora en un sujeto que padece esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Descripción detallada de las figuras

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

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

- 15 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un uso de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la elaboración de un medicamento que contiene una cantidad eficaz de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la mejora de la función motora en un sujeto que padece esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

- 20 En una realización del uso anterior, la sal farmacéuticamente aceptable sal es la sal de cloruro, de mesilato, de maleato, de fumarato, de tartarato, de clorhidrato, de bromhidrato, de esilato, de p-toluensulfonato, de benzoato, de acetato, de fosfato o de sulfato.

En una realización adicional, la sal farmacéuticamente aceptable es la sal de mesilato.

- 25 En otra realización, la cantidad eficaz de R(+)-N-propargil-1-aminoindano es de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 20 mg.

En una realización, el uso comprende la administración de entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 20 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindano.

- 30 En otra realización, el uso comprende la administración de desde aproximadamente 1,6 mg hasta aproximadamente 2,4 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o 2,0 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindano, desde aproximadamente 3 mg hasta aproximadamente 5 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindano, desde 8,0 mg hasta aproximadamente 16,0 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindano, desde 12,0 mg hasta aproximadamente 16,0 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindano, desde 16,0 mg hasta aproximadamente 20 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindano, desde 7,2 mg hasta aproximadamente 8,8 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de aproximadamente 8,0 mg de R(+)-N-propargil-1-aminoindano.

- 35 La presente invención también proporciona el uso de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la elaboración de un primer medicamento en un envase que contiene una cantidad eficaz de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o una sal del mismo para el aumento de la función motora en un sujeto que padece esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

- 40 En una realización del uso anterior, la sal farmacéuticamente aceptable es la sal de cloruro, de mesilato, de maleato, de fumarato, de tartarato, de clorhidrato, de bromhidrato, de esilato, de p-toluensulfonato, de benzoato, de acetato, de fosfato o de sulfato.

En otra realización, la sal farmacéuticamente aceptable es la sal de mesilato.

- 45 La presente invención también proporciona R(+)-N-propargil-1-aminoindano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad eficaz para su uso en el aumento de la actividad motora en un sujeto que padece esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

En una realización, la sal farmacéuticamente aceptable para su uso en el aumento de la actividad motora en un sujeto que padece esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es la sal de cloruro, de mesilato, de maleato, de fumarato, de

tartarato, de clorhidrato, de bromhidrato, de esilato, de p-toluensulfonato, de benzoato, de acetato, de fosfato o de sulfato para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

5 En otra realización, la sal farmacéuticamente aceptable para su uso en el aumento de la actividad motora en un sujeto que padece esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es la sal de mesilato, para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Algunas sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las sales de mesilato, de maleato, de fumarato, de tartarato, de clorhidrato, de bromhidrato, de esilato, de p-toluensulfonato, de benzoato, de acetato, de fosfato y de sulfato.

10 Las formulaciones de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para su administración oral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la materia de Farmacia. La cantidad de principio activo o los ingredientes que pueden combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación individual será generalmente aquella cantidad del (los) compuesto(s) que produce(n) un efecto terapéutico según se analiza en el presente documento.

15 Los métodos para la preparación de estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de poner en asociación un compuesto o una combinación de la presente invención con el portador, y opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente el compuesto o compuestos activos con portadores líquidos, o los portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si fuera necesario, moldear el producto.

20 Las formulaciones de la invención adecuadas para su administración oral pueden estar en forma de cápsulas, de píldoras, de comprimidos, de polvos, de gránulos, o en forma de una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o en forma de un elixir o de un jarabe, o en forma de pastillas (mediante el uso de una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia), que contienen cada una, una cantidad predeterminada del compuesto o compuestos activos.

25 En las formas de dosificación sólidas de la invención para su administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el (los) principio(s) activo(s) se mezcla(n) con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: agentes de relleno o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetil celulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; humectantes, tales como glicerol; agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, algunos silicatos y carbonato de sodio; agentes retardantes de la disolución, tales como parafina; acelerantes de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y mezclas de los mismos; y agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, los comprimidos y las píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como relleno de cápsulas de gelatina blanda y dura mediante el uso de excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

40 Un comprimido puede ser elaborado mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos pueden prepararse mediante el uso de un aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetil celulosa), un lubricante, un diluyente inerte, un conservante, un disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetil celulosa sódica reticulada), un agente tensioactivo o un dispersante. Los comprimidos moldeados pueden elaborarse mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto pulverulento humedecido con un diluyente líquido inerte.

45 Los comprimidos, y otras formas de dosificación sólidas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden estar opcionalmente ranurados o prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. También pueden formularse de forma que proporcionen una liberación lenta o controlada del (los) principio(s) activo(s) de los mismos mediante el uso de, por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Puede ser esterilizados, por ejemplo, mediante una filtración a través de un filtro de retención bacteriana, o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden ser disueltos en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones pueden contener también

50 opcionalmente agentes opacificantes y pueden tener una composición tal que liberen el (los) principio(s) activo(s) únicamente, o preferentemente, en una porción concreta del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de una forma retardada. Algunos ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y

55

ceras. El (los) principio(s) activo(s) también puede(n) estar en una forma microencapsulada, si fuera apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

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

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

15 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes suspensores tales como, por ejemplo, alcoholes de isoestearilo etoxilados, polioxietilén sorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

20 Las preparaciones de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Por supuesto, se administran en unas formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de comprimidos o de cápsulas, mediante inyección, inhalación, en ungüento, supositorio, etc. administración mediante inyección, infusión o inhalación; tópica mediante una loción o un ungüento; y rectal mediante supositorios. Se prefiere la administración oral.

25 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" según se usan en el presente documento significan los modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, una inyección y una infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

30 Las expresiones "administración sistémica", "administrado sistemáticamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente" según se usan en el presente documento significan la administración de un compuesto, de un fármaco o de otro material distinta a directamente en el sistema nervioso central, de forma que entra en el sistema del paciente, por lo tanto, está sometido al metabolismo y a otros procesos similares, por ejemplo, una administración subcutánea.

35 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que en modo alguno deben ser interpretados como adicionalmente limitantes. Debería entenderse que los modelos usados a lo largo de los ejemplos son modelos aceptados, y que la demostración de la eficacia en estos modelos es predictiva de la eficacia en los seres humanos.

Esta invención se comprenderá mejor a partir de los Detalles experimentales que siguen. Sin embargo, el experto en la materia apreciará fácilmente que los métodos específicos y los resultados analizados son meramente ilustrativos de la invención, según se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen a continuación.

Detalles experimentales

40 **Ejemplo 1**

Animales

45 Los ratones transgénicos que expresan las mutaciones humanas Cu/Zn-SOD G93A ((B6SJL-TgN (SOD1-G93A) 1 Gur) y los ratones no transgénicos B6/SJL se adquirieron en Jackson Laboratories (Ben Harbor, ME, EE.UU.). Para este estudio se usó la segunda generación de los ratones G1H; un grupo de animales que en nuestras manos tiene un tiempo de supervivencia medio de aproximadamente 200 días (primera generación, 130 días). Los animales se mantuvieron y se alimentaron en las instalaciones para animales de la University of Ulm. La progenie transgénica fue identificada mediante una amplificación del ADN de la cola del ratón mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Protocolo de tratamiento

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

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

- 5 Grupo I: rasagilina 0,5 mg/kg por día
- Grupo II: rasagilina 2,0 mg/kg por día
- Grupo III: riluzol 30 mg /kg por día
- Grupo IV: rasagilina 0,5 mg/kg y riluzol 30 mg/kg por día
- Grupo V: rasagilina 2,0 mg/kg y riluzol 30 mg/kg por día
- 10 Grupo VI: controles

Los fármacos fueron administrados con el agua de bebida comenzando a los 60 días de edad. Las dosis diarias se calcularon basándose en una ingesta diaria de agua de 6 ml. Se prepararon soluciones recientes una vez por semana con el volumen total consumido medido, con el fin de garantizar una dosis constante diaria y semanal. La cesta de agua no era diferente entre los grupos y estaba en el intervalo de los esperados 6 ml. Esto se confirmó mediante la comparación de la ingesta de agua de los controles y de los animales tratados. De forma análoga, las mediciones longitudinales no revelaron cambios importantes en la dosis, incluso en las etapas tardías de la enfermedad. El estudio se llevó a cabo con enmascaramiento, lo que significa que el tratamiento y la preparación de los fármacos fueron realizados por individuos distintos.

Evaluación del comportamiento y del peso

20 Los ratones se observaron diariamente (incluyendo los fines de semana) y se pesaron semanalmente. El comportamiento motor fue evaluado a partir de los 40 días de edad mediante el uso del aparato de cilindro giratorio para medir la actividad nocturna de los ratones a partir de las 8 p.m. - 8 a.m. (LMTB, Berlín). Se registró individualmente la actividad de los animales mediante un sistema informatizado y se evaluó diariamente, incluyendo los fines de semana. Para una evaluación estadística, la actividad en el cilindro giratorio se normalizó a la actividad media de cada animal desde el día 40 hasta el día 60.

Supervivencia

30 Se controló diariamente el estado clínico de los ratones comenzando a los 40 días. La aparición de los signos clínicos se puntuó analizando los temblores y/o la agitación de las extremidades de los ratones, y la posición de una o de ambas extremidades posteriores (colgando en lugar de separadas) cuando los ratones fueron suspendidos en el aire por la cola. La edad de aparición clínica fue determinada por la edad (en días) a la que se observó una pérdida de apertura o temblores en las extremidades posteriores. El análisis de los ratones para comprobar la pérdida del reflejo de enderezamiento determinó la fase final de la enfermedad. Los ratones fueron sacrificados si no podían erigirse en 30 segundos cuando se colocaban sobre cualquier costado en una superficie plana. Esta decisión fue tomada por un veterinario independiente según lo requería el protocolo animal. El protocolo de tratamiento fue aprobado por el Regierungspräsident Tübingen (35/9185.81-3). El tratamiento y la evaluación clínica fueron llevados a cabo por individuos distintos, y por lo tanto los signos neurológicos para la determinación de la aparición y de la fase final de la enfermedad fueron registrados de una forma enmascarada.

Estadística

40 Los datos se expresaron como la media +/- el error estándar de la media (EEM). La prueba del cilindro giratorio y el peso se compararon mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Los datos de supervivencia fueron analizados mediante el modelo de riesgos proporcionales de Mantel-Cox. La significación estadística se comprobó mediante un ANOVA monofactorial, seguido de una comparación post-hoc de Student-Newman-Keuls con el programa informático SPSS-PC (SPSS, Chicago IL).

Estudios neuropatológicos

45 Los ratones fueron perfundidos transcordialmente con paraformaldehído al 4 %. Se extrajeron los cerebros y la médula espinal completa, se congelaron en nitrógeno líquido y se cortaron en secciones transversales de 20 µm con un micrótomos deslizante. Las secciones del tronco encefálico y de la médula espinal se tiñeron con HE, azul de toluidina (secciones semidelgadas, de 0,5 µm), y con una inmunohistoquímica para el marcaje de los astrocitos (GFAP), de las motoneuronas colinérgicas (ChAT) y de las células dopaminérgicas (TH).

50

Resultados

Supervivencia

El criterio de valoración primario de este estudio era la supervivencia según se define en el protocolo animal. La esperanza media de vida de cada uno de los grupos se muestra en la tabla 1. La Figura 1 muestra las curvas complementarias de Kaplan-Meier. Los controles tienen una esperanza de vida media de 210,9 días (error estándar de las medias, EEM = 7,4779), mientras que los animales tratados con riluzol murieron después de 233,6 días (EEM = 12,6034). Debido en parte al comparativamente grande EEM, esta diferencia sólo estaba cercana al nivel de significación de $p = 0,05$. Los animales tratados con la dosis baja de rasagilina sola (0,5 mg/kg/día) sobrevivieron 223,8667 (EEM = 8,5037) días; esta prolongación de la supervivencia no era estadísticamente significativa. La dosis más grande de rasagilina aumentó la longevidad en 29 días (esperanza de vida de 239,8667; EEM = 4,4281); este resultado era estadísticamente significativo ($p < 0,001$). Observamos un efecto dependiente de la dosis de rasagilina según muestra el modelo de riesgos proporcionales de Mantel-Cox. La mayor ampliación de la longevidad se observó con la combinación de riluzol y rasagilina. Este efecto también era dependiente de la dosis, dado que la edad media de muerte era de 247,8667 (EEM = 7,9089) días con la combinación de 0,5 mg/kg/día de rasagilina, mientras que en el grupo con la combinación de 2,0 mg/kg/día de rasagilina, la longevidad se prolongó hasta 252,0 (EEM = 9,4047) días. Se demostró que ambos resultados eran estadísticamente diferentes de los controles ($p < 0,001$; $p < 0,001$), y del grupo tratado sólo con riluzol ($p < 0,02$; $p < 0,03$).

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

	N	Media	
		Supervivencia (días)	Error estándar
RA0,5	15	223,8667	8,5037
RA2	15	239,8677	4,4281
RI30	15	233,6000	12,6034
RIRA20,5	15	247,8667	7,9089
RIRA2	15	252,0000	9,4047
CONTROL	15	210,9333	7,4779

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

20

Actividad en la rueda giratoria

Los resultados de las mediciones de la actividad en la rueda giratoria de los 6 grupos eran ampliamente complementarios de los datos de supervivencia, pero también observamos unos efectos farmacológicos aparentemente independientes (Figura 2). Las diferencias entre los grupos se observaron pronto en el período preclínico, y las diferencias en la función persistieron hasta una fase tardía de la enfermedad. El análisis estadístico demostró que los animales tratados con rasagilina (con ambas dosis) y con riluzol eran más activos durante el transcurso del tratamiento, y también parecían mantener su actividad motora durante más tiempo en comparación con los controles (Tabla 2). Sin embargo, la actividad motora de los grupos tratados tanto con la dosis baja como con la dosis alta de rasagilina combinada con riluzol era menor - en contraste con el aumento en el tiempo de supervivencia.

Más específicamente, observamos una actividad en la rueda giratoria significativamente disminuida en ambos grupos tratados con rasagilina combinada con riluzol. Cuando se comparaba con la de los animales sin tratar, la actividad disminuida ya se había observado durante las semanas 9 a 12 ($p = 0,01$; $p = 0,04$). Durante las semanas 13 y 16 la actividad en la rueda giratoria de los grupos tratados sólo con rasagilina estaba significativamente aumentada cuando se comparaba con la actividad motora del grupo de control ($p = 0,007$; $p = 0,0003$). Este aumento en la actividad permaneció estable hasta la semana 29. En la semana 29, el comportamiento motor del grupo tratado con una dosis baja de rasagilina comenzó a disminuir, y únicamente el grupo tratado con una dosis alta de rasagilina todavía era significativamente más activo ($p = 0,01$, semanas 29-36). No había ningún caso de muerte prematura en ninguno de los grupos, y no observamos ningún signo de sobretoxicidad ni con la rasagilina sola ni con la combinación de riluzol/rasagilina.

40

Dado que los grupos con la combinación de rasagilina/riluzol sobrevivieron más tiempo que todos los demás grupos (véase anteriormente), pero tenían una actividad motora disminuida, otros factores adicionales distintos a los

asociados a una neuroprotección deben ser responsables del descenso en la actividad motora. Sin estar limitados a ninguna teoría específica, creemos que una posible explicación podría ser que la combinación tenía un ligero efecto sedante sobre los animales. Sin embargo, esta sedación no se observó durante la observación diaria, y no tuvo impacto sobre la ganancia de peso o la ingesta de agua de bebida.

5 Tabla 2. Estadística de los efectos de la rasagilina y del riluzol sobre la actividad en la rueda giratoria en ratones transgénicos SOD1

	Semanas 9-12	Semanas 13-16	Semanas 17-20	Semanas 21-24	Semanas 25-28	Semanas 29-36
RA0,5	10.087	9.037,14	8.124,12	6.070,08	4.236,96	1.196,69
RA2	11.056	9.999,44	8.787,09	7.873,22	5.902,76	2.147,29
RI30	9.729,58	7.556,57	7.033,85	4.687,05	2.696,11	1.249,13
RIRA20,5	7.653,71	6.692,88	4.840,69	3.856,61	3.558,49	1.410,11
RIRA2	8.019,22	5.775,98	5.339,56	4.687,97	3.165,95	1.626,65
Control	9.710,04	6.545,52	5.079,64	3.764,38	2.201,02	766,28

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

Análisis

10 Analizamos el efecto neuroprotector del compuesto inhibidor de la MAO-B y antiapoptótico rasagilina solo y junto con el supuesto bloqueante de la liberación de glutamato riluzol en el modelo G93A de esclerosis lateral amiotrófica familiar (fELA). El fármaco tenía un convincente efecto terapéutico dependiente de la dosis tanto en la función motora como en la supervivencia de los animales preclínica y clínica. También averiguamos que la combinación de rasagilina con riluzol es segura, y aumentó la supervivencia en aproximadamente un 20 % de una forma dependiente de la dosis.

15 Se cree que el mecanismo de acción del riluzol está relacionado con su efecto estabilizante sobre los canales de sodio y la resultante reducción de la liberación presináptica de glutamato (Doble, A.); es probable que el efecto neuroprotector de la rasagilina sea independiente de la inhibición de la MAO-B y sea debido al efecto estabilizador del potencial de membrana mitocondrial del de tipo bcl-2 (Maruyama, W. et al., (2001) J. Neurochem.; Maruyama, W. et al., (2000) J. Neural Trans.).

20 Aunque el riluzol se considera el primer fármaco con un efecto neuroprotector en la esclerosis lateral amiotrófica, existe un acuerdo universal sobre que debería mejorarse el efecto del riluzol. En el presente estudio hemos demostrado que una combinación del inhibidor de la MAO-B rasagilina y riluzol aumenta de una forma dependiente de la dosis la longevidad en ratones G93A de una forma considerable. Estos fármacos también tienen un efecto beneficioso y dependiente de la dosis sobre la función motora. Sin embargo, durante un tratamiento temprano, no hubo ningún efecto de las combinaciones farmacológicas sobre la función motora. Sin estar limitados a ninguna teoría en particular, consideramos la ausencia de efectos funcionales tempranos de los regímenes de tratamiento de combinación como una consecuencia de un efecto farmacológico no específico sobre el comportamiento o la actividad motora, o sobre ambos. No observamos otros efectos secundarios o tóxicos de los fármacos empleados. La validez de nuestros resultados está subrayada por la reproducción parcial del efecto del riluzol (Gurney M. E. et al., Ann. Neurol. (1996)).

Desde nuestro punto de vista, la interpretación de los resultados de estos estudios sólo está limitada por los inconvenientes conocidos del modelo G93A. Estos inconvenientes, y cómo son abordados por el presente estudio, se recogen a continuación.

35 Es bien conocido que la esperanza de vida de los ratones usados en el presente estudio aumenta en las generaciones posteriores. Con objeto de tener en cuenta este factor, usamos coherentemente la generación F2. Por lo tanto, no consideramos que la variación causada por este factor sea un problema grave.

40 De forma análoga, la variación en la longevidad dentro de una misma generación tampoco es una consideración importante para la interpretación de los resultados de este estudio, dado que el efecto del tratamiento era comparativamente grande. Sin embargo, sin estar limitados a ninguna teoría en particular, creemos que esta variación es la causa de la observación de que el efecto del riluzol (supervivencia media de 234 días) no sea estadísticamente significativo en nuestro estudio, aunque es de un orden de magnitud similar al del efecto del riluzol previamente observado por otros (Gurney M. E. et al., Ann. Neurol. (1996)) y por nosotros mismos (resultados no publicados). Además, creemos que la ausencia de un efecto estadístico formal del grupo con una dosis baja de rasagilina (supervivencia media de 224 días) es parcialmente explicado por esta divergencia. Consideramos esta

variación normal.

Con objeto de tener en cuenta el hecho de que incluso dentro de la misma generación, la variación interindividual en la actividad motora es relevante, normalizamos las mediciones de la actividad motora antes del análisis estadístico.

5 Finalmente, a menudo se destaca que la medición del tiempo de supervivencia tiene sus dificultades, y debido a los diferentes niveles de cuidado animal, los resultados del tratamiento según se indican en la bibliografía pueden no ser comparables. Sin embargo, no consideramos que este factor sea significativo para el resultado de este estudio, dado que el sacrificio de los animales no era una decisión de los investigadores sino de un veterinario independiente que no estaba implicado en el estudio.

10 Por lo tanto, el estudio divulgado demuestra que la combinación de rasagilina y riluzol es una combinación clínica eficaz para el tratamiento de la ELA.

Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de encontrar, simplemente mediante el uso de una experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas específicamente en el presente documento. Dichos equivalentes pretenden estar englobados en el ámbito de las siguientes reivindicaciones.

15 Referencias

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

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

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

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

25 Gurney ME, Pu H, Chiu AY, et al "Motor neuron degeneration in mice that express a human superoxide dismutase mutation". *Science* 1994; 264: 1772-1775.

Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, et al. "Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1996; 39: 147-157.

30 Huang W, Chen Y, Shohani E, Weinstock M. "Neuroprotective effect of rasagiline, a selective monoamine oxidase-B inhibitor, against closed head injury in the mouse". *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 336: 127-135.

Kong J, Xu Z. "Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1". *J. Neurosci.* 1998; 18: 3241-3250.

Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, et al. "Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis". *Lancet* 1996; 347: 1425-1431.

35 Ludolph AC, Meyer T, Riepe MW. "Antiglutamate therapy in ALS - which is the next step?" *J. Neural Transm.* 1999; (Supl.) 55: 79-96.

Maruyama W, Akao Y, Youdim MBH, Naoi M. "Neurotoxins induce apoptosis in dopamine neurons: protection by N-propargylamine-1 (R)- and (S)-aminoindan, rasagiline and TV1022". *J. Neural Transm.* 2000; (Supl) 60: 171-186.

40 Maruyama W, Akao Y, Youdim MBH, David BA, Naoi M. "Transfection-enforced bcl-2 overexpression and an anti-Parkinson drug, rasagiline, prevent nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by an endogenous dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol". *J. Neurochem.* 2001; 78: 727-735.

Speiser Z, Mayk A, Eliash S, Cohen S. "Studies with rasagiline, a monoamine oxidase-B inhibitor, in experimental focal ischemia in the rat". *J. Neural Transm.* 1999; 106: 593-606.

Traynor BJ, Alexander M, Corr B, et al. "Riluzole and prognosis in amyotrophic lateral sclerosis: Findings of the Irish amyotrophic lateral sclerosis register over a five year study period 1995-2000". *ALS and other motor neuron disorders* 2001; 2 (Supl. 2): 43-44.

5 Turner MR, Bakker M, Sham P, et al. "The King's data base 1990-2000: An analysis of the effect on survival of interventions in ALS". *ALS and other motor neuron disorders* 2001; 2 (Supl. 2): 43.

Vielhaber S, Kunz D, Winkler K, et al. "mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis". *Brain* 2000; 123: 1339-1348.

Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR et al. "An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria". *Neuron* 1995; 14: 1105-1116.

10 Youdim MBH, Gross A, Finberg JPM. 'Rasagiline (N-propargyl-1 R(+)-aminoindan), a selective and potent inhibitor of mitochondrial monoamine oxidase B". *Br. J. Pharmacol.* 2001; 132: 500-506.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la elaboración de un medicamento que contiene una cantidad eficaz de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la mejora de la función motora en un sujeto que padece esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
2. El uso de la reivindicación 1, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es la sal de cloruro, de mesilato, de maleato, de fumarato, de tartarato, de clorhidrato, de bromhidrato, de esilato, de p-toluensulfonato, de benzoato, de acetato, de fosfato o de sulfato.
3. El uso de la reivindicación 2, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es la sal de mesilato.
- 10 4. Uso de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la elaboración de un primer medicamento en un envase que contiene una cantidad eficaz de R(+)-N-propargil-1-aminoindano para el aumento de la función motora en un sujeto que padece esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
- 15 5. El uso de la reivindicación 4, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es la sal de cloruro, de mesilato, de maleato, de fumarato, de tartarato, de clorhidrato, de bromhidrato, de esilato, de p-toluensulfonato, de benzoato, de acetato, de fosfato o de sulfato.
6. El uso de la reivindicación 5, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es la sal de mesilato.
7. R(+)-N-propargil-1-aminoindano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad eficaz para su uso en el aumento de la actividad motora en un sujeto que padece esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
- 20 8. La sal farmacéuticamente aceptable para su uso en el aumento de la actividad motora en un sujeto que padece esclerosis lateral amiotrófica (ELA) de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la sal farmacéuticamente aceptable es la sal de cloruro, de mesilato, de maleato, de fumarato, de tartarato, de clorhidrato, de bromhidrato, de esilato, de p-toluensulfonato, de benzoato, de acetato, de fosfato o de sulfato.
- 25 9. La sal farmacéuticamente aceptable para su uso en el aumento de la actividad motora en un sujeto que padece esclerosis lateral amiotrófica (ELA) de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la sal farmacéuticamente aceptable es la sal de mesilato.

Figura 1

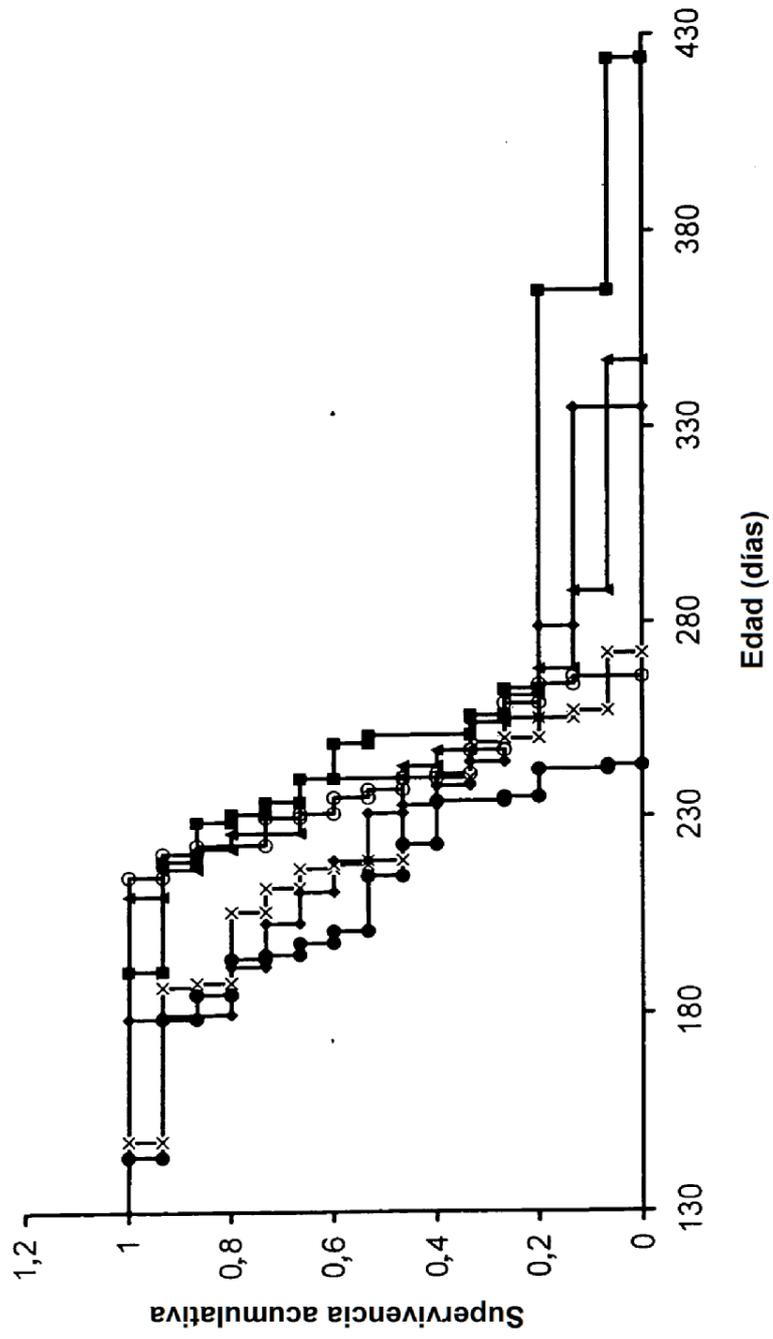


Figura 2

