

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 541**

51 Int. Cl.:

A61K 31/395 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

A61K 31/4523 (2006.01)

A61K 31/4985 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2013 PCT/EP2013/058212**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13156614**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2013 E 13718320 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2838530**

54 Título: **Métodos para tratar la enfermedad de Parkinson**

30 Prioridad:
20.04.2012 US 201261636054 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.07.2017

73 Titular/es:
**UCB PHARMA, S.A. (100.0%)
60, allée de la Recherche
1170 Brussels, BE**

72 Inventor/es:
**MICHEL, ANNE;
DOWNEY, PATRICK;
MONTEL, FLORIAN;
SCHELLER, DIETER y
CHRISTOPHE, BERNARD**

74 Agente/Representante:
ELZABURU SLP, .

ES 2 627 541 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

Métodos para tratar la enfermedad de Parkinson

Campo de la invención

5 La invención se refiere a composiciones y métodos para tratar la enfermedad de Parkinson o para contrarrestar los síntomas de la enfermedad de Parkinson.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central. Los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson son el resultado de la muerte de células generadoras de dopamina en la sustancia negra, una región del mesencéfalo; la causa de esta muerte celular es desconocida. Para el momento en que los síntomas clínicos de la EP se vuelven evidentes, se han perdido aproximadamente un 70-80 % de las neuronas dopaminérgicas del estriado. Tempranamente en el curso de la enfermedad, los síntomas más obvios son los relacionados con el movimiento. Más tarde, pueden surgir problemas cognitivos y conductuales, ocurriendo comúnmente demencia en las etapas avanzadas de la enfermedad. Sin embargo, aunque el tratamiento dopaminérgico es capaz de tratar eficazmente los síntomas motores en las etapas tempranas de la enfermedad, no es un tratamiento satisfactorio ya que su eficacia desaparece en las etapas tardías de la enfermedad y su uso prolongado conduce a complicaciones motoras.

Los síntomas motores primordiales de la enfermedad de Parkinson (EP), bradicinesia, acinesia y temblor en reposo son el resultado de una disminución del contenido de DA del estriado que causa un desequilibrio en los circuitos neuronales.

20 Las terapias de sustitución de DA (dopamina) usando el precursor de DA L-dihidroxifenilalanina (L-dopa) o agonistas de receptor de dopamina (D)2/3 son el pilar de las estrategias de tratamiento actuales. Sin embargo, dichos tratamientos gestionan los síntomas clínicos de la enfermedad primaria solo y no hacen nada por tratar las causas subyacentes de la enfermedad, concretamente la pérdida progresiva de células dopaminérgicas. En lugar de ello, pueden complicar la situación debido a la inducción de movimientos involuntarios anormales (MIA) o discinesia. Además, el tratamiento a largo plazo con L-dopa está acompañado por fluctuaciones impredecibles de sus efectos. Por lo tanto, son necesarias estrategias novedosas para tratar los síntomas motores, para mejorar o prevenir la discinesia y también para retardar, prevenir o revertir la pérdida neuronal dopaminérgica. Por tanto, los agentes terapéuticos que interfieran con uno o idealmente con varios de estos eventos podrían conducir potencialmente a una clase novedosa de fármacos quizás con propiedades modificadoras de la enfermedad para EP.

30 Estos fármacos novedosos se espera que sean tan eficaces como la L-dopa, pero no deberían inducir fluctuaciones motoras ni sensibilizarse de forma cruzada con el tratamiento dopaminérgico.

35 En las etapas tempranas de la EP, la L-dopa se metaboliza hasta dopamina, que se almacena en las terminales dopaminérgicas presinápticas supervivientes en el estriado (sirviendo como almacenamiento y tampón). Su liberación se controla si los bucles de realimentación están intactos. Sin embargo, a medida que se pierden cada vez más terminales, se pierde la capacidad de almacenamiento y tamponamiento de dopamina y se acorta el efecto de la duración de L-dopa. Por tanto, la toma oral y posterior exposición por pulsos de los ganglios basales provoca discinesia por dosis máxima y/o fluctuaciones motoras. Una vez la degeneración nigral se ha desarrollado a un nivel en que aparecen síntomas motores, una sola inyección de L-dopa es suficiente para establecer una respuesta que se denomina "de cebado" (Morelli *et al.*, 1987; Delfino *et al.*, 2004): Una vez se ha administrado la L-dopa e inducido discinesia, cada exposición a fármaco posterior provocará esa respuesta, incluso si no se hubiera administrado durante varias semanas. El antagonista de receptor de NMDA (D-aspartato de N-metilo) débil amantadina puede reducir la intensidad de la discinesia, lo que sugiere que la sobreactividad de las entradas glutamatérgicas en los ganglios basales está implicada en el cebado y la discinesia (Blanchet *et al.*, 1998). Los estudios clínicos y preclínicos proporcionan pruebas de una función glutamatérgica alterada en el estriado en animales y pacientes discinéticos, incluyendo cambios en la expresión, fosforilación y organización sináptica de receptores de glutamato (Chase *et al.*, 2000). Además, los receptores de NMDA que contienen subunidades NR2B están enriquecidos en el estriado y hay pruebas de que los antagonistas de receptor de AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) pueden suprimir también la discinesia (Bibbiani *et al.*, 2005). Estos datos parecen indicar que la discinesia implica una entrada corticoestriada glutamatérgica anormal.

50 Para revertir la discinesia establecida o para prevenir que aparezca discinesia en primer lugar, un enfoque sería reemplazar el tratamiento dopaminérgico tempranamente en la terapia. Debido a su distribución única en los ganglios basales y a sus interacciones con las cascadas de señalización intracelular relacionada con dopamina, se han desarrollado antagonistas de A_{2A} y antagonistas de NDMA selectivos de la subunidad NR2B. Sin embargo, los ensayos clínicos con antagonistas de A_{2A} (istradefilina, Mizuno *et al.* 2010) o antagonistas de NR2B (traxoprodilo, Nutt *et al.*, 2008) como tratamiento en pacientes de EP no mostraron la eficacia esperada.

Como ya se ha mencionado, el cebado se define clásicamente como el proceso mediante el cual el cerebro se sensibiliza de tal modo que la administración de una terapia dopaminérgica modifica la respuesta al tratamiento

dopaminérgico posterior. El cebado se induce por tratamiento dopaminérgico agudo en un cerebro desnervado.

El modelo de rata con lesión unilateral por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) puede representar un modelo cuantitativo de cebado. Tales ratas con lesión por 6-OHDA tratadas crónicamente con fármacos dopaminérgicos (L-dopa o agonistas de dopamina) desarrollan un aumento progresivo de las rotaciones contralaterales (concretamente, alejándose del lado de la lesión) que se denomina "sensibilización conductual". En este modelo, la administración de la denominada dosis "de cebado" de agonista de receptor de DA sensibiliza al animal ante el efecto de una exposición posterior a agonistas de DA.

Puede observarse un fenómeno de "sensibilización cruzada" cuando un sujeto se sensibiliza ante una sustancia diferente de la sustancia a la que ya se ha sensibilizado el sujeto.

La sensibilización cruzada se ha observado ya entre comportamientos inducidos por cafeína y L-dopa en ratones hemiparkinsonianos (Yu *et al.*, 2006).

Los receptores de adenosina representan una subclase del grupo de receptores acoplados a proteína G nucleotídicos y nucleosídicos de purina conocidos como purinoceptores; los principales subtipos de receptor de adenosina farmacológicamente distintos son conocidos como A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃. Los subtipos de receptor de adenosina dominantes en el cerebro son A₁ y A_{2A}. Aunque el subtipo de receptor de adenosina A₁ se encuentra en todo el cerebro a alta densidad, la distribución del receptor A_{2A} está más restringida; se encuentra a alta densidad en el estriado (caudado-putamen, núcleo accumbens, tubérculo olfativo), donde se colocaliza con el receptor de dopamina D2 en neuronas de salida estriadopálicas. La localización discreta del receptor A_{2A} en el estriado y su capacidad de antagonizar funcionalmente las acciones del receptor de D2 ha conducido a la sugerencia de la utilidad potencial de antagonistas del receptor A_{2A} para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Parkinson (EP).

Los receptores de D-aspartato de N-metilo (NMDA) son ensamblajes heteroméricos de subunidades. Las dos familias de subunidades principales se designan NR1 y NR2. La familia de subunidades NR2 se divide en cuatro tipos de subunidades que son: NR2A, NR2B, NR2C y NR2D, que exhiben diferentes propiedades fisiológicas y farmacológicas tales como activación de canal iónico, sensibilidad a magnesio, perfil farmacológico y en la distribución anatómica.

Aunque la inhibición del receptor de MDA tiene utilidad terapéutica principalmente en el tratamiento de dolor y enfermedades neurodegenerativas, hay tendencias significativas a que muchos antagonistas de receptor de NMDA disponibles puedan causar efectos secundarios potencialmente graves. La distribución más discreta de la subunidad NR2B en el sistema nervioso central puede apoyar un perfil reducido de efectos secundarios de agentes que actúan selectivamente en este sitio. Sin embargo, incluso los antagonistas selectivos de NR2B pueden exhibir una baja afinidad hacia la subunidad NR2B del receptor de NMDA. También, algunos antagonistas de NR2B que se dice que son selectivos de NR2B podrían no ser enteramente específicos. Hauber y Munkle (1996) afirmaban que los efectos anticatalépticos de los antagonistas de receptor de NMDA CGP37849 (competitivo) y dizocilpina (MK-801, no competitivo) pueden potenciarse por la coadministración del antagonista de receptor de adenosina no selectivo/inhibidor de fosfodiesterasa teofilina.

El documento WO2012/03980 divulga combinaciones de antagonistas del receptor A_{2A} y otros agentes terapéuticos tales como inhibidores de receptor de NDMA para uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Compendio de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. La invención se refiere a composiciones y métodos para tratar la enfermedad de Parkinson o para contrarrestar los síntomas de o asociados a la enfermedad de Parkinson o para contrarrestar los efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

El primer aspecto de la presente divulgación atañe a un método de tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP) en un mamífero que comprende administrar un primer agente farmacéutico y un segundo agente farmacéutico, en el que el primer agente farmacéutico es un antagonista del receptor de adenosina 2 (A_{2A}) y el segundo agente farmacéutico es un antagonista del receptor de D-aspartato de N-metilo (NMDA) de subtipo NR2B.

Un segundo aspecto de la presente divulgación atañe a un método de tratamiento de la enfermedad de Parkinson mediante el que se administran esencialmente el antagonista de A_{2A} y el antagonista de NR2B junto con L-dopa. El antagonista de A_{2A} y el antagonista de NR2B se administran en la fase temprana de las enfermedades y antes del uso de L-dopa o junto con L-dopa una vez se ha iniciado su administración.

Un tercer aspecto de la presente divulgación atañe a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de un antagonista del receptor de adenosina A_{2A} y un antagonista de NR2B en un portador o excipiente farmacéutico aceptable.

Un cuarto aspecto de la presente divulgación atañe a un kit de piezas que comprende:

(a) un primer recipiente que contiene una formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del receptor A_{2A} y

(b) un segundo recipiente que contiene una formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de NR2B.

5 Resultarán evidentes aspectos adicionales de la divulgación a partir de la memoria descriptiva detallada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 El aspecto principal de esta divulgación consiste en un método de tratar la enfermedad de Parkinson (EP) en un mamífero que comprende administrar un primer agente farmacéutico y un segundo agente farmacéutico, en el que el primer agente farmacéutico es un antagonista del receptor de adenosina 2 (A_{2A}) y el segundo agente farmacéutico es un antagonista del receptor de D-aspartato de N-metilo (NDMA) de subtipo NR2B.

15 Un antagonista de A_{2A} es un compuesto químico o péptido o proteína que bloquea o contrarresta la función del receptor A_{2A} , por interacción ortoestérica o por interacción alostérica. Es decir, un agente que prevendrá que el ligando endógeno adenosina o un agonista de A_{2A} estimule el receptor y desencadene un efecto. De forma importante, la presente invención está basada en el uso de un antagonista de A_{2A} , concretamente un antagonista de receptor de adenosina selectivo.

Un antagonista de NR2B es un compuesto químico o un péptido o una proteína que bloquea o contrarresta la función del receptor NR2B; todos los antagonistas selectivos de NR2B identificados hasta ahora actúan uniéndose a un sitio alostérico en el receptor. La activación del receptor NR2B por los coagonistas glutamato y glicina (o NMDA) conduce al flujo de entrada de calcio, que puede prevenirse por un antagonista.

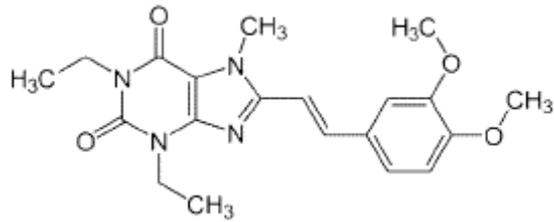
20 Es conocida y se ha reivindicado una gran variedad de antagonistas de A_{2A} , p.ej. en las siguientes solicitudes de patente internacional: WO 2012/03898, WO 2011/06152, WO 2011/06020, WO 2011/053507, WO 2010/040003, WO 2010/037122, WO 2009/055308, WO 2009/050198, WO 2008/055711, WO 2007/047293, WO 2007/038212, WO 2006/137527, WO 2006/129626, WO 2006/124770, WO 2006/083949, WO 2012/03898, WO 2011/06152, WO 2011/06020, WO 2011/05350, WO 2010/04000, WO 2010/03712, WO 2009/055308, WO 2009/050198, WO 2008/055711, WO 2007/047293, WO 2007/038212, WO 2006/137527, WO 2006/129626, WO 2006/124770, WO 2006/083949.

Los antagonistas de A_{2A} conocidos incluyen los siguientes, de los que algunos están en desarrollo clínico:

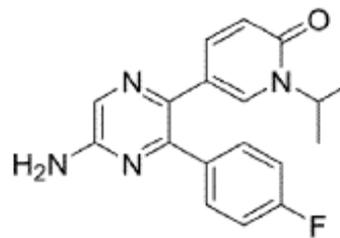
- Istradefilina (KW-6002)
- MSX-3
- 30 • Preladenant (SCH-420.814)
- PFB-509
- SCH-58261
- SCH-412.348
- SCH-442.416
- 35 • SCH-800900
- ST-1535
- ST-4206
- Cafeína
- VER-6623
- 40 • VER-6947
- VER-7835
- V-81444
- Vipadenant (BIIB-014)
- ZM-241.385

ES 2 627 541 T3

La estructura química de la istradefilina (KW-6002) es como sigue:

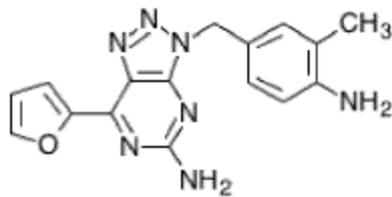


La estructura química de ASP5854 (5-[5-amino-3-(4-fluorofenil)pirazin-2-il]-1-isopropilpiridin-2(1H)-ona) es como sigue:

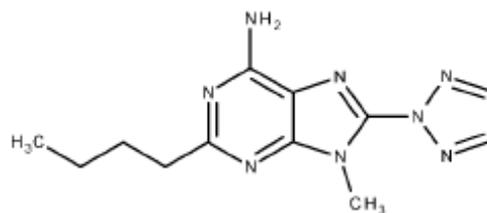


5

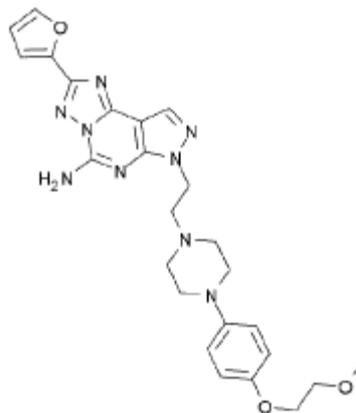
La estructura química de vipadenant (BIIB014) es como sigue:



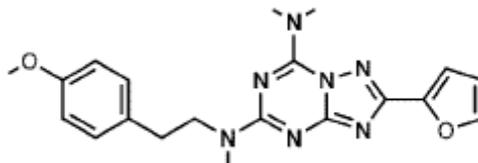
La estructura química de ST-1535 es como sigue:



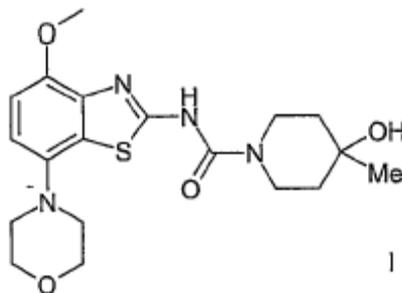
10 La estructura química de preladenant (SCH420814) es como sigue:



La estructura química de ZM-241.385 es como sigue:



Según la presente invención, el antagonista de A_{2A} usado en la presente invención es trozadenant que tiene la fórmula (I)



5

que es (4-metoxi-7-morfolin-4-ilbenzotiazol-2-il)amida del ácido 4-hidroxi-4-metilpiperidin-1-carboxílico, y sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y cocrisales de las mismas.

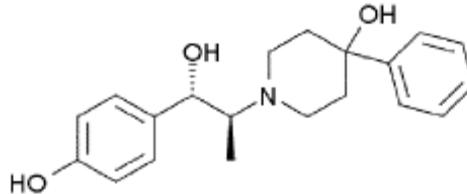
Son conocidos y se han reivindicado una gran variedad de antagonistas de NR2B, p.ej., en las siguientes solicitudes de patente internacional: WO 2010/1221, WO 2009/118187, WO 2009/058261, WO 2009/025265, WO 2008/155778, WO 2007/099828, WO 2007/063839, WO 2007/063286, WO 2007/006157, WO 2006/137465, WO 2006/113471, WO 2006/017409, WO 2006/010967, WO 2006/010964, WO 2005/102390, WO 2005/080317, WO 2005/035522, WO 2005/030720, WO 2005/035523, WO 2005/019222, WO 2005/019221, WO 2004/108705, WO 2004/089366, WO 2004/048364, WO 2004/054579, WO 03/091241, WO 03/084931, WO 03/010159, WO 02/100352, WO 02/080928, WO 02/068409, WO 02/34718, WO 02/12892, WO 02/09736, WO 02/00629, WO 01/98262, WO 01/30330, WO 01/32634, WO 01/32171, WO 01/32177, WO 01/32615, WO 01/32179, WO 01/32174, WO 00/67803. Los antagonistas de NR2B conocidos incluyen los siguientes, de los que algunos de ellos están en desarrollo clínico.

- MK-0657
- Traxoprodilo (CP-101.606)
- EVT-101
- 20 • EVT-102
- EVT-103
- Radiprodilo (RGH 896)
- RG-1
- ED-1529
- 25 • NeurOp
- NeurOp-2
- NeurOp-3
- NeurOp-4
- TXT-0300
- 30 • HON-0001
- Ifenprodilo
- Safaprodilo

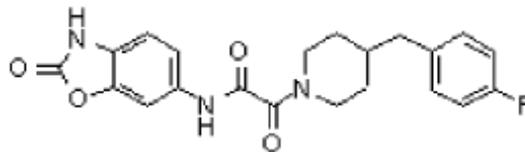
- N-((1S,3S)-3-[3-(4-metilbencil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]ciclopentil]-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (también designado a continuación y en la tabla 1 “**compuesto 1**”).

Los antagonistas de NR2B o antagonistas de A_{2A} mencionados en la presente memoria están comercialmente disponibles o pueden prepararse según metodologías que son conocidas por un especialista en la materia, incluyendo las referencias de patente mencionadas en la presente memoria.

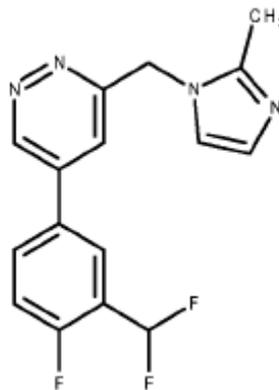
La estructura química de traxoprodilo (CP-101.606) es como sigue:



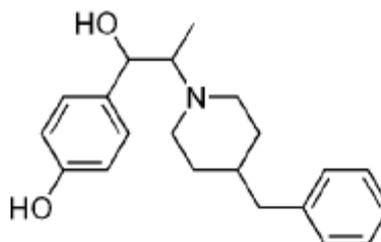
La estructura química de radiprodilo (RGH 896) es como sigue:



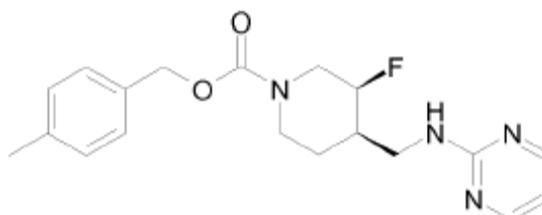
10 La estructura química de EVT-101 es como sigue:



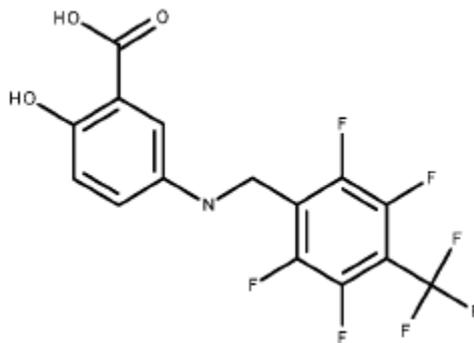
La estructura química de ifenprodilo es como sigue:



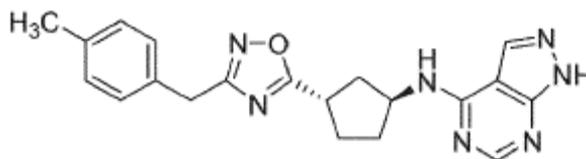
La estructura química de MK-0657 es como sigue:



La estructura química de safaprodilo es como sigue:



La estructura química de N-((1S,3S)-3-[3-(4-metilbencil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]ciclopentil)-1H-pirazol[3,4-d]pirimidin-4-amina (compuesto 1) es como sigue:



5

El radiprodilo es el antagonista de receptor de NMDA de subtipo NR2B usado según la presente invención. En una realización de la presente divulgación, el antagonista de A_{2A} es selectivo frente a cada uno de los demás subtipos de receptor de adenosina A₁, A_{2B} y A₃ por un factor de al menos 10, preferiblemente 30 e idealmente 100 o más.

10 En una realización de la presente divulgación, el antagonista de NR2B es selectivo frente a cada uno de los demás subtipos de receptor de NMDA, NR2A, NR2C y NR2D, por un factor de al menos 10, preferiblemente 30 e idealmente 100 o más.

En una realización de la presente invención, la relación de dosis de antagonista de A_{2A} a antagonista de NR2B varía de entre 30:1 a 1:30, en otra varía de 10:1 a 1:10, en otra de 3:1 a 1:3, todavía en otra es de aproximadamente 1:1.

15 Según la presente invención, la composición comprende la combinación de radiprodilo como antagonista de NR2B y tozadenant como antagonista de A_{2A}. La relación entre esos dos compuestos puede variar de 30:1 a 1:30, en otra varía de 10:1 a 1:10, en otra de 3:1 a 1:3.

En el método divulgado en la presente memoria, se administran ambos agentes farmacéuticos, el antagonista de A_{2A} y el antagonista de NR2B, esencialmente al mismo tiempo. En una realización, se administran exactamente al mismo tiempo solos o en combinación con otros productos farmacéuticos para el tratamiento de EP.

20 En una realización adicional, se administran el antagonista de A_{2A} y el antagonista de NR2B conjuntamente en cualquier momento una vez ha empezado la administración de L-dopa.

En una realización adicional, se administran el antagonista de A_{2A} y el antagonista de NR2B conjuntamente con un agonista de dopamina en cualquier momento durante el tratamiento de la enfermedad.

25 En una realización adicional, se administran el antagonista de A_{2A} y el antagonista de NR2B conjuntamente con L-dopa. La L-dopa es actualmente el tratamiento de referencia para tratar la enfermedad de Parkinson. Las preparaciones de referencia (Sinemet, Atamet) combinan levodopa con carbidopa, que mejora la acción de la levodopa y reduce algunos de sus efectos secundarios, particularmente las náuseas. Las dosificaciones varían, aunque la preparación se toma habitualmente en 3 o 4 dosis divididas al día.

30 Las dosificaciones típicas de L-dopa/carbidopa son: levodopa/carbidopa 100/25 mg 3 veces/día durante el estado temprano de la enfermedad. En etapas tardías, puede procurarse hasta 1000 mg de levodopa con 30 mg de carbidopa al día, aunque la recomendación actual sugiere no dosificar más de 400 a 600 mg de levodopa.

35 Los productos farmacéuticos adicionales para el tratamiento de EP incluyen amantadina (Symmetrel®), benzotropina (Cogentin®), bromocriptina (Parlodel®), entacapona (Comtan®), pergolida (Permax®), pramipexol (Mirapex®), ropinirol (Requip®), selegilina (Eldepryl®), Sinemet® (carbidopa/levodopa), tolcapona (Tasmar®) y rotigotina (Neupro®).

En una realización de la presente invención, se administran el antagonista de A_{2A} y el antagonista de NR2B solos o conjuntamente con L-dopa una vez al día.

Un aspecto adicional de la presente divulgación atañe a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de antagonista del receptor A_{2A} de adenosina y antagonista de NR2B en un portador farmacéuticamente aceptable o mezclados con excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 En una realización de la presente divulgación, la relación de dosis de antagonista de A_{2A} a antagonista de NR2B en dicha composición farmacéutica varía entre 30:1 y 1:30, en otra varía de 10:1 a 1:10, en otra de 3:1 a 1:3 y todavía en otra es de aproximadamente 1:1.

Según la presente invención, la composición comprende la combinación de radiprodilo como antagonista de NR2B y tozadenant como antagonista de A_{2A} . La relación entre esos dos compuestos puede variar de 30:1 a 1:30, en otra varía de 10:1 a 1:10, en otra de 3:1 a 1:3.

10 La composición farmacéutica podría ser una combinación fija que combina tanto el antagonista del receptor de adenosina A_{2A} como el antagonista de NR2B en un comprimido o la composición farmacéutica podría ser un kit de piezas.

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica forma un kit de piezas que comprende:

15 (a) un primer recipiente que contiene una formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de toradenant, y

(b) un segundo recipiente que contiene una formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de radiprodilo.

20 Las composiciones según la presente invención son para uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Tales composiciones contienen típicamente el ingrediente farmacéutico activo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los diluyentes y portadores adecuados pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la vía de administración deseada, p.ej. oral, rectal, parenteral o intranasal.

25 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración oral pueden ser sólidos o líquidos y pueden estar, por ejemplo, en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas de gelatina, disoluciones, jarabes, gomas de mascar y similares.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos según la invención pueden administrarse, por ejemplo, por vía oral, parenteral, concretamente intravenosa, intramuscular o subcutánea, intratecal o por inhalación o intranasal.

30 Con este fin, el ingrediente activo puede mezclarse con un diluyente inerte o un portador no tóxico farmacéuticamente aceptable tal como almidón o lactosa. Opcionalmente, estas composiciones farmacéuticas pueden contener también un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina, un disgregante tal como ácido algínico, un lubricante tal como estearato de magnesio, un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal, un edulcorante tal como sacarosa o sacarina o agentes colorantes o un agente aromatizante tal como menta piperita o salicilato de metilo.

35 Como se usa en la presente memoria, "sales farmacéuticamente aceptables" hace referencia a derivados en los que el compuesto original se modifica elaborando sales de ácido o base del mismo. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, sales de ácido mineral u orgánico de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto original formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico y similares.

45 La invención contempla también composiciones que pueden liberar la sustancia activa de manera controlada. Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse para administración parenteral están en forma convencional tal como disoluciones o suspensiones acuosas u oleosas contenidas generalmente en ampollas, jeringuillas desechables, viales de vidrio o plástico o envases de infusión.

50 Además del ingrediente activo, estas disoluciones o suspensiones pueden contener opcionalmente también un diluyente estéril tal como agua para inyecciones, una disolución salina fisiológica, aceites, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos, agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico, antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio, agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético, tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para ajustar la osmolaridad tales como cloruro de sodio o

dextrosa.

Se divulgan también en la presente memoria composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de la presente invención en forma de un cocrystal farmacéuticamente aceptable. La dosificación puede variar dentro de amplios límites y, por supuesto, tendrá que ajustarse a los requisitos individuales en cada caso particular. En el caso de administración oral, la dosificación para adultos puede variar de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1000 mg al día de un compuesto de fórmula general I o de la correspondiente cantidad de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La dosificación diaria puede administrarse como una sola dosis o en dosis divididas y, además, puede superarse también el límite superior cuando se encuentra que está indicado.

Preferiblemente, la cantidad de cada uno de antagonista de A_{2A} y antagonista de NR2B, o su sal farmacéuticamente aceptable, que se administra para el tratamiento de un paciente humano se ajusta de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 200/1000 mg al día. La dosis diaria total puede administrarse como dosis únicas o divididas. Dicha cantidad de tratamiento diaria o dosis diaria puede ser de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 45 mg, de aproximadamente 6 mg a aproximadamente 35 mg, de aproximadamente 8 mg a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 25 mg, de aproximadamente 12 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 14 mg a aproximadamente 18 mg, de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 18 mg, o puede oscilar entre todas las cantidades anteriormente enumeradas. Por ejemplos, la cantidad de tratamiento diario es de aproximadamente 2 mg, 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 8 mg o aproximadamente 10 mg a aproximadamente 12 mg, aproximadamente 14 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 16 mg, aproximadamente 18 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg o aproximadamente 35 mg. En particular, la cantidad de tratamiento diario es de aproximadamente 2 mg, o aproximadamente 4 mg a aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg o aproximadamente 30 mg.

Los datos disponibles sugerirían que hay una coactivación implicada en las composiciones y usos según la presente invención.

Ejemplos

Los síntomas motores clásicos de la enfermedad de Parkinson (EP) están asociados a la pérdida de células dopaminérgicas nigrales y una disminución del contenido de dopamina de caudado-putamen que conducía a la introducción de la terapia de reemplazo de dopamina. La inyección estereotóxica unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en el haz prosencefálico medial causa la destrucción de la vía nigroestriada y la pérdida de la entrada dopaminérgica al estriado. Este modelo, desarrollado en 1970 por Ungerstedt (Ungerstedt 1971; Ungerstedt y Arbuthnott 1970), imita el estado de EP avanzada y se usa para el ensayo de fármacos sintomáticos. La disfunción masiva del sistema dopaminérgico en un hemisferio cerebral crea un desequilibrio sensomotor entre ambos lados del cuerpo, que conduce a déficit conductuales específicos. Los fármacos que estimulan los sitios receptores posinápticos normalmente orientados a dopamina (p.ej., agonistas de dopamina o L-dopa) causan que la rata gire en una dirección opuesta al lado destruido (rotaciones contraversivas). Esta respuesta de giro se considera que es la consecuencia de la supersensibilidad del receptor dopaminérgico que sigue a la denervación de (partes del) estriado (para una revisión, véase Schwarting y Huston 1996).

La respuesta de giro contralateral inducida por L-dopa ha representado, durante mucho tiempo, un modelo útil y predictivo para cribar e identificar nuevos fármacos antiparkinsonianos, valorando cuantitativamente los efectos de fármacos sobre la recuperación sensomotora.

El uso combinado de antagonistas de A_{2A}/NR2B respecto a cada uno de los antagonistas solos ha mostrado proporcionar las siguientes ventajas sorprendentes:

- Monotratamiento (administración de un conjunto de NR2B/A_{2A} solo) en ratas parkinsonianas no farmacotratadas (ratas parkinsonianas que no han recibido ningún tratamiento): Pudo demostrarse que la eficacia sobre los síntomas motores es comparable/esencialmente similar a la conseguida por una dosis totalmente eficaz de L-dopa pero, al contrario que L-dopa, el tratamiento conjunto crónico no producía complicaciones motoras.
- Monotratamiento (administración de un conjunto de NR2B/A_{2A} solo) en ratas cebadas con L-dopa, concretamente ratas discinéticas por tratamiento previo con L-dopa: La capacidad de restaurar completamente la actividad motora en ausencia de movimientos anormales.
- Tratamiento complementario a una dosis no activa de L-dopa: La combinación vuelve eficaz una dosis no activa de L-dopa; esto ocurre en ausencia de movimientos anormales. Tratamiento complementario a una dosis activa de L-dopa: la combinación potencia el efecto de la L-dopa sobre rotaciones contralaterales y reduce el desarrollo de MIA inducidos por L-dopa en el tratamiento crónico (concretamente, efecto cebador anti-L-dopa).

Métodos

Modelos preclínicos de la enfermedad de Parkinson: modelo de rata lesionada por 6-OHDA unilateral

Sujetos: Se usan ratas macho Sprague-Dawley (Janvier, Francia) de 250-275 g de peso en el momento de la cirugía y 400-450 en el momento del ensayo farmacológico.

Tras la llegada del criadero y antes de la experimentación, se habituaron las ratas durante una semana en jaulas de alojamiento (5 ratas por jaula) dentro de la sala de animales. Se mantuvieron en un ciclo de luz oscuridad de 12:12 con luz a partir de las 06:00 y se alojaron a una temperatura mantenida a 20-21 °C y una humedad de aproximadamente el 40 %. Todos los animales tenían libre acceso a alimento en bolitas estándar y agua antes de la asignación a grupos experimentales.

Cirugía para lesiones por 6-OHDA

El día de la cirugía, una semana después de la llegada, las ratas recibieron una inyección unilateral de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial derecho. Se administró a cada rata HCl de imipramina (Sigma) 15 minutos antes de la cirugía para proteger a las neuronas norepinefrinérgicas (NE). Se anestesiaron las ratas con ketamina (Ceva, 75 mg/kg) y xilazina (Bayer, 10 mg/kg) y se pusieron en un marco estereotáxico (David Kopf Instrument). Después de perforar un pequeño orificio en el cráneo por encima del sitio de inyección, se inyectó 6-OHDA en el haz prosencefálico medial ascendente derecho en las siguientes coordenadas (en mm) respecto al bregma y la superficie de la duramadre, AP= -3,5, ML= -1,5, DV= -8,7. Cada rata recibió una inyección de 6-OHDA (4 µg/µl) durante 5 minutos (0,5 µl/min) para un total de 10 µg por rata. Se extrajo la aguja 4 minutos después para evitar el reflujo de toxina. Se pusieron entonces los animales en jaulas limpias bajo fuente de calor y se dejaron recuperar con alimento y agua a voluntad. Se monitorizó y trató cada rata regularmente durante 3 semanas para asegurar una recuperación completa y aclimatación a los experimentadores y al entorno.

Evaluación de la lesión por 6-OHDA

Para seleccionar los animales lesionados exitosamente, se expusieron todas las ratas a una dosis pequeña de apomorfina (Sigma, 0,05 mg/kg, sc) el día 21 después de la cirugía. Se incluyeron en el estudio las ratas que mostraban más de 90 rotaciones contraversivas (360 °) en un periodo de registro de 45 minutos. Se ha demostrado anteriormente que las ratas que satisfacen estos criterios tienen una pérdida unilateral de neuronas dopaminérgicas y un agotamiento unilateral de dopamina del estriado de más de un 95 % (datos internos).

Antagonistas de A_{2A} y NR2B usados

Se disolvieron los compuestos de referencia antagonistas de A_{2A} y NR2B en un volumen de 5 ml de vehículo por kg. Se disolvieron éster metílico de L-dopa (Sigma) y benserazida (Sigma) en disolución salina fisiológica a un volumen de 5 ml/kg. La solución vehículo de compuesto de referencia está compuesta por 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) y 95 % de agua destilada que contiene 1 % de metilcelulosa. Se disuelve 6-OHDA-HBr, para la lesión, en agua destilada con 0,02 % de ascorbato a una concentración de 4 µg de 6-OHDA por µl.

Se usaron los siguientes antagonistas de A_{2A}: SCH-58261, preladenant, tozadenant y KW-6002. Los antagonistas de NR2B usados fueron radiprodilo, Co-101244 y compuesto 1. Los fármacos se administraron generalmente por vía intraperitoneal, excepto por tozadenant que se administró solo por vía oral. En consecuencia, cuando se administraba radiprodilo en combinación con tozadenant, el radiprodilo se administraba, en ese caso, por vía oral.

Aparato de registro conductual

Actividad rotacional (rotaciones ipsilaterales/contralaterales)

Se registró el comportamiento rotacional usando un sistema informatizado casero. Se fijaron las ratas en un arnés, se ligaron a sensores mecánicos que se conectaron directamente con un PC. Se registró automáticamente cada giro horario o antihorario de 360 ° durante hasta 240 minutos como máximo. A lo largo de los experimentos, se asignaron las ratas a jaulas de ensayo individuales. Cada una de las 8 cámaras acrílicas transparentes (50 x 40 cm), puestas a nivel, de fondo de vidrio transparente y mantenidas por un marco robusto, podía subdividirse en 4 jaulas de prueba cuadradas individuales de 25 x 22 cm. Una placa acrílica retirable sirve como tapa. Se colocó una cámara digital portátil (Samsung, SCB-3001 PH) directamente por debajo de cada zona para observar toda la superficie cubierta por las cámaras. Esta disposición permitía la filmación simultánea de una o las cuatro ratas mediante una cámara, para un total de 8 de 32 ratas por sesión. Se proporcionó la iluminación por tubos de neón fijados particularmente en cada brazo del marco. Se registraron las secuencias de vídeo en el disco duro para almacenamiento y se transfirieron posteriormente al PC para análisis y conservación.

Actividad general (distancia y posición erguida)

Se registró la actividad general con movimientos horizontales y verticales de medida de campo abierto amplio y se conectó a PC. Se ensayaron individualmente las ratas en 12 cámaras (LE8811 IR, Panlab), consistente cada una en un recinto cuadrado compuesto por láminas acrílicas transparentes de 0,5 cm sin base (45x45 cm de superficie x 40 cm de altura). Se puso cada recinto sobre una placa cuadrada de acero inoxidable (inox), que servía como suelo. Se ajustó una lámina recubierta de plástico en la placa. Se puso cada aparato en una mesa de laboratorio a una altura de 73,5 cm. Se detectó la locomoción y se midió mediante 16 sensores de rayo de luz infrarroja localizados en cada

lado del recinto a alturas de 3 cm. Se espaciaron los sensores 2,5 cm entre sí y 4,0 cm de cada extremo del lado, de modo que los rayos de luz formaran una matriz de 15x15 cuadrados sobre la superficie. Se registraron las cuentas de actividad por un ordenador personal. Se usó el software Acti-Track (Actitrack^o, Panlab) para convertir los datos brutos generados durante las sesiones de adquisición en parámetros estadísticamente analizables. Los parámetros "distancia recorrida" y "cuentas de posición erguida" se mantuvieron como variables dependientes relevantes.

5 Análisis del perfil conductual en campo abierto

Se registró el perfil conductual específico de ratas lesionadas por 6-OHDA unilateral mediante 8 cámaras conectadas con un sistema de adquisición de vídeo. Se pusieron las ratas bajo tratamiento libremente en un entorno pequeño (rotómetros, 25 x 22 cm) o en campo abierto amplio (50 x 40 cm) y se registró en vídeo el comportamiento durante 55 minutos (total de 3300 s). La posición en entorno pequeño (rotómetros) o amplio (campo abierto) puede depender de la prueba. Se filmaron las ratas desde abajo como se describe en la sección que se refiere a la actividad rotacional.

Después de los registros de datos en vivo, se analizaron posteriormente los vídeos mediante el programa Ethovision (Noldus, versión 9.0). Se definieron el animal y sus movimientos y desplazamientos según tres puntos (nariz, centro y cola). Se configuraron los movimientos, posición del cuerpo y ocupación del espacio según el análisis de filtro definido con criterios y umbrales específicos en el programa. Se analizaron diversos parámetros conductuales y se mantuvieron solo los relevantes, concretamente los no correlacionados, para la descripción conductual final.

Se efectuó el análisis de los movimientos involuntarios anormales ("MIA") con un parámetro específico definido en Ethovision 9.0. El parámetro "alargamiento corporal" se usó para discriminar tanto la intensidad como la frecuencia de la posición discinética (concretamente distónica) de la rata. Para hacer eso, se determinan 3 niveles:

- "contraído" = MIA GRAVES (umbral <30 %), este parámetro hace referencia al tiempo pasado (s) en una posición en la que la rata está sobre sus patas traseras (posición vertical erguida con truncamiento corporal grave) y muestra una posición corporal muy fuertemente distónica. Desde abajo, la forma del cuerpo parece un círculo.
- 25 – "normal" = MIA MODERADOS (umbral, 30 % < normal <50 %); este parámetro hace referencia al tiempo pasado (s) en una posición en la que la rata está sobre tres patas y muestra una posición distónica moderada (posición corporal horizontal con cierto truncamiento corporal).
- "extendida" = SIN MIA (umbral > 50 %), este parámetro hace referencia al tiempo pasado en una posición en la que la rata está más a menudo a cuatro patas (posición horizontal) y muestra cierta estabilidad sin truncamiento del cuerpo.

La decisión para la identificación de los parámetros finales y los umbrales usados para el análisis se basó en una primera observación directa en un análisis definitivo firmemente fijado entonces.

Se realizó el análisis de los demás tipos de comportamiento con parámetros específicos seleccionados en el programa de análisis de vídeo (Ethovision 9.0) para describir lo mejor posible el comportamiento observado visualmente y ser capaz de cuantificarlo. Los parámetros "distancia", "rotaciones antihorarias", "rotaciones horarias" y "extendido" se extrajeron del análisis. Un parámetro adicional, el "radio de giro", se calcula a partir de los datos brutos obtenidos mediante el sistema

- Distancia (= "**distancia**"): la distancia total que se mueve el animal (cm).
- 40 – Antihorario (= "**giros ipsilaterales**"): cuenta del número de giros de 360 ° de rotaciones ipsilaterales en el mismo sentido que el de la lesión.
- Horario (= "**giros contralaterales**"): cuenta del número de giros de 360 ° de rotaciones contralaterales en el sentido opuesto a la lesión.
- Estirado: (= "**posición corporal adecuada**"): tiempo pasado en una posición en la que la rata se alza sobre sus cuatro patas sin posición doblada del tronco. En este programa, este es el parámetro "alargamiento corporal", que se usa para discriminar la intensidad y frecuencia de la posición corporal adecuada. El umbral se fija al 70 %.
- 45 – Radio de giro (= "**trayectoria adecuada**"): para un intervalo de tiempo específico, la distancia media entre la posición del animal y su posición media dentro de este intervalo de tiempo específico. Este parámetro refleja la capacidad de las ratas de usar todo el espacio de la zona y se mide en centímetros.

50 Análisis estadístico

Actividad general (actómetros) y rotaciones (rotómetros): Se efectuó el análisis estadístico de la actividad general (distancia y posición erguida) y de las rotaciones (contralaterales) mediante estadísticas paramétricas.

Se valoró el nivel de medida de actividad general (distancia y posición erguida) en actómetros mediante ANOVA mixto de tres factores con el antagonista de A_{2A} (2 niveles) y el antagonista de NR2B (2 niveles) como factores intergrupales y el tiempo como factor intrasujetos (6 o 24 niveles). Se efectuaron múltiples comparaciones apareadas entre las medias por la prueba post hoc de Tukey.

- 5 Se evaluaron los efectos del tratamiento con A_{2A} y/o NR2B sobre los niveles de rotaciones contralaterales inducidas por L-dopa con ANOVA mixto de dos factores con el tratamiento farmacológico (4 niveles) como factor intergrupar y el tiempo (12 o 18 niveles) como factor intrasujetos. Se efectuaron múltiples comparaciones apareadas entre las medias por la prueba post hoc de LSD.

- 10 Se analizaron los datos de la sesión de adquisición bajo tratamiento con antagonista de A_{2A} y/o NR2B más L-dopa/benserazida mediante medidas ANOVA repetidas de dos factores con la sesión crónica como factor intrasujetos (10 niveles de sesión). Se valoraron las fiabilidades de las diferencias entre medias con contrastes planificados usando el estadístico F. Además, se realizó el análisis post hoc en la variable "tratamiento" separadamente (prueba post hoc de Tukey).

Para cada prueba, se suponía una significación estadística si $P < 0,05$.

- 15 Análisis conductual específico: Se analizaron los 5 comportamientos mantenidos a lo largo del análisis conductual (concretamente, distancia, giros contralaterales, giros ipsilaterales, posición corporal adecuada y trayectoria adecuada) con estadística paramétrica, sin embargo, si la homogeneidad de varianzas no se respetaba para los datos (prueba de Bartlett para varianzas iguales), se analizaron estos últimos con estadística no paramétrica (Kruskal-Wallis). En ambos casos, se efectuó ANOVA de un factor para discriminar el efecto de los diversos tratamientos sobre cada comportamiento independiente. Se determinaron las diferencias significativas entre medias por la prueba post hoc de Tukey o la prueba de comparaciones múltiples de Dunn con $p < 0,05$.

Lista de abreviaturas

ip: intraperitoneal

po: per os, administración oral

- 25 mg/kg: miligramos por kilogramo

s: segundos

cm: centímetros

Rad 3: radiprodilo a la dosis de 3 mg/kg

Toz 30: tozadenant a la dosis de 30 mg/kg

- 30 Conj.: cualquier combinación de antagonista de receptor de A_{2A} y NR2B y específicamente el caso particular tozadenant 30 mg/kg + radiprodilo 3 mg/kg.

CO1: Co-101244 a la dosis de 1 mg/kg

SCH1: SCH-58261 a la dosis de 1 mg/kg

Veh: vehículo

- 35 LD25: L-dopa 25 mg/kg

LD/BZ: L-dopa más benserazida

MIA: movimientos involuntarios anormales

SECCIÓN EXPERIMENTAL

- 40 A. MONOTRATAMIENTO CON ANTAGONISTA DE A_{2A} JUNTO CON ANTAGONISTA DE NR2B EN RATAS HEMIPARKINSONIANAS

Ejemplo 1: Eficacia de la combinación de un antagonista de A_{2A} junto con un antagonista de NR2B sobre la cantidad de actividad en 6 realizaciones diferentes

- 45 Se ensayan 6 coadministraciones diferentes de un antagonista de A_{2A} junto con un antagonista de NR2B (=CONJUNTO) en el modelo de rata lesionada por 6-OHDA unilateral de enfermedad de Parkinson según la **TABLA 1**.

Los parámetros conductuales registrados fueron: "distancia recorrida" y "cuentas de posición erguida". Estas últimas

se miden automáticamente en actómetros. Todas las coadministraciones muestran aumentos significativos del nivel de actividad (distancia y/o cuentas de posición erguida) en comparación con el tratamiento realizado con los compuestos solos.

Tabla 1

		ANTAGONISTA DE NR2B		
		Co-101244	Compuesto 1	Radiprodilo
ANTAGONISTA DE A _{2A}	KW-6002	+		
	SCH-58261	+	+	
	Preladenant		+	+
	Tozadenant			+
+: La combinación de A _{2A} /NR2B ensayada y la actividad por distancia y/o posición erguida es superior al ensayo de los compuestos solos				

5

En cada combinación (conjunto), el valor añadido de tal tratamiento sobre el comportamiento de la rata hemiparkinsoniana era notable e inesperado. Todos los conjuntos (con una selección de dosis adecuada) eran capaces de restaurar la función motora aumentando el nivel de actividad en comparación con ratas tratadas con vehículo y con ratas tratadas con el compuesto solo. Además, este comportamiento estimulado no estaba asociado con el sesgo conductual asimétrico típico y con la posición corporal anormal (concretamente, posición corporal distónica) que se observa con las terapias de EP dopaminérgicas actuales (concretamente, agonistas de DA o L-dopa). Este efecto específico sobre el comportamiento se observó visualmente durante el ensayo en actómetros.

10

Ejemplo 2: Demostración de la eficacia de la combinación sobre la calidad de la actividad motora estimulada con un ejemplo específico (tozadenant y radiprodilo).

15

La coadministración de un antagonista de NR2B y un antagonista de A_{2A} ha mostrado para 6 diferentes conjuntos un inesperado aumento del nivel de actividad (distancia recorrida y cuentas en posición erguida). Este perfil conductual inesperado (concretamente, aumento de la actividad motora con excelente posición corporal) que se observó visualmente mientras los animales se ponían en las cámaras de actividad (actómetros) se describe, con detalle, en el ejemplo posterior y se ilustra por la medida cuantitativa de diversos parámetros conductuales.

20

Se comparan los efectos de la coadministración oral de radiprodilo (3 mg/kg, po) con tozadenant (30 mg/kg, po) sobre el comportamiento de la rata con el ensayo de:

- 1) estos compuestos separadamente
- 2) una dosis parcialmente activa de L-dopa (25 mg/kg, ip)
- 3) una dosis totalmente activa de L-dopa/benserazida (16/4 mg/kg, ip).

25

Se analizó el perfil conductual con detalle con un sistema de análisis conductual automatizado basado en registros de vídeo (véase la sección de métodos para la descripción). Además, se usan también medidas clásicas (rotómetros y actómetros) del comportamiento para valorar la cantidad de movimientos.

Análisis de la cantidad de movimientos: duración del efecto estimulado

30

Cuando se ensayaba en un aparato automatizado, el conjunto mostraba un efecto de larga duración, mientras que una dosis activa de L-dopa/benserazida duraba aproximadamente 3 horas y una dosis parcialmente activa duraba aproximadamente 1 hora (eficacia de acción muy corta). En el experimento con el conjunto, se pusieron las ratas en la zona de ensayo 60 minutos después de la administración oral de los compuestos (concretamente, tozadenant y/o radiprodilo), mientras que las ratas que recibieron L-dopa 25 mg/kg se pusieron en los rotómetros 10 min después de la administración de L-dopa (ip) y las ratas con tratamiento con L-dopa/benserazida, 15 min después de la administración intraperitoneal.

35

Los datos en la Figura 2 (concretamente la comparación de los grupos de vehículo, L-dopa 25 y L-dopa/benserazida) provienen de experimentos diferentes y se agruparon juntos para análisis posterior.

Figura 1:

Gráfica derecha: ANOVA mixto de tres factores. Efecto significativo de radiprodilo (3 mg/kg), F(1,28)= 51,45, p< 0,001. Efecto significativo de tozadenant (30 mg/kg), F(1,28)= 176,0, p< 0,001. Efecto significativo del tiempo,

40

$F(23,644)= 42,28$, $p < 0,001$. Interacción significativa de "radipropilo x tozadenant", $F(1,28)= 14,81$, $p < 0,01$.

Prueba post hoc de Tukey ($p < 0,05$): las ratas tratadas con la combinación TOZ 30/RAD 3 tienen mayor puntuación de distancia que aquellas de los grupos VEH/VEH, TOZ 30/VEH y VEH/RAD 3. Gráfica izquierda: ANOVA mixto de tres factores. Efecto significativo de radiprodilo (3 mg/kg), $F(1,28)= 9,40$, $p < 0,01$. Efecto significativo de tozadenant (30 mg/kg), $F(1,28)= 64,60$, $p < 0,001$. Efecto significativo del tiempo, $F(23,644)= 16,67$, $p < 0,001$. Interacción significativa de "radiprodilo x tozadenant", $F(1,28)= 4,60$, $p < 0,05$.

Prueba post hoc de Tukey ($p < 0,05$): las ratas tratadas con la combinación TOZ 30/RAD 3 tienen una mayor puntuación de posición erguida que aquellas de los grupos VEH/VEH, TOZ 30/VEH y VEH/RAD 3.

Figura 2:

El efecto del tratamiento muestra un efecto significativo $F(2,21)= 43,68$, $p < 0,001$. Se observa también un efecto significativo del tiempo $F(17,357)= 20,05$, $p < 0,001$ y una interacción significativa también $F(34,357)= 11,74$, $p < 0,001$. La prueba de comparaciones post hoc adicionales muestra que es solo el efecto con L-dopa/benserazida el que es significativamente activo en comparación con ratas tratadas con vehículo (Tukey, $p < 0,05$).

Análisis de la calidad de movimientos: cuantificación y cualificación detalladas de diversos tipos de comportamientos

El análisis conductual a fondo mostró que el conjunto tenía un efecto inesperado sobre el comportamiento de las ratas hemiparkinsonianas: la combinación de radiprodilo y tozadenant (concretamente, "conjunto") restaura una cantidad de movimiento comparable a la observada con una dosis activa de L-dopa/benserazida (que no es el caso con el compuesto ensayado separadamente). Además, este conjunto ofrece también una fuerte mejora de la calidad del comportamiento. La dirección, la trayectoria y la posición corporal mejoran notablemente y corresponden a comportamientos observados en ratas no lesionadas.

Típicamente, las ratas tratadas con L-dopa muestran (1) rotaciones contralaterales estereotípicas (total incapacidad de cambiar de dirección contralateral a ipsilateral), (2) una posición corporal doblada y (3) una trayectoria (radio de giro) del desplazamiento que es muy corta, puesto que solo hacen rotaciones contralaterales estrechas mientras están estimuladas.

En contraposición, las ratas tratadas con conjunto muestran (1) la capacidad de cambiar de dirección contralateral a ipsilateral, (2) posición corporal no doblada (posición corporal adecuada si se hace referencia a la posición de una rata no lesionada que está sobre sus cuatro patas sin ninguna distorsión del tronco) y (3) una trayectoria que es mayor puesto que se mueven derechas y no exhiben rotaciones contralaterales estereotípicas estrechas como aquellas observadas típicamente bajo L-dopa.

TABLA 2: Dividida en tres categorías conductuales (1) cantidad de movimientos, (2) capacidad de cambiar la dirección, (3) trayectoria y posición corporal, compara los efectos de radiprodilo y tozadenant solos, el conjunto compuesto por "tozadenant + radiprodilo" y una dosis parcialmente activa de L-dopa (25 mg/kg) y una dosis significativamente activa de L-dopa/benserazida (16/4 mg/kg). Los resultados representan el porcentaje de cambio en comparación con ratas hemiparkinsonianas tratadas con vehículo; siendo el objetivo medir el índice de recuperación. Esos datos se expresan para dos puntos temporales diferentes de la prueba.

Esta tabla muestra que la cantidad de movimientos (distancia) de las ratas tratadas con conjunto es altamente superior a la observada con las ratas tratadas con vehículo y este efecto es comparable con el producido por ratas tratadas con L-dopa/benserazida. En contraposición, el porcentaje de "posición corporal adecuada" y "trayectoria adecuada" aumentan en gran medida con el conjunto en comparación con el ensayo del grupo tratado con los compuestos solos, el vehículo y L-dopa/benserazida. El grupo de L-dopa/benserazida muestra también un fuerte sesgo hacia el lado contralateral en comparación con las ratas tratadas con vehículo. Dicho sesgo no se observa con el conjunto o con los compuestos solos.

Tabla 2

	TIEMPO	Radiprotilo	Tozadenant	Conjunto	LD25	LD/BZ
Cantidad de movimientos						
<i>Distancia</i>	0-20'	++	+	+++	++	+++
	30-50'	+	++	++++	+++	++++
Capacidad de cambiar de dirección						
<i>Giros contralaterales</i>	0-20'	+	+	++	+++	++++
	30-50'	+	++	++++	+++	++++
<i>Giros ipsilaterales</i>	0-20'	+	+	++	++	
	30-50'	+	++	+++	++	
Posición corporal y trayectoria						
<i>Posición corporal adecuada</i>	0-20'	++	+	++	+	
	30-50'	++	++	+++	++	
<i>Trayectoria adecuada</i>	0-20'	++	+++	++++	+++	+++
	30-50'	++	+++	++++	+++	+++

	Expresado como % de ratas tratadas con veh.	<200 %	-
		200-300 %	+
5		300-500 %	++
		>500 %	+++
		>1000 %	++++

La **Figura 3** muestra la capacidad del conjunto de producir cantidades de movimientos (distancia) equivalentes a las observadas con ratas tratadas con L-dopa/benserazida durante los primeros 20 minutos y los últimos 20 minutos de la prueba.

La **Figura 4** muestra la capacidad del conjunto de inducir giros tanto ipsilaterales como contralaterales (movimientos), mientras que las ratas tratadas con L-dopa/benserazida muestran solo la capacidad de ir hacia el lado contralateral. Esta observación demostraba claramente (1) la capacidad de las ratas con conjunto de poder cambiar de una dirección a la otra mientras están estimuladas y (2) la ausencia de actividad rotacional contralateral principal de las ratas tratadas con conjunto cuando estas están estimuladas.

La **Figura 5** demuestra la mejora tanto de la trayectoria como de la posición corporal en ratas tratadas con conjunto en comparación con ratas tratadas con L-dopa/benserazida. Es más, la trayectoria medida mediante el radio de giro es mayor en ratas tratadas con conjunto durante los dos periodos de tiempo de los registros que la observada con los demás grupos. Esta observación refleja cuantitativamente que, mientras están estimuladas, las ratas tratadas con el conjunto tienen trayectorias mayores en la zona de ensayo que las ratas tratadas con L-dopa/benserazida, que ejecutan movimientos muy estrechos durante sus rotaciones contralaterales. La posición corporal de las ratas con conjunto muestra que, incluso si esas ratas están estimuladas con el tratamiento, pueden estar sobre sus cuatro patas y no tener una posición doblada.

Estas observaciones y descripción inesperadas demuestran que, con el tratamiento de combinación, es posible conseguir un nivel equivalente de estimulación sin las complicaciones motoras anormales que se asocian típicamente a la terapia dopaminérgica en ratas lesionadas con 6-OHDA unilateral.

Ejemplo 3: Eficacia de la administración combinada de "tozadenant + radiprotilo" sobre síntomas motores sin el desarrollo de ningún movimiento anormal después de tratamiento crónico.

El tratamiento crónico durante 10 días con el conjunto no conduce al desarrollo de ninguna complicación motora anormal como se observa con L-dopa. Las ratas continúan activas aunque desarrollan cierto proceso de habituación

a la zona de ensayo. A pesar de este fenómeno normal, se sigue observando el efecto significativo del conjunto sobre el nivel de actividad y sobre la calidad del movimiento.

Ejemplo 4: Eficacia del conjunto sobre los síntomas motores en ratas hemiparkinsonianas que se han vuelto previamente totalmente discinéticas mediante tratamiento crónico anterior con L-dopa.

- 5 La administración combinada de "tozadenant + radiprodilo" tiene la capacidad de restaurar la actividad motora aumentada en ratas hemiparkinsonianas. Sin embargo, esta coadministración específica tiene también un efecto totalmente inesperado, puesto que restaura la actividad motora sin movimientos involuntarios anormales en ratas hemiparkinsonianas cebadas con L-dopa que se volvieron totalmente discinéticas con tratamiento crónico con L-dopa.
- 10 Las ratas hemiparkinsonianas tratadas durante 10 sesiones de adquisición con L-dopa 14 mg/kg y benserazida 3,5 mg/kg desarrollan un nivel aumentado tanto de rotaciones contralaterales como de movimientos involuntarios anormales (MIA) (concretamente, sensibilización conductual). Como consecuencia de ese tratamiento crónico con L-dopa/benserazida, muestran un muy alto nivel de rotaciones contralaterales y MIA al final de este tratamiento crónico cuando se prueban en campo abierto. Cuando estas ratas hemiparkinsonianas altamente discinéticas dejaron la L-
- 15 dopa y se trataron con el conjunto algunos días más tarde (p.ej., después de 3 días), se observa la restauración completa de la actividad motora adecuada sin movimientos involuntarios anormales o sin aumento del nivel de rotaciones contralaterales. Este resultado de ausencia de sensibilización cruzada sobre el nivel de rotaciones contralaterales y MIA era completamente inesperado.

La **Tabla 3** muestra, para 7 comportamientos, el porcentaje de cambio expresado por las ratas cuando se tratan con vehículo, radiprodilo 3 mg/kg, tozadenant 30 mg/kg o el conjunto en comparación con los respectivos comportamientos exhibidos por las mismas ratas, pero cuando se trataron estas últimas con una dosis activa de L-dopa/benserazida algunos días antes.

La **Tabla 3** muestra, para ratas tratadas con conjunto:

- 25 (1) un nivel comparable de distancia recorrida a las tratadas con L-dopa/benserazida, mientras que las ratas tratadas con los compuestos solos mostraban un nivel disminuido de actividad;
- (2) una reducción de las rotaciones contralaterales inducidas por L-dopa y un aumento de las rotaciones ipsilaterales en comparación con ratas tratadas con L-dopa/benserazida;
- (3) un aumento del tiempo pasado en la posición corporal adecuada y una trayectoria mejorada en comparación con las ratas tratadas con L-dopa/benserazida;
- 30 (4) ningún tiempo pasado exhibiendo movimientos involuntarios anormales (MIA) en comparación con las ratas tratadas con L-dopa/benserazida.

Las **Figuras 6 y 7** muestran que las ratas tratadas con L-dopa/benserazida durante 10 sesiones de adquisición exhiben un fuerte aumento del nivel de giros contralaterales (que se espera con L-dopa/benserazida) y ningún giro ipsilateral, mientras que con conjunto esas ratas expresan solo un menor nivel de giros contralaterales y cierto nivel

35 de giros ipsilaterales. Esta última observación demuestra que las ratas estimuladas con conjunto son capaces de cambiar de una dirección a la otra. En paralelo al fuerte aumento de rotaciones contralaterales, las ratas con L-dopa tienen un fuerte aumento del tiempo pasado en MIA graves, mientras que con el conjunto, la mayoría del tiempo pasado por esas ratas está en posición "sin MIA" (**Figura 8**). El tratamiento con L-dopa/benserazida estimula en gran medida a las ratas. Observación que se refleja mediante el alto nivel de distancia recorrida medida en esas ratas.

40 Sin embargo, las ratas con conjunto muestran un nivel de distancia recorrida equivalente a la medida con L-dopa/benserazida (**Figura 9**). Esto mostraba que el efecto del conjunto, incluso si no induce ninguna rotación contralateral misma, sigue teniendo la capacidad de estimular los animales. De forma muy interesante, las ratas estimuladas con el conjunto pasaban más tiempo en "posición corporal adecuada" en comparación con cuando se tratan con L-dopa/benserazida (**Figura 10**). Las ratas tratadas con conjunto muestran también una ocupación del

45 espacio y trayectoria mucho mejores en comparación con el tratamiento con L-dopa/benserazida, puesto que el radio de giro de su movimiento aumenta en comparación con cuando se trataban con L-dopa/benserazida (**Figura 11**).

Tabla 3

	Vehículo	Radiprotilo 3 mg/kg	Tozadenant 30 mg/kg	Conjunto (Toz 30 + Rad 3)
Cantidad de movimientos				
Distancia	12 % ↓	69 % ↓	56 % ↓	105 % ↔
Capacidad de cambiar de dirección				
Giros contralaterales	1 % ↓	16 % ↓	11 % ↓	15 % ↓
Giros ipsilaterales	33 % ↓	91 % ↔	130 % ↔	283 % ↑
Posición corporal y trayectoria				
Posición corporal adecuada	1480 % ↑	5236 % ↑	4151 % ↑	5391 % ↑
Trayectoria adecuada	8 % ↓	140 % ↑	114 % ↔	231 % ↑
Movimientos involuntarios anormales				
MIA graves	10 % ↓	7 % ↓	12 % ↓	16 % ↓
Sin MIA	984 % ↑	1035 % ↑	948 % ↑	1029 % ↑
↑ aumento del comportamiento en comparación con tratadas con LD/BZ				
↓ disminución del comportamiento en comparación con tratadas con LD/BZ				
↔ sin cambio conductual en comparación con tratadas con LD/BZ				

B. TRATAMIENTO COMPLEMENTARIO CON UN ANTAGONISTA DE A_{2A} JUNTO CON UN ANTAGONISTA DE NR2B EN RATAS HEMIPARKINSONIANAS

5 Ejemplo 5: OBSERVACIÓN CONDUCTUAL CUANDO SE PROCURA EN TRATAMIENTO COMPLEMENTARIO AGUDO A UNA DOSIS SUBACTIVA O PARCIALMENTE ACTIVA DE L-dopa

La administración combinada de un antagonista de NR2B a un antagonista de A_{2A} potencia la eficacia de una subdosis o dosis parcialmente activa de L-dopa en comparación con los compuestos ensayados separadamente.

CO-101244 + SCH-58261 + DOSIS SUBACTIVA DE L-dopa

10 La coadministración de 1 mg/kg de Co-101244 a 1 mg/kg de SCH-58261 procurado como tratamiento complementario a una dosis activa subactiva de L-dopa (15 mg/kg) aumenta significativamente el nivel de rotaciones contralaterales en comparación con ratas tratadas con vehículo y con ratas tratadas con los compuestos solos, tratándose todos los grupos con L-dopa 15 mg/kg.

15 **Figura 12:** El ANOVA de dos factores muestra el efecto significativo del tratamiento (F_{3,28})= 5,62, p< 0,01, el efecto significativo del tiempo (11,308)= 22,21, p< 0,001 y la interacción significativa de tratamiento x tiempo (F_{33,308})= 4,71, p< 0,001 *, p< 0,05: SCH1/CO1 es significativamente diferente de los grupos VEH/VEH, SCH1/VEH y VEH/CO1 (prueba post hoc de LSD).

TOZADENANT + RADIPRODILO + DOSIS PARCIALMENTE ACTIVA DE L-dopa

20 La administración combinada de 3 mg/kg de radiprotilo a 30 mg/kg de tozadenant procurado como tratamiento complementario a una dosis parcialmente activa de L-dopa (25 mg/kg) aumenta significativamente el nivel de rotaciones contralaterales en comparación con ratas tratadas con vehículo y ratas tratadas con los compuestos solos además de L-Dopa 25 mg/kg.

25 **Figura 13:** Efecto significativo del tratamiento (F_{3,28})= 70,60, p< 0,01, efecto significativo del tiempo (17,746)= 200,89, p< 0,001 e interacción significativa de tratamiento x tiempo (F_{17,476})= 2,83, p< 0,001. #, p< 0,05: El grupo RAD3/TOZ30 es significativamente diferente de los grupos VEH/VEH, VEH/TOZ30 y RAD3/VEH (prueba post hoc test de LSD).

Ejemplo 6: OBSERVACIÓN CONDUCTUAL CUANDO SE PROCURA EN TRATAMIENTO COMPLEMENTARIO CRÓNICO A UNA DOSIS ACTIVA DE L-dopa Y BENSERAZIDA

Como observación inesperada, los datos mostraban que el conjunto tiene el potencial de aumentar el efecto con el tiempo de la L-dopa con la reducción de algunas discapacidades motoras.

- 5 La administración crónica combinada de "tozadenant + radiprodilo" procurada en terapia complementaria a una dosis activa de L-dopa/benserazida aumenta significativamente el efecto de la L-dopa sobre las rotaciones contralaterales en comparación con ratas tratadas con vehículo y con ratas tratadas con los compuestos individuales. Además de ese efecto aumentando, el ensayo en campo abierto mayor mostraba que el nivel de MIA graves se reduce cuando las ratas se tratan con el conjunto y radiprodilo en comparación con las ratas tratadas con tozadenant.

10 TOZADENANT + RADIPRODILO + DOSIS ACTIVA DE L-dopa/BENSERAZIDA

Figura 14: Diseño experimental para la combinación de administración de tozadenant + radiprodilo con una dosis activa de L-dopa/benserazida

Tabla 4: Tratamientos administrados para las 10 sesiones de adquisición en rotómetros pequeños

Grupos	Tratamiento 1	Tratamiento 2	L-dopa/benserazida
1	Vehículo	Vehículo	L-Dopa 14 mg/kg / BZ 3,5 mg/kg
2	Rad 3 mg/kg	Vehículo	L-Dopa 14 mg/kg / BZ 3,5 mg/kg
3	Vehículo	Toz 30 mg/kg	L-Dopa 14 mg/kg / BZ 3,5 mg/kg
4	Rad 3 mg/kg	Toz 30 mg/kg	L-Dopa 14 mg/kg / BZ 3.5 mg/kg

- 15 Diez sesiones de adquisición (una vez al día) de L-dopa (14 mg/kg)/benserazida (3,5 mg/kg) procurado en coadministración con veh, tozadenant, radiprodilo o la combinación de ambos compuestos aumenta progresivamente el nivel de rotaciones contralaterales inducidas por L-dopa cuando se miden en rotómetros (**Figura 15**), siendo el efecto más pronunciado con las ratas tratadas con conjunto.

- 20 La **Figura 16** muestra que el perfil conductual de ratas tratadas con veh, radiprodilo, tozadenant o el conjunto y L-dopa/benserazida, pero ensayadas en campo abierto mayor. El análisis conductual automatizado distintivo basado en registros de vídeo muestra que las ratas tratadas con el conjunto además de L-dopa/benserazida tienen un mayor nivel de estimulación (concretamente, medido por un aumento significativo del nivel de distancia y rotaciones contralaterales). Sin embargo, aquellas ratas tratadas con conjunto y LD/BZ mostraban también menos tiempo pasado en expresar MIA graves que el grupo tratado con tozadenant.

- 25 **Figura 15:** La ANOVA mixta de dos factores muestra el efecto significativo del tratamiento $F(3,28)= 15,06$; $p < 0,001$ y el efecto significativo de la sesión de adquisición, $F(9,252)= 29,23$, $p < 0,001$, pero no de la interacción de tratamiento x tiempo ($p = 0,18$). La prueba post hoc adicional mostraba que el grupo de conjunto tiene un nivel significativamente mayor de actividad en comparación con los grupos tratados con veh, toz y rad (Tukey, $p < 0,05$).

En resumen, se identificaron las siguientes acciones conjuntas sorprendentes:

- 30 1) 6 combinaciones diferentes (conjuntos) elaboradas combinando diversos antagonistas de A_{2A} y NR2B muestran aumentos significativos del nivel de actividad (distancia recorrida y posición erguida) en ratas lesionadas con 6-OHDA unilateral en comparación con ratas tratadas con vehículo y con ratas tratadas con antagonista de A_{2A} o antagonista de NR2B solo.

- 35 2) El análisis conductual a fondo, efectuado en una combinación de antagonista de A_{2A} /NR2B específica (tozadenant + radiprodilo), muestra que aparte del aumento significativo del nivel de actividad, que es comparable al observado con una dosis activa de L-dopa/benserazida, el comportamiento de las ratas con conjunto mejora significativamente en comparación con el observado con tratamiento con L-dopa (sin rotación contralateral estrecha estereotípica ni posición corporal distónica).

- 40 3) El tratamiento crónico con la combinación de antagonista de A_{2A} y NR2B no conduce al desarrollo de ninguna complicación motora anormal.

- 4) Ausencia de efecto de sensibilización cruzada entre L-dopa y el conjunto: el tratamiento agudo con la combinación de A_{2A} /NR2B en ratas tratadas crónicamente con L-dopa que se han vuelto discinéticas por el tratamiento con L-dopa muestra la capacidad de restaurar una actividad motora de alta calidad sin movimientos involuntarios anormales.

5) El tratamiento agudo con la combinación de antagonistas de A_{2A} y NR2B muestra un aumento significativo de las rotaciones contralaterales inducidas por L-dopa cuando se procura en coadministración con una dosis subactiva o parcialmente activa de L-dopa, en comparación con ratas tratadas con vehículo o ratas tratadas con el antagonista de A_{2A} o NR2B solo y más la dosis de L-dopa equivalente a la recibida pero con el grupo de conjunto.

6) El tratamiento crónico con antagonistas de A_{2A} y NR2B procurados en coadministración con una dosis activa de L-dopa/benserazida (dosis responsable del desarrollo de movimientos anormales inducidos por L-dopa, MIA) muestra una potenciación del efecto de L-dopa sobre el nivel de rotaciones contralaterales y, al mismo tiempo, una reducción de la gravedad de los MIA en comparación con ratas tratadas con el antagonista de A_{2A}.

Referencias

- 10 • Schwarting RK, Huston JP (1996) "The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioural brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments". *Prog Neurobiol* 50: 275-331.
- Ungerstedt U (1971) "Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system". *Acta Physiol Scand Suppl* 367: 69-93.
- 15 • Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) "Quantitative recording of rotational behaviour in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system". *Brain Res* 24: 485-493.
- Loftis JM, Janowsky A (2003) "The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation and clinical implications". *Pharmacol. Ther.* 97: 55-85.
- 20 • Warraich ST, Allbutt HN, Biling R, Radford J, Coster MJ, Kassiou M, Henderson JM (2009) "Evaluation of behavioural effects of a selective NMDA NR1A/2B receptor antagonist in the unilateral 6-OHDA lesion rat model". *Bull Res Bull.* 78 (2-3): 85-90.
- Hallett PJ, Standaert DG (2004) "Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease". *Pharmacol. Ther.* 102: 155-174.
- 25 • Nash JE, Fox SH, Henry B, Hill MP, Peggs D, McGuire S, Maneuf Y, Hille C, Brotchie JM, Crossman AR (2000) "Antiparkinson actions of Ifenprodil in the MPTP-lesioned marmoset model of Parkinson's disease". *Experiment Neurol.* 165: 136-142.
- Xu K, Bastia E, Schwarzschild M (2005) "Therapeutic potential of adenosine A_{2A} receptor antagonists in Parkinson's disease". *Pharmacol Ther* 105: 267-310.
- Jenner P, (2003) "A_{2A} antagonists as novel non dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD". *Neurol.* 9; 61 (11 Supl. 6): S32-8.
- 30 • Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferre S (2007) "Adenosine A_{2A} receptors and basal ganglia physiology.
- Bibbiani, F. y col. "Combined blockade of AMPA and NMDA glutamate receptors reduces levodopa-induced motor complications in animal models of PD". *Exp. Neurol.* 196, 422-429 (2005).
- 35 • Blanchet, P. J., Konitsiotis, S. y Chase, T. N. "Amantadine reduces levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys". *Mov. Disord.* 13, 798-802 (1998).
- Chase, T. N., Oh, J. D. y Konitsiotis, S. "Antiparkinsonian and antidyskinetic activity of drugs targeting central glutamatergic mechanisms". *J. Neurol.* 247 (Supl. 2), II36-II42 (2000).
- 40 • Delfino MA, Stefano AV, Ferrario JE, Taravini IR, Murer MG, Gershanik OS. "Behavioural sensitization to different dopamine agonists in a parkinsonian rodent model of drug-induced dyskinesias". *Behav Brain Res.* 9 de julio de 2004; 152(2): 297-30
- Mizuno Y, Hasegawa K, Kondo T, Kuno S, Yamamoto M; "Japanese Istradefylline Study Group. Clinical efficacy of istradefylline (KW-6002) in Parkinson's disease: a randomized, controlled study". *Mov Disord.* 30 de julio de 2010; 25(10): 1437-43
- 45 • Morelli M, Di Chiara G. "Agonist-induced homologous and heterologous sensitization to D-1- and D-2-dependent contraversive turning". *Eur J Pharmacol.* 2 de septiembre de 1987; 141(1): 101-7.
- Nutt JG, Gunzler SA, Kirchoff T, Hogarth P, Weaver JL, Krams M, Jamerson B, Menniti FS, Landen JW. "Effects of a NR2B selective NMDA glutamate antagonist, CP-101,606, on dyskinesia and Parkinsonism". *Mov Disord.* 15 de octubre de 2008; 23(13): 1860-6.
- Yu L, Schwarzschild MA, Chen JF. "Cross-sensitization between caffeine- and L-dopa-induced behaviours in

hemiparkinsonian mice". *Neurosci Lett.* 23 de enero de 2006; 393(1): 31-5.

- Hauber W, Mönkle M. "The adenosine receptor antagonist theophylline induces a monoamine-dependent increase of the anticataleptic effects of NMDA receptor antagonists". *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* julio de 1996; 354(2): 179-86
- 5
- Hauber W, Mönkle M. "Motor depressant effects mediated by dopamine D2 and adenosine A2A receptors in the nucleus accumbens and the caudate-putamen". *Eur J Pharmacol.* 4 de abril de 1997; 323(2-3): 127-31.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP) en un mamífero, que comprende un primer agente farmacéutico y un segundo agente farmacéutico, en la que el primer agente farmacéutico es el antagonista de receptor de adenosina 2 (A_{2A}) tozadenant y el segundo agente farmacéutico es el antagonista de receptor de D-aspartato de N-metilo (NMDA) de subtipo NR2B radiprodilo.
2. La composición según la reivindicación 1, en la que la relación de antagonista de A_{2A} a antagonista de NR2B varía entre 30:1 y 1:30.
3. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que ambos agentes farmacéuticos se administran junto con L-dopa.
- 10 4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se administra una vez al día.
5. Una composición farmacéutica como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores en forma de un kit de piezas que comprende
 - (a) un primer recipiente que contiene una formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de tozadenant y
 - 15 (b) un segundo recipiente que contiene una formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de radiprodilo.

Figura 1

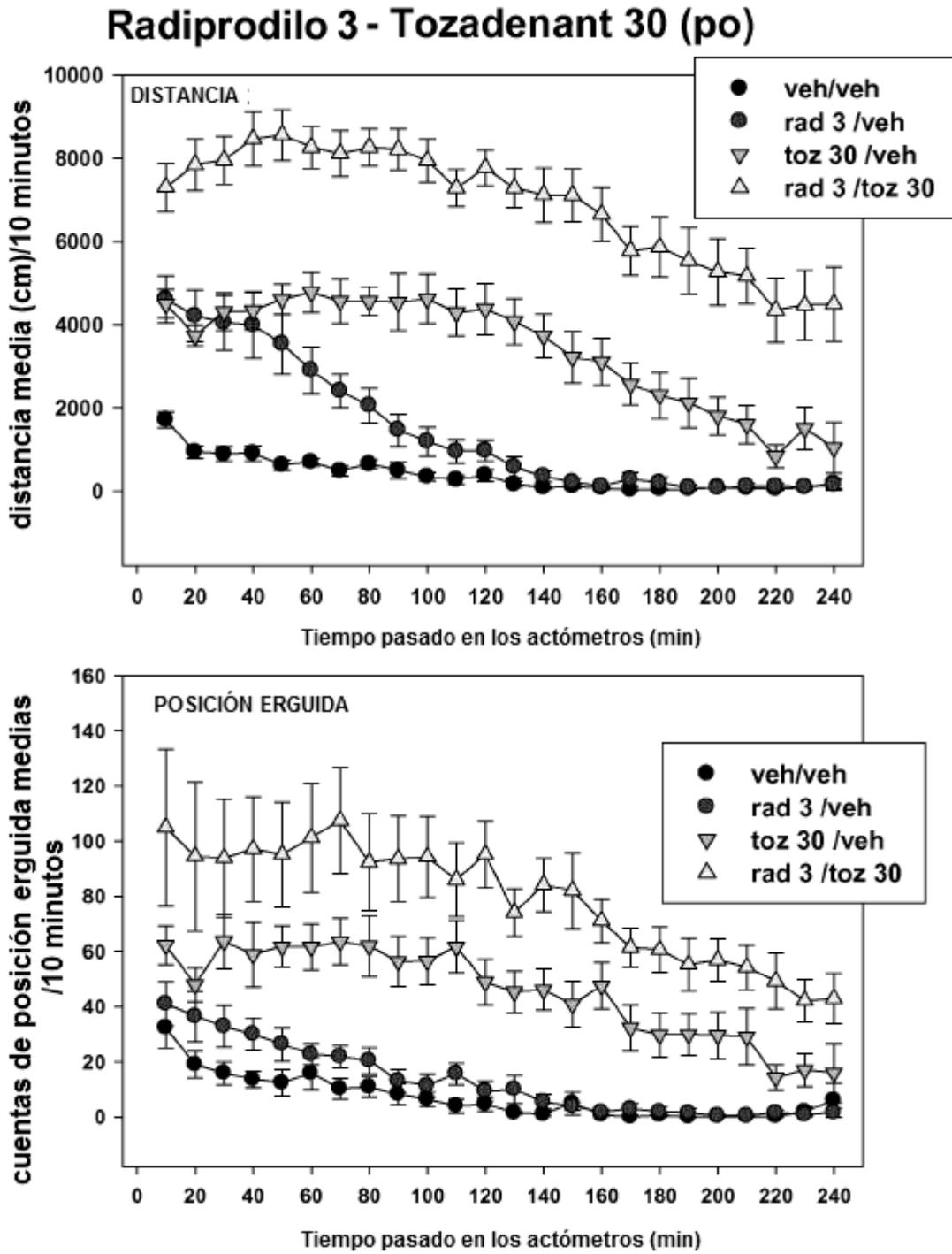


Figura 2

Efecto de una dosis parcialmente activa y activa de L-dopa sobre rotaciones contralaterales

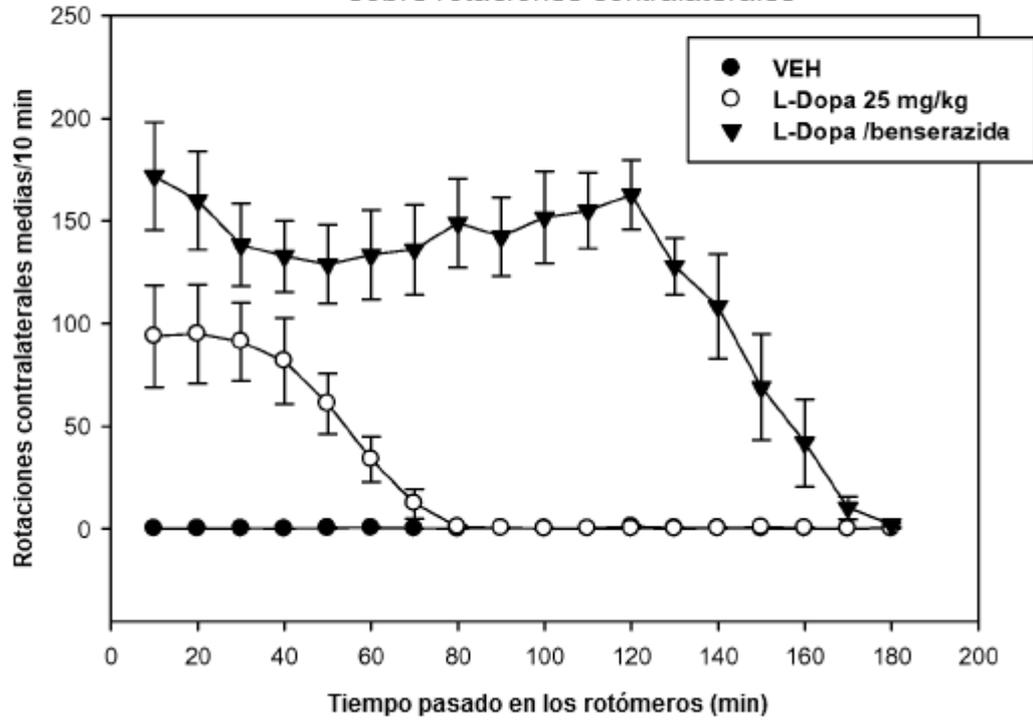
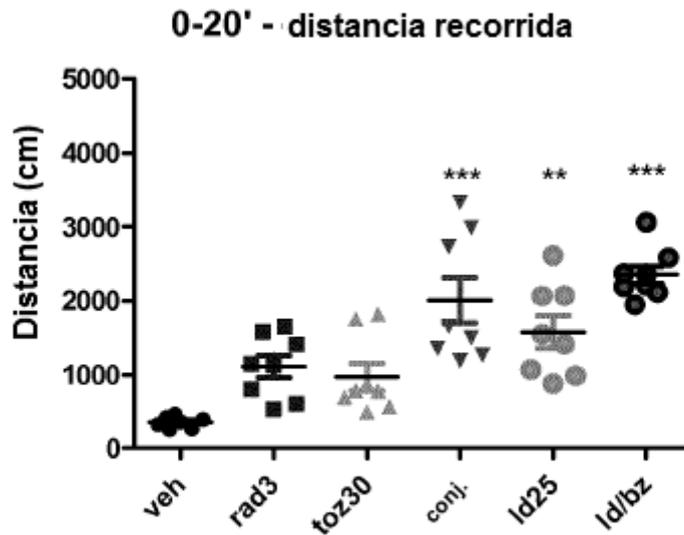
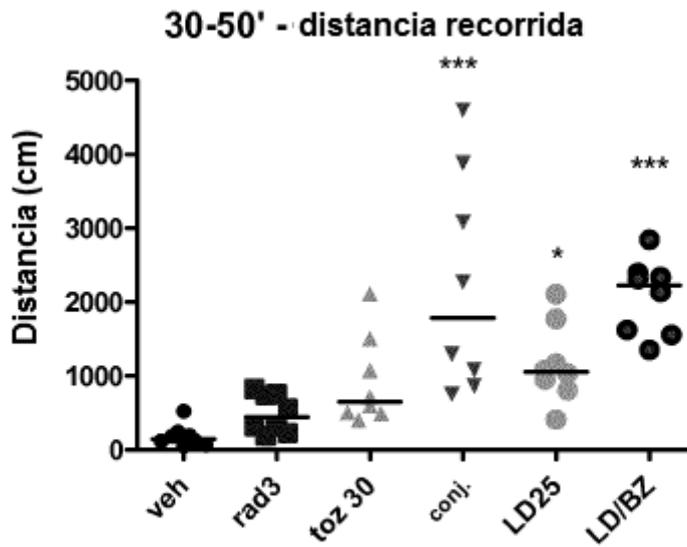


Figura 3



** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$: significativamente diferente del grupo tratado con vehículo (prueba de comparaciones múltiples de Dunn)



* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$: significativamente diferente del grupo tratado con VEH (prueba de comparaciones múltiples de Dunn)

Figura 4

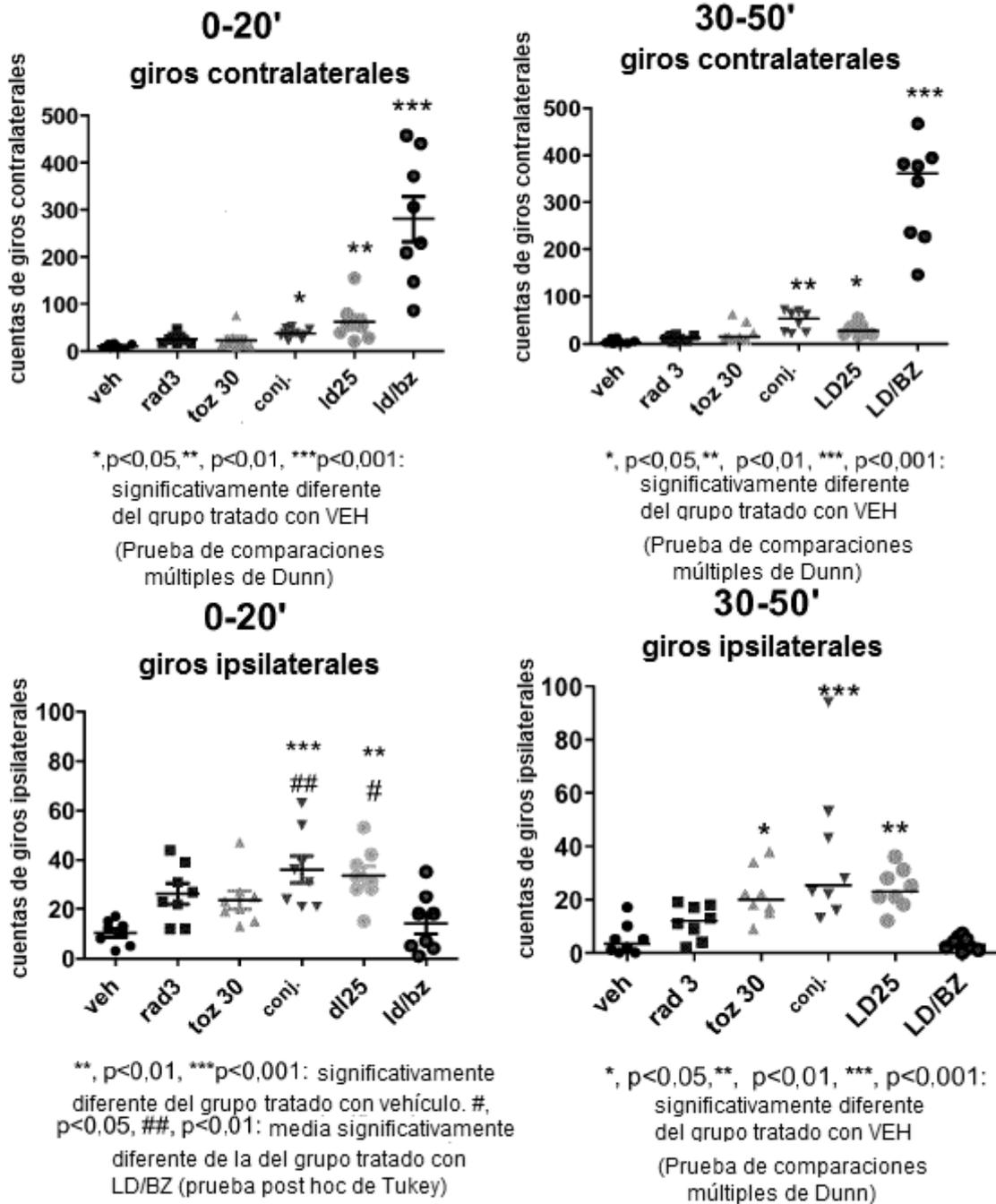


Figura 5

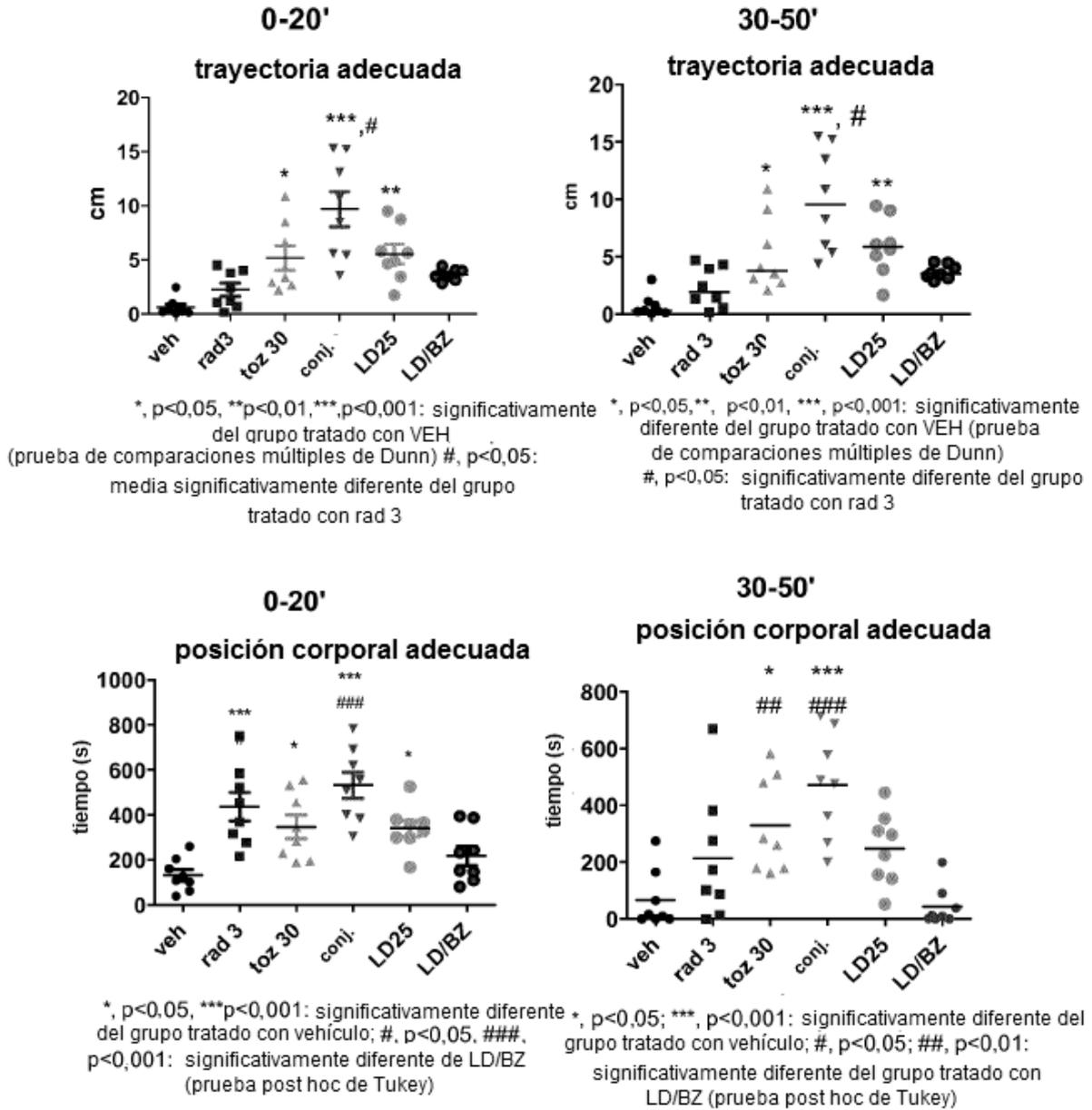


Figura 6

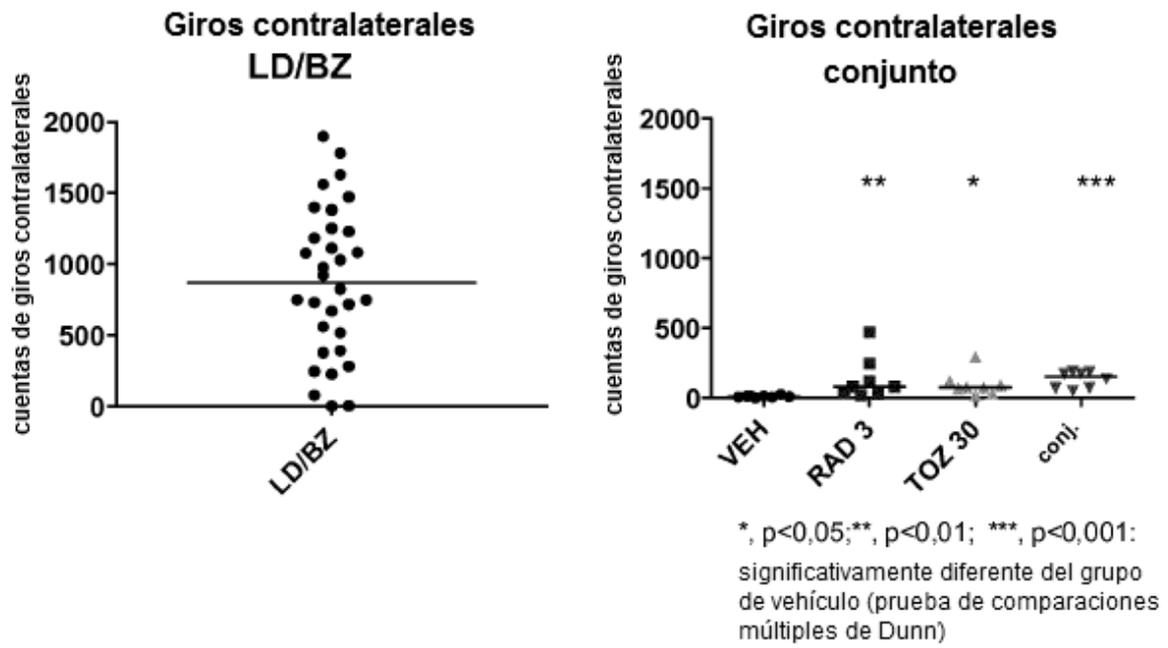


Figura 7

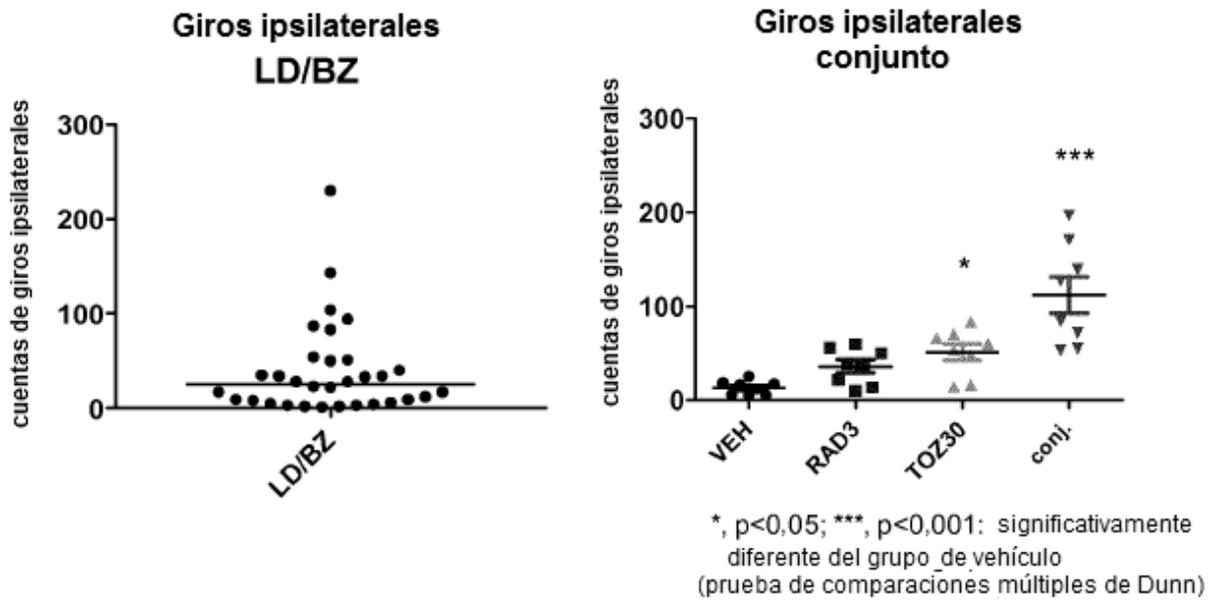


Figura 8

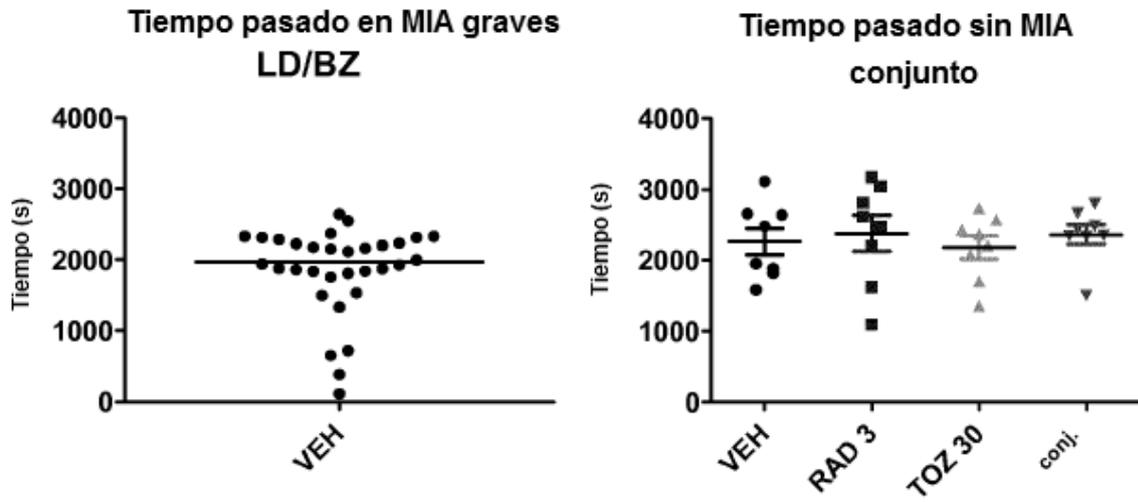


Figura 9

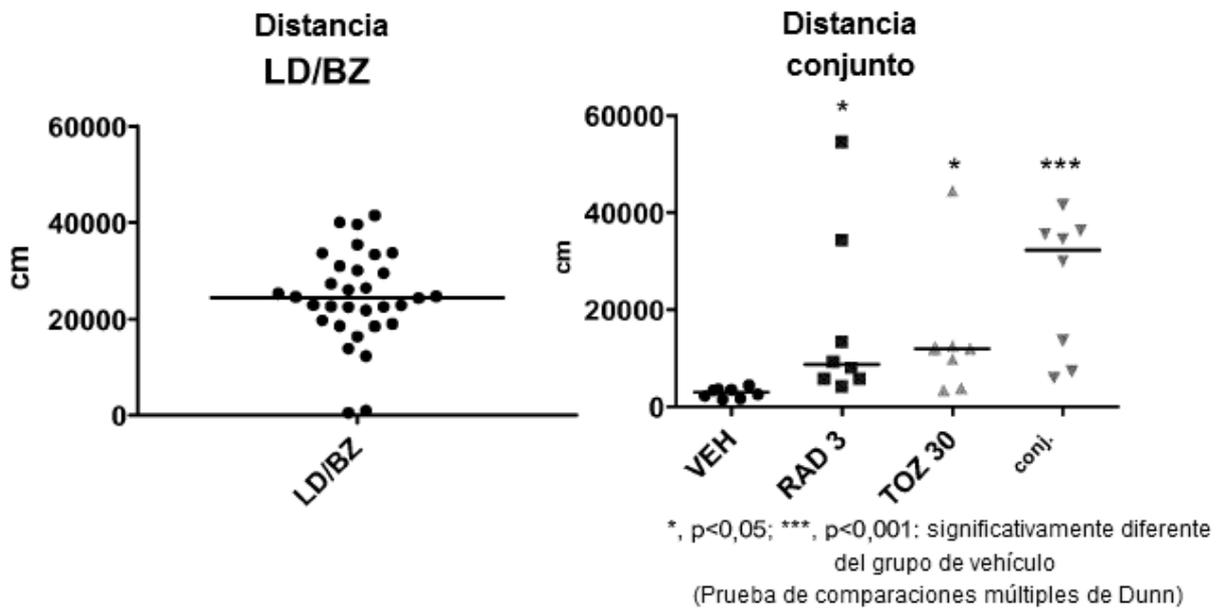


Figura 10

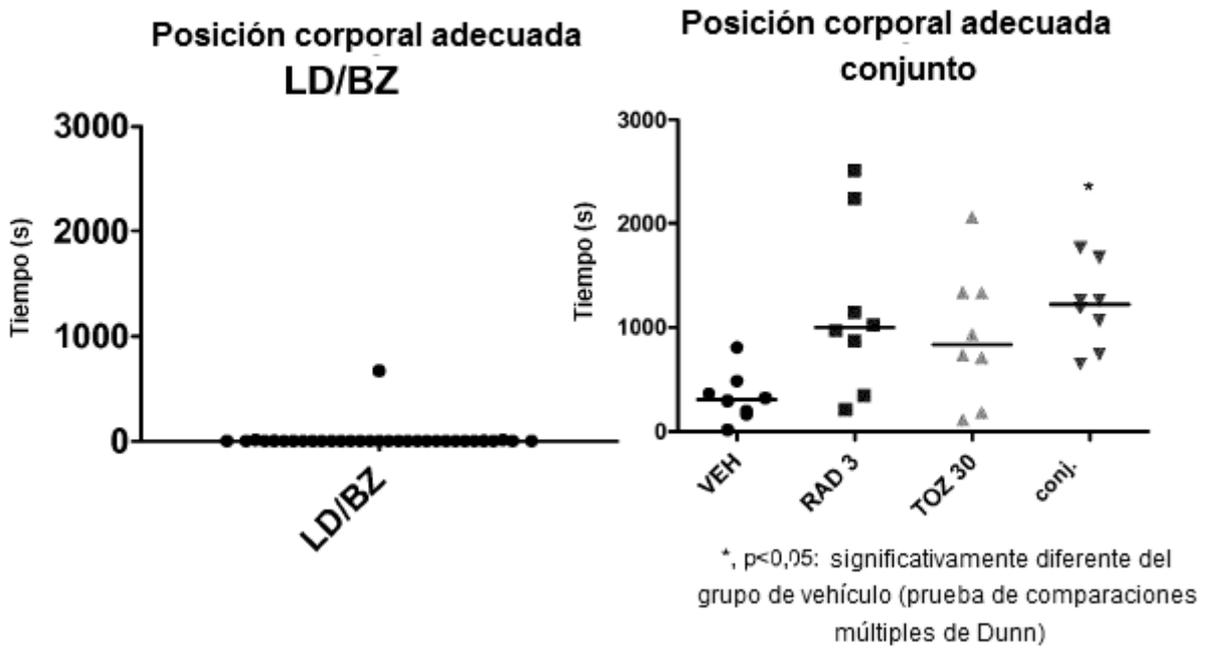


Figura 11

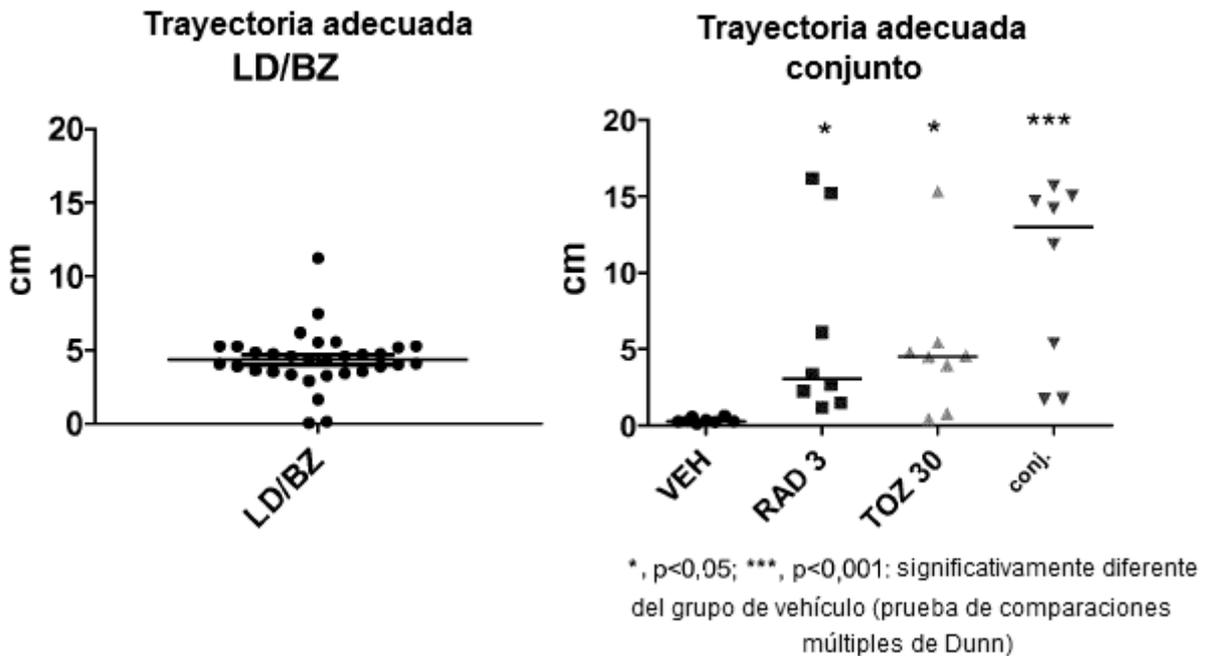


Figura 12

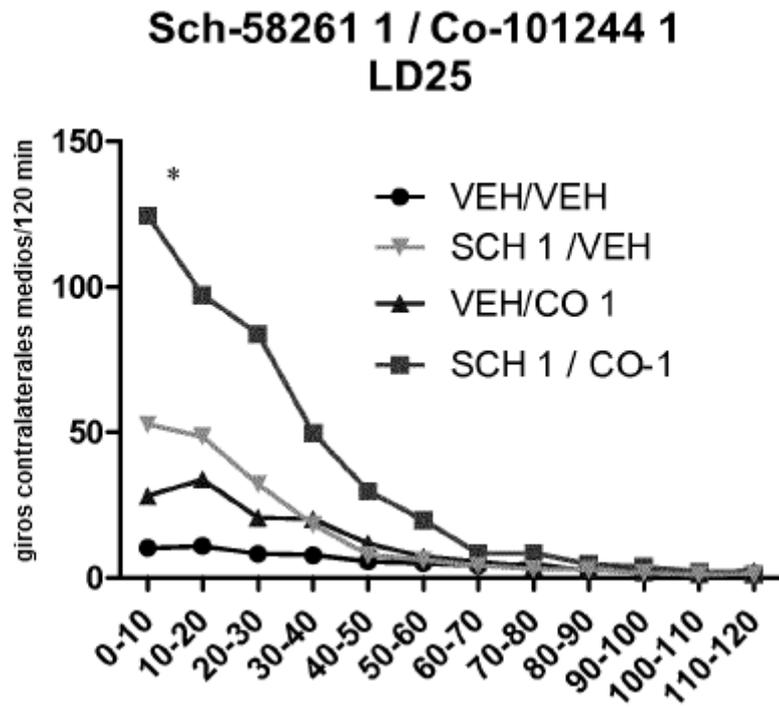
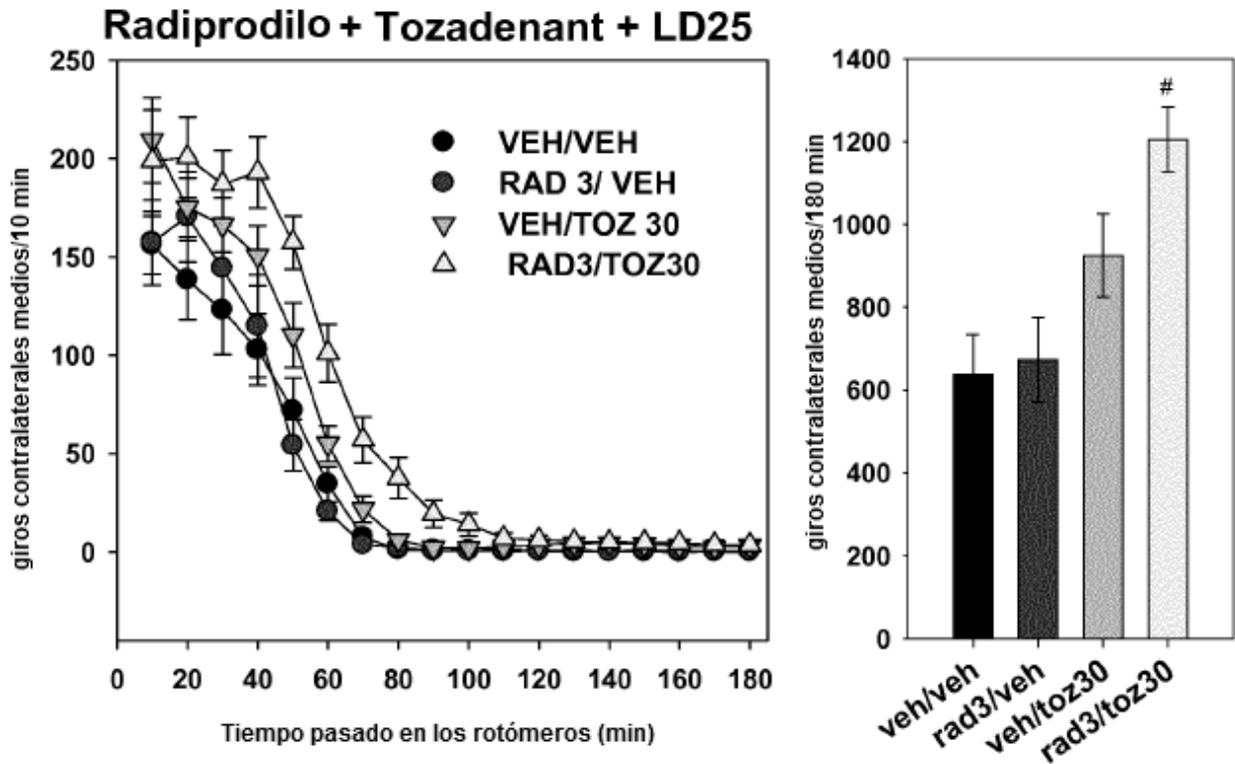


Figura 13



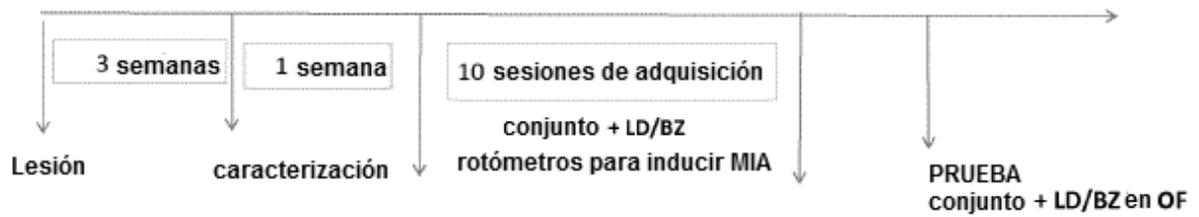
Los datos representan la media \pm eem de 8 ratas Sprague-Dawley por grupo.

Vehículo, radiprodilo y/o tozadenant se administraron por vía oral 15 minutos antes de las administraciones de L-dopa (25 mg/kg, ip).

Las ratas se habituaron 10 minutos a la zona de ensayo antes de empezar el grabado de datos;

#, $p < 0,05$: media significativamente diferente de las de todos los otros tres grupos (prueba post hoc de LSD).

Figura 14:



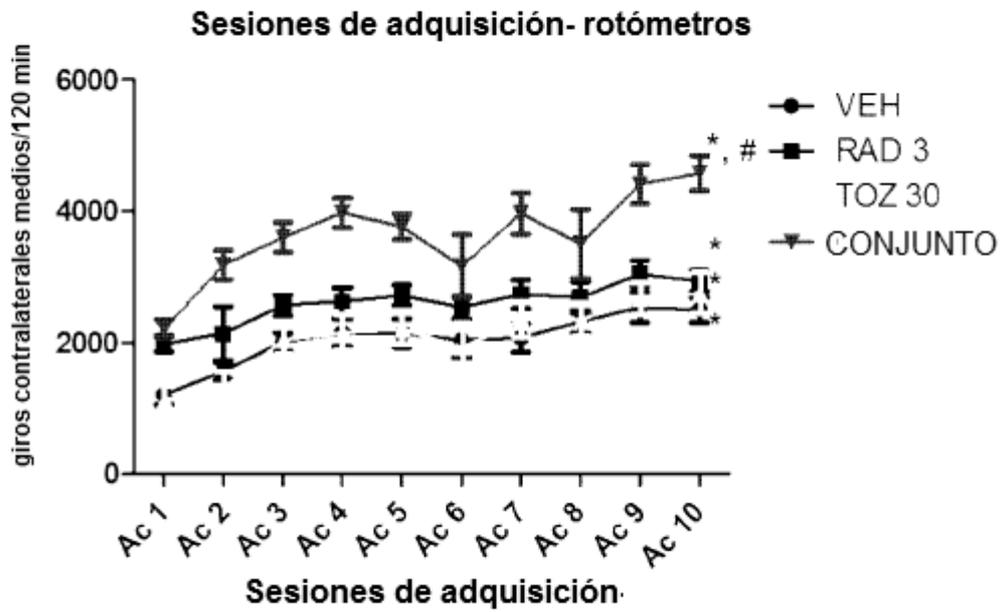
Semana 1 cirugía

Semana 3 caracterización con apomorfin 0,05 mg/kg (sc)

Semana 4-5 tratamiento crónico con conjunto + LD 14/BZ 3,5 (oid)
 colocación en rotómetros pequeños
 registro de rotaciones: cada día
 registro de video: A1- A5- A10
 objetivo: inducir el desarrollo de MIA

Semana 6 4 grupos: tratamiento 1 + tratamiento 2 + LD/BZ, pero colocación en campo abierto para puntuación conductual automatizada
 objetivo: valorar el perfil conductual en un entorno mayor

Figura 15



*. $p < 0,05$: media significativamente diferente de la de la primera sesión de adquisición para cada tratamiento respectivo (contrastes planificados)

#. $p < 0,001$: el grupo tratado con conjunto es significativamente más activo que los otros tres grupos (prueba post hoc de Tukey)

Figura 16

