

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 638**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/27** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2006 PCT/US2006/047038**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2007 WO07070425**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2006 E 06845115 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 1956904**

54 Título: **Ladostigilo de baja dosis para el tratamiento de la deficiencia cognitiva**

30 Prioridad:

**09.12.2005 US 748748 P**  
**17.04.2006 US 792410 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.09.2017**

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD. (50.0%)**  
**Hi-Tech Park, Edmond J. Safra Campus, Givat Ram**  
**91390 Jerusalem, IL y**  
**TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT FOUNDATION LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WEINSTOCK-ROSIN, MARTA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 632 638 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).

**Ladostigilo de baja dosis para el tratamiento de la deficiencia cognitiva****Descripción****5 Antecedentes de la invención**

**[0001]** El estrés oxidativo se ha propuesto como un mecanismo patogénico en la enfermedad de Alzheimer (EA) (P. F. Good et al, Am. J. Pathol. (1996) 149:21). El estrés oxidativo también puede contribuir a la degeneración neuronal y la muerte en trastornos que van desde el accidente cerebrovascular isquémico hasta la enfermedad de Alzheimer y Parkinson a la degeneración macular relacionada con la edad a la esclerosis lateral amiotrófica (M. P. Mattson et al., J. Neurosci. Res. (1997) 49:681), trastornos en los que el óxido nítrico, a través de peroxinitrito, desempeña un papel clave.

**[0002]** Se han desarrollado varias estrategias para conferir neuroprotección que se dirigen a los procesos neuroquímicos complejos que siguen mal funcionamiento neuronal. Los enfoques más antiguos (revisados por N. G. Wahlgren, en R. Green, "International Review of Neurobiology: Neuroprotective Agents and Ischemia Cerebral", Vol. 40, Academic Press, 1997) incluyen el cierre de los canales de calcio (con antagonistas del calcio), la inhibición de la liberación de glutamato, y el antagonismo a NMDA y el agonismo de GABA no han conducido a ningún tratamiento notable. Con el reciente énfasis en el papel de las especies de oxígeno reactivo (ROS) y de las especies de oxianión de nitrógeno, el enfoque de los posibles tratamientos se ha desplazado ahora a los antioxidantes y los eliminadores de radicales libres (K. Hensley et al., en "Neuroinflammation: mechanisms and management" (Ed: P. L. Wood), Humana Press Inc., 1997). R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano, también conocido como (3R)-3-(prop-2-inilamino)-2,3,-dihidro-1H-inden-5-ilo etilmetilcarbamato, se da a conocer en la publicación de la Solicitud PCT No. WO98/27055 (patente de EE.UU. nº 6.303.650, expedida el 16 de octubre de 2001 a Chorev). A este compuesto se le ha dado el nombre de ladostigilo desprotegido.

**[0003]** Se ha demostrado que ladostigilo inhibe la acetilcolinesterasa (ChE) y oxidasa de monoamino selectivamente en el cerebro (M. Weinstock et al., TV3326, un fármaco neuroprotector novedoso con actividades inhibitoras de colinesterasa y la oxidasa de monoamina para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, J. Neural Transm. Suppl. (2000) 60: 157 - 69). Como tal, se ha propuesto ladostigilo para el tratamiento de la depresión, trastorno por déficit de atención (ADD), trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH), síndrome de Tourette, enfermedad de Alzheimer y otras demencias, trastornos neuro-traumáticos y trastornos de la memoria en seres humanos, Patente de Estados Unidos Nº 6.538.025, expedida el 25 de marzo de 2003 a Chorev et al.). Se ha descrito la siguiente dosificación de ladostigilo: administración crónica de 52 mg/kg para tratar la comorbilidad de la demencia con Parkinsonismo en un modelo de rata (Y. Sagi, The neurochemical and behavioural effects of the novel cholinesterase-monoamine oxidase inhibitor, ladostigil, in response to L-dopa and L-tryptophan, in rats, Br. J. Pharmacol. (2005) 146 (4): 553-60); La administración crónica de 17 mg/kg para tratar la hiperansiedad y el comportamiento de tipo depresivo en un modelo de rata (T. Poltyrev et al., Effect of chronic treatment with ladostigil (TV-3326) on anxiogenic and depressive-like behaviour and on activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male and female prenatally stressed rats, Psychopharmacology (2005) 181 (1): 118-25); y la administración crónica de 26 mg/kg para mostrar la inhibición de la MAO selectiva del cerebro (M. Weinstock, Limited potentiation of blood pressure response to oral tyramine by brain-selective monoamine oxidase A-B inhibitor, TV-3326 in conscious rabbits, Neuropharmacology (2002) 43(6): 999 - 1005, y M. Weinstock, Effect of TV3326, a novel monoamine-oxidase cholinesterase inhibitor, in rat models of anxiety and depression, Psychopharmacology (2002) 160 (3): 318-24, respectivamente). También se ha demostrado que Ladostigilo suprime la apoptosis inducida por el agente generador de peroxinitrito N-morfolino sydnonimina (Sin-1) en células SH-SY5Y de neuroblastoma dopaminérgicas cultivadas (Maruyama et al., Anti-apoptotic action of anti-Alzheimer drug, TV3326 [(N-propargyl)-(3R)-aminoindant-5-yl]-ethyl methyl carbamate, a novel cholinesterase- monoamine oxidase inhibitor, Neuroscience Letters (2003) 341: 233 - 236).

**[0004]** Se sabe que los inhibidores de MAO (IMAO) tienen muchas contraindicaciones, y están asociados con una alta incidencia de crisis hipertensiva (Physician's Desk Reference, 59ª Ed. (2005) págs. 1583-4).

**[0005]** Se sabe que la inhibición de ChE bajaa la temperatura del cuerpo. (Gordon, 1994) Al estimular los receptores muscarínicos en el área pre-óptica del hipotálamo, la pérdida de calor se promueve a través de la vasodilatación periférica. Se ha demostrado que la caída de la temperatura corporal es proporcional al grado de inhibición de ChE cerebral.

**[0006]** Se da a conocer en el presente documento que ladostigilo se puede utilizar para reducir los efectos neurodegenerativos de estrés oxidativo nitrativo a niveles de dosis que no causan los efectos secundarios observados relacionados con la inhibición de la oxidasa de monoamina (MAO) o de la colinesterasa (ChE).

**Resumen de la invención**

**[0007]** La presente invención proporciona R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano o una

sal del mismo para uso en el tratamiento de deterioro cognitivo leve (MCI) en una cantidad eficaz para tratar el MCI no es más de 0,37 mg/kg/día de R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano del sujeto, o una cantidad correspondiente de la sal del mismo.

5 **[0008]** La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano o una sal del mismo para su uso en el tratamiento de MCI en un sujeto humano; En donde la cantidad de R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano o una sal del mismo es de 10 mg/día - 25 mg/día o una cantidad correspondiente de la sal del mismo.

10 **[0009]** Otros aspectos y realizaciones de la presente invención se especifican en las reivindicaciones dependientes.

### Breve descripción de las figuras

15 **[0010]**

**Figura 1** Efecto de ladostigilo en la inmunoreactividad de nitrotirosina en astrocitos de 3 regiones del hipocampo en el área CA1 una semana después de una inyección intracerebroventricular bilateral (icv) de STZ. Un \* indica que el resultado es significativamente diferente de CSF y STZ + ladostigilo,  $P < 0.01$ .

20 **Figura 2** a) Diagrama de la sección cerebral que muestra las tres zonas en la vecindad del sitio de penetración de la cánula con microglia diferencial y activación de astrocitos 7 días después de icv STZ. b) Microglia: y zonas i) microglia tienen soma de forma redonda carente de procesos; ii) microglia con soma de forma polimórfica y una variedad de procesos fibrosos; iii) microglia inactiva. c) Astrocitos: zonas i) libres de astrocitos; ii) astrocitos con procesos alargados pero sin soma; iii) astrocitos reactivos con procesos espesados y soma llena. Cuadro de área en b) y c) se muestra en mayor aumento en d) y e), respectivamente. La barra de calibración = 100  $\mu\text{m}$  en b) y c) y 20  $\mu\text{m}$  en d) y e).

25 **Figura 3** Cuantificación de la activación de microglia y astrocitos en las zonas mostradas en la Figura 2. a) Recuentos de subtipos de microglia en las zonas i) y ii). b) % del área de sección transversal de la herida ocupada por las zonas i), ii) y iii). En la zona (i) el área libre de astrocitos es mayor en las ratas inyectadas con STZ. Significativamente diferente de otros grupos, \*\*  $P < 0,01$ , \*  $P < 0,05$ .

30 **Figura 4** Cuantificación de astrocitos con expresión de NT en el sitio de penetración de la cánula y en otras tres áreas cerebrales que bordean los ventrículos laterales. CP = sitio de penetración de la cánula; CC = corpus callosum; LS = tabique lateral; MS = septo medial HP = área del hipocampo CA1. Significativamente diferente de otros grupos, \*  $P < 0.01$ .

35 **Figura 5** Imagen confocal de la expresión de NT en astrocitos reactivos en el hipocampo, incluyendo localización de la inmunoreactividad de NT en astrocitos activados.

40 **Figura 6** Efecto de ladostigilo en el déficit de memoria espacial en el laberinto de agua Morris inducida por icv STZ. a) ensayo 1; b) ensayo 2. Significativamente diferente de otros grupos \*  $P < 0.05$ .

45 **Figura 7** Comparación del aprendizaje espacial en ratas jóvenes y viejas en el laberinto de agua Morris (MWM). Prevención de 1 mg/kg de ladostigilo de déficit de aprendizaje en ratas viejas; a) muestra latencia de escape en cada uno de los dos ensayos diarios. Se nota la variabilidad mucho más grande del día-día en el aprendizaje de escape en ratas no tratadas envejecidas que se evita por el tratamiento crónico con el ladostigilo; b) latencia de escape promedio para dos ensayos diarios.

### Descripción detallada

50 **[0011]** La presente invención proporciona R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano o una sal del mismo para su uso en el tratamiento de la Disfunción Cognitiva Suave (MCI) en un sujeto humano, En una cantidad eficaz para tratar el MCI no más de 0,37 mg/kg/día de R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano del sujeto, o una cantidad correspondiente de la sal del mismo.

55 **[0012]** En otra realización, el R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano es en forma de una sal.

60 **[0013]** En otra realización, la sal de R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano es la sal de tartrato.

65 **[0014]** En aún una realización adicional de la invención, la sal es la sal de tartrato y la cantidad correspondiente de la sal no es más que 0,46 mg/kg/día del sujeto.

**[0015]** La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano o una sal del mismo para su uso en el tratamiento de MCI en un sujeto humano; en la que la cantidad de R(+)-6-(N-metilo, N-etilcarbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano o una sal del mismo es de 10 mg/día - 25 mg/día o una cantidad correspondiente de la sal del mismo.

**[0016]** El compuesto R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano se puede preparar como composiciones farmacéuticas particularmente útiles para la prevención o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o estrés oxidativo. Por ejemplo, las composiciones también pueden contener agentes de terapia adyuvantes para la enfermedad neurodegenerativa o antioxidantes adicionales.

**[0017]** Tales composiciones pueden comprender ladostigilo o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, junto con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las dosis de las formas de dosificación unitaria pueden estar en el intervalo de, por ejemplo, 1-25 mg, o preferiblemente 5-20 mg. En la práctica de esta invención, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a las sales de mesilato, maleato, fumarato, tartrato, hidrocloreuro, bromhidrato, esilato, p-toluenosulfonato, benzoato, acetato, fosfato y sulfato.

**[0018]** Las composiciones se pueden preparar como medicamentos para ser administrados por vía oral, parenteral, rectal o transdérmica. Las formas adecuadas para administración oral incluyen comprimidos, pastillas comprimidas o recubiertas, grageas, bolsitas, cápsulas de gelatina dura o blanda, tabletas sublinguales, jarabes y suspensiones; para ampollas de administración parenteral o viales que incluyen una solución o emulsión acuosa o no acuosa son adecuados; para la administración rectal hay supositorios envisionsados con vehículos hidrófilos o hidrófobos; y para aplicación tópica como ungüentos y sistemas de suministro adecuados de liberación transdérmica conocidos en la técnica.

**[0019]** Se describen Ejemplos específicos de vehículos y excipientes que se pueden usar para formular formas de dosificación oral de la presente invención farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 3.903.297 a Robert, expedida el 2 de septiembre de 1975. Techniques and compositions for making dosage forms useful in the present invention are described-in the following references: 7 Modern Pharmaceutics, Chapters 9 and 10 (Banker & Rhodes, Editors, 1979); Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets (Lieberman et al., 1981); Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms 2nd Edition (1976); Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985); Advances in Pharmaceutical Sciences (David Ganderton, Trevor Jones, Eds., 1992); Advances in Pharmaceutical Sciences Vol 7. (David Ganderton, Trevor Jones, James McGinity, Eds., 1995); Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Series 36 (James McGinity, Ed., 1989); Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol 61 (Alain Rolland, Ed., 1993); Drug Delivery to the Gastrointestinal Tract (Ellis Horwood Books in the Biological Sciences. Series in Pharmaceutical Technology; J. G. Hardy, S. S. Davis, Clive G. Wilson, Eds.); Modern Pharmaceutics Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol 40 (Gilbert S. Banker, Christopher T. Rhodes, Eds.).

**[0020]** Los comprimidos pueden contener aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes, agentes colorantes, agentes saborizantes, agentes inductores de flujo, y agentes de fusión. Por ejemplo, para la administración oral en la forma de unidad de dosificación de un comprimido o cápsula, el componente de fármaco activo puede combinarse con un vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable, oral, no tóxico, tal como lactosa, gelatina, agar, almidón, sacarosa, glucosa, celulosa de metilo, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, manitol, sorbitol, celulosa microcristalina y similares. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, almidón de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, povidona, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, ácido esteárico, fumarato de estearilo sódico, talco y similares. Los desintegrantes incluyen, sin limitación, almidón, celulosa de metilo, agar, bentonita, goma de xantano, croscarmelosa sódica, almidón glicolato sódico y similares.

**[0021]** Tal como se usa en el presente documento, un portador "farmacéuticamente aceptable" es uno que es adecuado para la administración a seres humanos y/o animales sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación, y respuesta alérgica) acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

**[0022]** Tal como se usa en el presente documento, una "enfermedad neurodegenerativa" se refiere a una enfermedad en la que la degeneración se produce en cualquier materia gris o blanco, o ambos, del sistema nervioso. Por lo tanto, tal enfermedad puede ser neuropatía diabética, demencia de senilo, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve (MCI), enfermedad de Parkinson, parálisis del nervio facial (Bell), glaucoma, corea de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), estado epiléptico, neuropatía óptica no arterítica, hernia de disco intervertebral, deficiencia de vitaminas, enfermedades priónicas tales como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, síndrome del túnel carpiano, neuropatías periféricas asociadas con diversas enfermedades, incluyendo pero no limitándose a uremia, porfiria, hipoglucemia, síndrome de Sjorgren Larsson, neuropatía sensitiva aguda, neuropatía atáxica crónica, cirrosis biliar, amiloidosis primaria, enfermedades pulmonares obstructivas, acromegalia, síndromes

de malabsorción, policitemia vera, gammapatías IgA e IgG, complicaciones de diversos fármacos (por ejemplo, metronidazol) y toxinas (por ejemplo, alcohol o organofosforados), enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, ataxia telangectasia, ataxia de Friedreich, polineuropatías amiloides, adrenomielse neuropatía, neuropatía axonal gigante, enfermedad de Refsum, enfermedad de Fabry y lipoproteinemia.

**[0023]** Tal como se usa en este documento, "predispuesto" a una enfermedad neurodegenerativa o al estrés oxidativo en el cerebro puede referirse a una predisposición genética, familiar o químicamente inducida.

**[0024]** Tal como se usa en este documento, una "cantidad inhibitoria de menos de monoamina-oxidasa" se refiere a una cantidad que provoca la inhibición de MAO no más de 25% después de la administración aguda a un sujeto, o no más de 30% de inhibición de la MAO durante la administración crónica a un sujeto.

**[0025]** Una "cantidad inhibitoria de menos de colinesterasa" se refiere a una cantidad que provoca no más de 30% de inhibición de ChE después de la administración aguda a un sujeto, o no más de 30% de inhibición de ChE durante la administración crónica a un sujeto.

**[0026]** En los métodos descritos, la administración puede ser periódica o regular. Por lo tanto, la administración puede estar en una sola dosis unitaria de la cantidad deseada por un período dado, por ejemplo, una vez al día, semana, mes, etc., o puede estar compuesta de dosis múltiples que se suman a la cantidad deseada durante el periodo. Por ejemplo, la administración puede ser una, dos, tres o cuatro veces al día, o cada 5 días, cada semana, 2 semanas, 3 semanas, mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses o año.

**[0027]** Tal como se usa en la presente memoria, administración "aguda" se refiere a una sola administración a un sujeto.

**[0028]** Tal como se usa en el presente documento, la administración "crónica" se refiere a más de una administración a un sujeto, ocurriendo cada administración antes de que la anterior sea completamente borrada del sujeto. La administración crónica puede administrarse siete veces consecutivas a intervalos regulares, por ejemplo, diariamente.

**[0029]** Tal como se usa en este documento, un sujeto "aflicto" con enfermedad neurodegenerativa o con el estrés oxidativo en el cerebro significa que el sujeto ha sido diagnosticado con la enfermedad neurodegenerativa o el estrés oxidativo en el cerebro.

## **Detalles experimentales**

### Ensayo de Inhibición de la oxidasa de monoamina (MAO)

**[0030]** El nivel de inhibición de MAO (MAO-A y MAO-B) se puede determinar mediante procedimientos rutinarios, incluyendo los que se detallan a continuación.

#### In vivo

**[0031]** Las ratas y los ratones se tratan por inyección subcutánea (s.c.) o intraperitoneal (ip) o administración oral (po) del compuesto a ensayar. Los animales se decapitan aproximadamente 2 horas después del tratamiento con fármaco y la actividad de MAO se determina en el cerebro, intestino y/o hígado. La actividad de MAO se expresa como porcentaje de la actividad enzimática en relación con un grupo de control administrado sólo con vehículo. Las dosis eficaces que producen inhibición de la MAO al 50% (valores ED<sub>50</sub>) se calcularon a partir de curvas de inhibición.

**[0032]** El tratamiento repetido por ladostigilo (por ejemplo, las dosis al día durante 7 días) se puede utilizar para calcular la inhibición lograda a través de la administración crónica.

**[0033]** En el caso de tartrato de ladostigilo, se utilizó este método para determinar que cantidades de hasta 20,4 mg/kg de la base de ladostigilo (administración aguda) y hasta 4,5 mg/kg de la base de ladostigilo (administración crónica) causa no más de 25 % de inhibición de MAO (tanto MAO-A como MAO-B).

#### In vitro

**[0034]** La enzima MAO obtenida a partir de un homogeneizado de cerebro de rata en 0,3M de sacarosa, que se centrifugó a 600 g durante 15 minutos. El sobrenadante se diluye apropiadamente en 0,05 M de tampón de fosfato y se preincubó con diluciones en serie de los compuestos de ensayo durante 20 minutos a 37°C. Se añaden sustratos marcado con <sup>14</sup>C (2-feniletilamina, en lo sucesivo PEA; 5-hidróxitriptamina, en lo sucesivo 5-HT) y la incubación continuó durante otros 20 minutos (PEA), o 30-45 minutos (5-HT). Las concentraciones de sustrato utilizadas son 50 μM (PEA) y 1 mM (5-HT). En el caso de PEA, la concentración de enzima se elige de manera que no más del 10% del sustrato se metabolice durante el transcurso de la reacción. Los productos desaminados se extraen en tolueno-

acetato de etilo (1: 1 v/v) que contiene 0,6% (p/v) de 2,5-difeniloxazol (ppo) antes de la determinación por recuento de centelleo líquido. La radioactividad en el eluato indica la producción de metabolitos neutros y ácidos formados como resultado de la actividad de MAO. La actividad de la MAO en la muestra se expresa como un porcentaje de la actividad de control en ausencia de inhibidores después de la resta de los valores en blanco apropiados. La actividad determinada usando PEA como sustrato se denomina MAO-B, y la determinada usando 5-HT como MAO-A. Las concentraciones de inhibidor que producen 50% de inhibición del metabolismo de sustrato ( $CI_{50}$ ) se calculan a partir de las curvas de inhibición.

#### Ensayo de Inhibición de Acetilcolinesterasa (ChE)

**[0035]** El nivel de inhibición de ChE se puede determinar por métodos de rutina, incluyendo los que se detallan a continuación.

#### In vivo

**[0036]** En la medición *in vivo* de la inhibición de ChE es similar a la de la medición *in vivo* de la inhibición de MAO, excepto que los monos cynomolgus son tratados, y los tejidos se examinan para inhibición de ChE de cerebro, plasma y eritrocitos.

**[0037]** En el caso de tartrato de ladostigilo, se utilizó este método para determinar que cantidades de base de ladostigilo de hasta 7,0 mg/kg (administración aguda o crónica) no causan inhibición de más del 30%.

#### In vitro

**[0038]** Acetilcolinesterasa de eritrocitos humanos (tipo XIII, Sigma Israel), se prepara en una solución de reserva de 1 U/ml, conteniendo Tritón (1%) y albúmina de suero bovino (0,05%) en tampón fosfato (pH 8). La enzima (0,05 U) se incuba con 3-5 concentraciones diferentes del compuesto de ensayo (por triplicado) durante periodos de 15 a 60 minutos a 37°C. A continuación se añade el sustrato de acetiltio de colina (0,075 M) y 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB, 0,01 M) y la velocidad de hidrólisis del sustrato que produce un producto amarillo monitorizado espectrofotómicamente a 412 nM (Ellman et al., Biochem Pharmacol. (1961) 7: 88 - 95). El porcentaje de inhibición de ChE por cada concentración de fármaco se calcula en comparación con el de la enzima en ausencia de fármaco. Entonces se calcula la concentración de cada fármaco que inhibe la ChE en un 50% ( $CI_{50}$ ) en el momento de la actividad máxima.

**[0039]** Un método estándar para la conversión de una dosis utilizada en animales a una dosificación apropiada para uso humano está disponible públicamente (Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, U.S. Dept. HHS/FDA/CDER (julio de 2005), en <http://www.fda.gov/cder/guidance/5541fnl.doc>). La conversión de dosis depende de la especie. La conversión de dosis entre especies consiste en dividir la dosificación animal por un factor estándar con el fin de derivar la dosificación para uso humano. El factor estándar recomendado para convertir a la dosis equivalente humana para un humano medio de 60 kg basado en la especie animal es, por ejemplo, 12,3 para ratones, 6,2 para ratas, 3,1 para monos cynomolgus. Alternativamente, la dosis equivalente humana (HED) se puede obtener utilizando la siguiente fórmula:  $HED = \text{dosis animal en mg/kg} * (\text{peso animal en kg/peso humano en kg})^{0,33}$ .

#### Pruebas en animales

**[0040]** Se sabe que estreptozotocina ("STZ") causa el estrés oxidativo en las células beta pancreáticas cuando se inyecta por vía parenteral (Takasu et al., Streptozotocin- and alloxan-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and DNA fragmentation in pancreatic islets, Dia- betes (1991) 40:1141-5). Estudios previos de los inventores han demostrado que una única inyección icv bilateral de STZ causa deterioro de la memoria episódica medida por la prueba de reconocimiento de objetos 2 semanas más tarde, que todavía está presente después de 8 semanas. Los déficits de memoria se observan 3-8 semanas más tarde, particularmente después de 3 inyecciones icv de STZ (Lannert y Hoyer, 1998) y se pueden reducir mediante el tratamiento crónico con antioxidantes, melatonina y resveratrol (Sharma y Gupta, 2001, 2002) de ROS en su etiología.

**[0041]** Estudios previos realizados por los inventores también han demostrado que STZ induce estrés oxidativo nitrativo en el estrato oriens del hipocampo después de una semana, y que una sola inyección de STZ reduce los niveles de antioxidantes de bajo peso molecular en el fondo de saco y corpus callosum. En un examen histológico detallado del cerebro después de la inyección intracerebroventricular (icv) de estreptozotocina (STZ) en ratas se encontró que la activación microglial ocurre en áreas discretas (Shoham et al., 2003). Icv STZ provoca la activación de los astrocitos y microglia en el hipocampo y en el sitio de la inyección de STZ, que conduce a la producción de

óxido nítrico (ON) y especies de oxígeno reactivas (en última instancia O<sub>2</sub>- y OH-) (Simmons et al, la inducción. Induction of nitric oxide synthase in glial cells, J. Neurochem. (1992) 59: 897 - 905).

5 **[0042]** Astrocitos activados expresan receptores de aminoácidos excitadores, absorben glutamato, y también están en riesgo de estrés oxidativo (Ouyang y Giffard, 2004). Por lo tanto, un origen común de estrés oxidativo en el hipocampo podría ser el exceso de estimulación excitatoria (desequilibrio glutamato-GABA) que implica la desregulación intracelular del calcio que puede conducir a la interrupción de los sistemas intracelulares de defensa antioxidante (Lipton et al. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders, N. Engl. J. Med. (1994) 330: 613 - 22).

10 **[0043]** La activación seguida de una pérdida de astrogliia puede resultar en la desregulación de la glia a señalización de neurona (Kielian et al., Effects of neuroinflammation on glia-glia gap junctional intercellular communication: a perspective, Neurochem. Int. (2004) 45: 429 - 36). Esto puede inducir un déficit de memoria por la reducción de la conducción de impulso en las neuronas mielinizadas en la corteza y el hipocampo y, finalmente, conduce a una reducción de la transmisión colinérgica hipocampal.

15 **[0044]** Por lo tanto, el estrés oxidativo inducido por STZ fue seleccionado como un modelo para probar el potencial antioxidante de ladostigilo.

#### Ejemplo 1

20 **[0045]** El estudio se realizó en ratas macho Sprague-Dawley (Harlan, Jerusalén) con un peso de 320-340g, con edades de 4 meses, de acuerdo con las directrices del Comité Institucional de la Universidad de Cuidado de Animales y basadas en las de los Institutos Nacionales de Salud, EE.UU. Las ratas se alojaron durante una semana antes de la cirugía en el Animal House a una temperatura ambiente de 21 ± 1°C y un ciclo de luz diurna de 12 horas (luces encendidas a las 7.00 h).

25 **[0046]** Ratas macho Sprague-Dawley (30) con un peso de 320-340g, se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal (ip) de equitesina 0,3 ml/kg. STZ (0,5 mg) en 2 µl de líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) se inyectó en cada ventrículo lateral de 20 ratas. Las coordenadas estereotáxicas para inyección icv fueron: 0,9 mm posterior, 1,8 mm lateral y 3,8 mm ventral del nivel de bregma. Ratas de control (10) recibieron una inyección bilateral de 2 µl de CSF artificial. A la mitad de las ratas inyectadas con STZ se les administró ladostigilo (1 mg/kg) por vía oral en un volumen de (1 ml/kg) una semana antes y durante una semana después de icv STZ. El resto recibió 1 ml/kg de agua. Las ratas se anestesiaron con pentobarbitona sódica, se perfundieron transcardialmente y los cerebros se procesaron para inmunocitoquímica como se describe a continuación.

#### *Histopatología*

35 **[0047]** Los cerebros se seccionaron en un criostato en 30 µm de rodajas gruesas y se tiñeron inmunocitoquímicamente con los siguientes marcadores: nitrotirosina, un marcador de estrés nitrativo/oxidativo, se tiñó con anti-nitrotirosina de conejo de Upstate (Lake Placid, NY, EE.UU.), diluido 1: 100. La proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un marcador de activación de astrocitos, se tiñó con anticuerpo de ratón, clon GA-5 de Sigma (Rehovot, Israel), diluido 1: 500. 1: 250. Para los anticuerpos de conejo, el conejo anti-conejo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante de Chemicon (Temecula, CA, EE.UU.), se diluyó 1: 200. Para el ratón anti-GFAP, el ratón anti-cabra secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante de Sigma (Rehovot, Israel), se diluyó 1: 100. El desarrollo del color se obtuvo por reacción con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno como se describe en Shoham et al., Intracerebroventricular injection of streptozotocin causes neurotoxicity to myelin that contributes to spatial memory deficits in rats, Exp. Neurol. (2003) 184: 1043 - 52. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía de campo brillante y se realizaron valoraciones cuantitativas de los marcadores apropiados mediante mediciones densitométricas con el software de AnalySIS.

#### *Microscopía confocal para la correlación entre la activación de astrocitos y el estrés oxidativo*

50 **[0048]** Las secciones de cerebro se incubaron tanto con conejo anti NT y ratón anti GFAP. En lugar de la reacción de color DAB-peroxidasa, los anticuerpos secundarios se conjugaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (NT) o con isotiocianato de rodamina (RITC) (GFAP).

#### *Cuantificación con análisis de imagen*

55 **[0049]** Astrocitos NT-inmunorreactivos se observaron en el estrato oriens, estrato, radiatum y alveus del hipocampo. Campos rectangulares de 200 µm x 100 µm se muestrearon de estas áreas en dos secciones que contienen el hipocampo de cada rata. El área porcentual en la que se observó la inmunoreactividad de nitrotirosina se calculó y se promedió entre las dos secciones.

Análisis estadístico

[0050] Los datos densitométricos se analizaron por univariante ANOVA seguida de la prueba *post hoc* de Duncan.

5

Tabla 1\*

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Rata	Tratamiento	Nitrotirosina Inmunorreactividad		
		Alveus	Stratum oriens	Stratum radiatum
	CSF			
C1	n = 6	0	0	0
C2		14,5	5,5	4
C3		2,5	5	5
C4		12	7	1,5
C5		6,5	11,5	0,5
C6		0	1	0,5
	Media SEM ±	5,9 ± 2,5	5,0 ± 1,7	1,9 ± 0,8
	STZ n = 7			
S1		30	40	46
S2		33,5	60	48
S3		22	33	52
S4		23,5	55,5	69,5
S5		20	43	40,5
S6		20	28	25,5
S7		38,5	50,5	53
	CSF Mean 6 SEM	Alveus	Stratum oriens	Stratum radiatum
		26,8 ± 2,8	44,3 ± 4,4	47,8 ± 5,0
	STZ + ladostigilo n = 5			
SL1		4	14,5	1,5
SL2		9,5	19	22
SL3		7	5,5	3
SL4		9	8,5	7,5
SL5		15	20,5	11,5
	Media SEM ±	8,9 ± 1,8	13,6 ± 2,9	9,1 ± 3,7
* Los datos representan la media de dos secciones por rata				

**[0051]** Una semana después de una sola inyección icv de STZ se observó un aumento significativo en la tinción de nitrotirosina en el estrato oriens, alveus y estrato radiatum del campo CA1 del hipocampo. La microscopía confocal reveló que la inmunoreactividad de la nitrotirosina se produjo en astrocitos reactivos. Ladostigilo impidió completamente el aumento de la inmunoreactividad de la nitrotirosina en astrocitos en tres áreas de la región CA1 del hipocampo (Figura 1).

#### Discusión

**[0052]** Una inyección icv bilateral única de estreptozotocina ("STZ") induce el estrés oxidativo nitrativo en el estrato oriens del hipocampo después de una semana. La presente invención extiende este hallazgo a dos áreas adyacentes en la región CA1 del hipocampo, el alvéolo y el estrato. La inducción de la inmunoreactividad de nitrotirosina sugiere una vulnerabilidad única de esta región a algunos procesos inducidos por STZ que implican estrés oxidativo. Específicamente, STZ causa la activación seguida de una pérdida de astrocitos en esta región del cerebro, aumentando así la probabilidad de hiperactividad del glutamato.

**[0053]** Administración oral diaria de ladostigilo (1,0 mg/kg), desde una semana antes, hasta una semana después de la inyección icv STZ impidió el aumento de la inmunoreactividad de nitrotirosina en astrocitos en 3 campos del hipocampo. Esto sugiere que una baja dosis de ladostigilo puede reducir el estrés oxidativo-nitratorio en astrocitos en una región hipocampal definida, lo que puede disminuir la reducción de la señalización en las células piramidales del hipocampo por STZ, reduciendo así el déficit de memoria.

#### Ejemplo 2

**[0054]** El estudio se realizó en ratas macho Sprague-Dawley (Harlan, Jerusalén) con un peso de 320-340g, con edades de 4 meses, de acuerdo con las directrices del Comité Institucional de la Universidad de Cuidado de Animales y basadas en las de los Institutos Nacionales de Salud, EE.UU. Las ratas se alojaron durante una semana antes de la cirugía en el Animal House a una temperatura ambiente de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  y un ciclo de luz diurna de 12 horas (luces encendidas a las 7.00 horas).

**[0055]** Ratas macho Sprague-Dawley (63) con un peso de 320-340g, de 4 meses, se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de equitesina 0,3 ml/kg. STZ (0,5 mg) disuelto en 2  $\mu\text{l}$  de líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) se inyectó en cada ventrículo lateral de 45 ratas. Las coordenadas estereotóxicas para la inyección de icv fueron: 0,9 mm posterior, 1,8 mm lateral y 3,8 mm ventral desde el nivel de bregma. Las ratas de control (18) recibieron una inyección bilateral de 2  $\mu\text{l}$  CSF artificial. A las ratas inyectadas con STZ (25) se les administró oralmente dosis de ladostigilo (1 mg/kg de sal de hemitartrato/día) en un volumen de (1 ml/kg) de una semana antes, hasta 1 u 8 semanas después de icv STZ. Las 20 ratas restantes recibieron 1 ml/kg de agua. Las ratas se alojaron dos por jaula con acceso libre a alimentos y agua hasta que se completaron las medidas conductuales, enzimáticas y citoquímicas.

#### *Inmunohistoquímica*

**[0056]** Una semana después de la inyección icv, 8 ratas inyectadas con CSF icv, 7 ratas que recibieron STZ solo, y 7 tratadas con ladostigilo fueron anestesiadas con pentobarbital sódico, perfundidas transcárdialmente y los cerebros se procesaron para inmunocitoquímica. Este procedimiento se repitió en otras 6 ratas de cada grupo, 8 semanas después de la inyección icv, cuando las ratas habían sido ensayadas para los déficits de memoria como se describe a continuación. Secciones flotantes de espesor de 30  $\mu\text{m}$  se prepararon a partir de los cerebros en un criostato y se crioconservaron como se describe en Shoham et al., *Supra*.

#### *Activación glial y estrés nitrativo*

**[0057]** Nitrotirosina, (NT) un marcador de estrés nitrativo/oxidativo, se tiñó con anti-nitrotirosina de conejo de Upstate (Lake Placid, NY, EE.UU.), diluido 1: 100 seguido por el burro secundario anti-conejo conjugado con rábano picante peroxidasa de Chemicon (Temecula, CA, EE.UU.), se diluyó 1: 200. GFAP, un marcador de activación de astrocitos, se tiñó primero con anticuerpo de ratón, clon GA-5 de Sigma (Rehovot, Israel), diluido 1: 500 a continuación, con la cabra secundaria anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante de Sigma (Rehovot, Israel), diluido 1: 100. La microglía se tiñeron por incubación con lectina biotinilada (Griffonia Bandeirea Simplicifolia, Vector Laboratories, Burlingame CA), seguidos por conjugación de extravidina con peroxidasa de rábano picante. El color se desarrolló por reacción con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno como se ha descrito previamente en Shoham et al., *Supra*. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de campo claro y evaluaciones cuantitativas de marcadores apropiados se realizaron utilizando el software de análisis.

#### *Marcadores colinérgicos*

**[0058]** Las neuronas colinérgicas se tiñeron para la transferasa de acetilcolina (ChAT) con anticuerpo de cabra anti ChAT 1: 200, (Chemicon, Temecula, CA, EE.UU.), transportador de acetilcolina vesicular (VACHT) con conejo anti

VChT (Sigma, Rehovot, Israel) 1 : 100, y para el receptor de factor de crecimiento nervioso (NGFR) de conejo anti NGFR (Alomone labs, Jerusalén, Israel) 1: 100. Las soluciones de anticuerpos secundarios fueron burro anti cabra y burro anti conejo 1: 200, cada uno conjugado con peroxidasa de rábano (Chemicon, Temecula, CA, EE.UU.). La reacción de color final se desarrolló como se describió anteriormente en Shoham et al., *Supra*.

5

#### *Microscopía confocal*

**[0059]** Para detectar pruebas de estrés oxidativo-nitrato en astrocitos activados, las secciones del cerebro se incubaron con tanto conejo anti NT como ratón anti GFAP. En lugar de la reacción de color DAB-peroxidasa, los anticuerpos secundarios fueron conjugados con isotiocianato de fluoresceína para NT o con isotiocianato de rodamina para GFAP. Para investigar la influencia de la inyección de STZ en microglial y astrocitos, las secciones del cerebro se incubaron con tanto ratón anti-GFAP (por astrocitos) como isolectina B4 marcada con biotina (por microglia). Los anticuerpos secundarios fueron isotiocianato de fluoresceína para GFAP y estreptavidina Cy3 para isolectina B4.

10

15

#### *Cuantificación con análisis de imagen*

**[0060]** Tres zonas distintas se distinguieron en la proximidad del sitio de inyección cortical después de la inyección icv STZ que contiene astrocitos y microglia con diferente morfología. La cuantificación de la microglia y astrocitos en las tres zonas se realizó en secciones de la muestra en un intervalo de P0.2-0,8 desde el bregma. El área de cada zona que contiene los diferentes tipos de astrocitos se midió y el porcentaje que cada zona ocupaba en el área de la herida se calculó (Statistica software, StatSoft, EE.UU.). Las clases de microglia se contaron por separado en cada zona. El número de células se dividió por el área de la zona para obtener una medida de la densidad celular.

20

25

**[0061]** Para cada análisis cuantitativo de los astrocitos NT-inmuno-reactivos, 3 secciones se muestrearon de cada rata. En 4 regiones cerebrales que bordean los ventrículos laterales y en la región CA1 de la inmunoreactividad NT de hipocampo se evaluó según el siguiente sistema de puntuación: 0 = No astrocitos NT-positivos; 1 = Tinción NT-positiva en fibras astrocíticas pero no en los cuerpos celulares; aproximadamente 7 astrocitos por 40 x campo; 2 = tinción NT-positiva en fibras astrocíticas y en los cuerpos celulares; aproximadamente 20 astrocitos por 40x campo; 3 = astrocitos NT-positivos están presentes en toda la región; 4 = astrocitos NT-positivos están presentes en toda la región e intensamente teñidos.

30

#### *Actividad de la colinesterasa y oxidasa de monoamina*

**[0062]** Se determinó el efecto del tratamiento de ladostigilo crónico en la actividad ChE en la corteza y el hipocampo de las ratas una semana después de icv STZ en 12 ratas (3 tratadas con agua y 9 con ladostigilo). El efecto del tratamiento agudo con ladostigilo 1 o 17 mg/kg se determinó 2 horas después de la administración del fármaco. Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical, 120 min después de la última dosis del fármaco al encontrarse la inhibición máxima de ChE en este momento (Weinstock et al., 2000). El cerebro se eliminó rápidamente, se lavó con solución salina en hielo y la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado se diseccionaron, se pesaron rápidamente y se almacenaron a - 70°C hasta el ensayo. La actividad total de ChE en la corteza y el hipocampo se midió como se describe en Wang et al., Gender differences in the effect of rivastigmine on brain cholinesterase activity and cognitive function in rats, *Neuropharmacology* (2000) 39: 497-506, utilizando el método espectrofotométrico de Ellman et al., A new and rapid color- imetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* (1961) 7: 88-95 con acetilticolina (Sigma Ltd) como sustrato usando homogeneizado de 100 mg de tejido en 1 ml de tampón de fosfato. Para determinar solamente la actividad de butirilcolinesterasa (BuChE) se incrementaron 3 veces las cantidades de tejido/ml de tampón y butirilticolina (Sigma Ltd) se utilizó como sustrato. La actividad de MAO A y B se midió en homogeneizados de cuerpo estriado como se describe en Weinstock et al., Limited potentiation of blood pressure response to oral tyramine by brain-selective monoamine oxidase A-B inhibitor, TV-3326 in conscious rabbits, *Neuropharmacology* (2002) 43: 999 a 1.005.

35

40

45

50

#### *Reconocimiento de objetos y el lugar*

**[0063]** La memoria episódica en la prueba de reconocimiento de objetos fue todavía intacta 2, pero no 4 semanas después de una única inyección icv STZ (Tabla 3). Por lo tanto, las ratas que fueron tratadas con ladostigilo o agua se ensayaron para el objeto y el lugar de reconocimiento de 4 semanas después de la inyección icv de STZ o CSF. La prueba de reconocimiento de objetos midió la memoria de trabajo no espacial con las características de la memoria episódica que se ve afectada principalmente en la demencia de senilo (Bartolini et al., Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions, *Pharmacol. Biochem. Behav.* (1996) 53: 277-83). La prueba depende de la función cortical y del hipocampo intacto (Winters et al., Double dissociation between the effects of periposthinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe, *J. Neuroscience* (2004) 24: 5901-8), mientras que el reconocimiento del lugar, otra manifestación de la memoria espacial, dependía de la función del hipocampo intacto. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe anteriormente en Mumby et al., Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts, *Learning Memory* (2002) 9: 49-57, en una caja hecha de Perspex oscuro (60 x 60 cm y 50 cm de altura), cubierto con una tapa Perspex oscura. Con el fin de

55

60

65

aumentar su interés en los objetos, las ratas se familiarizaron con la arena de ensayo colocándolos en ella durante 5 min en cada uno de 3 días sucesivos y la prueba de reconocimiento de objetos realizada en el 4° día. Dos objetos idénticos fueron colocados en la arena y se registró el tiempo tomado por las ratas para explorar cada objeto durante un período de 3 min. Una hora más tarde, los objetos fueron sustituidos por uno que era idéntico al de dos utilizados en la primera prueba y un segundo que era diferente de ellos y el tiempo necesario para explorar cada uno de ellos se registró de nuevo. Al día siguiente, la prueba de reconocimiento de lugar se llevó a cabo con dos objetos idénticos, como se describe más arriba, pero diferentes de los utilizados previamente. Una hora más tarde, el uno de los dos objetos se trasladó a otra posición en la arena como se describe en Mumby et al., *Supra*.

#### 10 *Memoria espacial en el laberinto de agua*

**[0064]** Dos semanas después de la tarea de reconocimiento de lugar las ratas se probaron para la memoria espacial en el laberinto de agua de Morris (MWM), que consistía en un depósito circular (150 cm de diámetro, 60 cm de alto) lleno a profundidad de 30 cm con agua a una temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Una plataforma de escape de vidrio transparente (20 cm de diámetro) se colocó 1 cm por debajo de la superficie, a medio camino entre el centro y el borde del depósito en un cuadrante donde se mantuvo para todos los ensayos de adquisición. Para el análisis de los datos del tanque se divide en cuatro cuadrantes, al norte (N), sur (S), este (E) y al oeste (W). Tanto la recogida como el análisis de los datos se realizaron usando un sistema de seguimiento de vídeo automatizado (HVS, Ltd). Para empezar cada ensayo la rata se colocó en el agua, frente a la pared de laberinto, de una de las cuatro posiciones de inicio espaciadas uniformemente alrededor del depósito (N, S, E & W). Las posiciones de inicio se eligieron al azar al comienzo de cada día para todas las ratas. Si la rata no logró encontrar la plataforma de escape dentro de 120 s se colocó en él durante 10 segundos y luego se retiró del depósito. A la rata se le dio dos ensayos al día durante 5 días 10:00-14:00 h con un intervalo entre ensayos de 15 min.

#### 25 *Análisis de los datos*

**[0065]** Medias de grupo de 3 medidas en pruebas de reconocimiento de objeto y lugar, la duración de la exploración en las fases primera y segunda y el índice de discriminación fueron sometidos a ANOVA de una vía. Latencias de escape diarias medias para el ensayo 1 y el ensayo 2 en el MWM en cada grupo se analizaron por medidas de ANOVA repetidas para DÍA y GRUPO seguido por prueba *post hoc* de Duncan en su caso. Datos histológicos se analizaron por ANOVA univariante seguido por prueba *post hoc* de Duncan. Todos los valores representan las medias  $\pm$  SEM.

#### 35 Resultados

*Los cambios en la microglia y astrocitos en la zona de lugar de penetración de la cánula.*

**[0066]** Las tres zonas de gliosis que podrían ser distinguidas en el motor y la corteza cingulada cerca del sitio de la penetración de la cánula siete días después de icv STZ se muestran en la Figura 2. Zona i) contenía microglia con soma redonda desprovista de los procesos que se asemejaban a macrófagos pero estaba casi libre de astrocitos; zona ii) había activado microglia con soma polimórfico y una variedad de procesos fibrosos y astrocitos activados con procesos alargados pero no soma; Zona iii) tenía microglia residente que se asemejaba a los de los controles de CSF-inyectado y astrocitos reactivos con procesos engrosados y soma lleno. Ladostigilo evitó los cambios tanto en microglia como en astrocitos en las zonas i) y iii) que resultaron de la inyección icv de STZ pero no tuvo ningún efecto sobre la densidad de microglia fibrosa en la zona i) que era similar a la de los controles de CSF-inyectado (Figuras 3a, b).

**[0067]** En el hipocampo, el efecto de STZ en las células gliales se definió menos bien. Reactivos de astrocitos estaban presentes en grupos dispersos, la mayoría de los cuales se encontraron en la región CA1. También se observaron en el cuerpo calloso, medial y septum lateral cerca del ventrículo lateral, mientras que otras áreas eran casi desprovistas de astrocitos. En todas estas áreas los astrocitos mostraron un aumento significativo en inmunorreactividad NT (Figuras 4 y 5). El tratamiento de ladostigilo redujo tanto la activación de astrocitos como la inmunorreactividad NT en estas regiones del cerebro al nivel de la observada en los controles de CSF-inyectado (Figs 4 y 6).

**[0068]** Ocho semanas después de la inyección icv STZ, el sitio de penetración de la cánula contenía tejido de la cicatriz que estaba lleno de fibras astrocíticas estrechamente empaquetadas, incluyendo la zona previamente desprovista de ellas, que no fueron reactivos. Alrededor de la cicatriz había unos pocos astrocitos reactivos pero ninguna microglia reactiva, redondeada o fibrosa, en o alrededor de la cicatriz. No se detectaron diferencias en la morfología de la cicatriz en ratas inyectadas con icv STZ con o sin ladostigilo. Tampoco hubo signos de inmunorreactividad NT en los astrocitos en cualquiera de las regiones del cerebro en las que estaba presente antes.

#### *Marcadores colinérgicos*

**[0069]** No se detectó cambio en el número o la morfología de las neuronas colinérgicas en cualquiera de los núcleos del prosencéfalo basal, el tabique medial, banda diagonal y núcleo basal magnocelular una u ocho semanas

después de la inyección icv STZ. Tampoco hubo ningún cambio en la densidad de los terminales colinérgicos en el hipocampo basado en varicosidades inmuno-reactivas VAcHT y procesos axonales.

*Actividad de la colinesterasa y oxidasa de monoamina*

5 **[0070]** El efecto del tratamiento crónico con ladostigilo (1 mg/kg) sobre la actividad enzimática total y la de BuChE se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Inhibición de la colinesterasa y oxidasa de monoamina por ladostigilo

10

Región del cerebro	Tiempo (min)	ChE (%)	BuChE (%)	MAO-A (%)	MAO-B (%)
Corteza	60	16,1 ± 4,7 *	16,2 ± 2,5 *	NT	NT
	120	23,6 ± 3,1 *	15,7 ± 3,2 *	NT	NT
Hipocampo	60	4,9 ± 2,6	7,3 ± 2,5	NT	NT
	120	5,9 ± 3,2	5,4 ± 2,8	NT	NT
Estriado	60	NT	NT	2,8 ± 2,5	11,3 ± 1,4 *
	120	NT	NT	3,8 ± 2,0	15,1 ± 3,4 *
Plasma	60	NT	NT	NT	NT
	120	20 ± 2%	NT	NT	NT

NT = no ensayado. Significativamente diferente de ratas no tratadas, \* P <0,05.

30

35 **[0071]** Un grado de inhibición relativamente bajo pero significativo se encontró en la corteza; (24%) de la actividad total de enzima y 16% de BuChE, siete días después de icv STZ y 1 o 2 horas después de la última dosis de ladostigilo. La actividad de ChE en el plasma se inhibió en un 20%. Sin embargo, no se detectó una inhibición significativa de cualquiera de enzima en el hipocampo. El tratamiento de ladostigilo tampoco tuvo ningún efecto sobre la actividad de estriatal MAO-A y sólo redujo la de MAO-B por 15% en 2 horas (Tabla 2).

40 **[0072]** La administración aguda de ladostigilo (1 mg/kg) solamente inhibió la ChE en la corteza por 7,8 ± 1,5%, pero no en el hipocampo o el plasma, mientras que 17 mg/kg inhibió ChE en ambas regiones del cerebro y en el plasma por 40-42 %.

*Reconocimiento de objetos y el lugar*

45

**[0073]** Los resultados del objeto y pruebas de reconocimiento de lugar se muestran en la Tabla 3.

50

55

60

65

Tabla 3: índices de discriminación de objeto<sup>§</sup> y pruebas de reconocimiento de lugar<sup>‡</sup> con diferentes tratamientos

Tratamiento y prueba (semanas después de STZ)	Objeto	Lugar
CSF (2)	0,342 ± 0,09 **	0,292 ± 0,08 **
CSF (4)	0,397 ± 0,05 **	0,274 ± 0,06 **
"" dos días después	0,339 ± 0,06 **	NT
STZ (2)	0,281 ± 0,11 *	0,231 ± 0,08 *
STZ (4)	-0,175 ± 0,07 #	0,000 ± 0,08 #
STZ (4) + ladostigilo 1 mg/kg crónico	0,238 ± 0,05 **	0,211 ± 0,07 *
STZ (4) + ladostigilo 1 mg/kg agudo	0,010 ± 0,08 #	NT
STZ (4) + 17 mg/kg aguda	0,348 ± 0,112 **	NT
"" dos días después	-0,112 ± 0,08 #	NT
Los datos representan la media ± s.e.m.		
§ Índice de discriminación = tiempo para explorar el nuevo objeto - tiempo para explorar objeto familiar/tiempo de exploración total de ambos objetos		
‡ tiempo para explorar nueva posición ob objeto - tiempo para explorar posición original del objeto de tiempo/exploración total de ambos objetos. NT = no ensayado. Significativamente diferente de 0, ** P <0,01, * <0,05; significativamente diferente de CSF, #P <0,01		

**[0074]** No hubo diferencias entre los grupos en el tiempo total empleado por las ratas que exploran los dos objetos en la fase de la discriminación de las pruebas de reconocimiento de objetos y el lugar. Sin embargo, las ratas tratadas con CSF icv o icv STZ con ladostigilo mostraron un índice de discriminación significativa en ambos ensayos (significativamente >0, P<0,05), mientras que las que recibieron icv STZ solo no lo hicieron. Esto indica que ladostigilo impide el deterioro de la memoria episódica y espacial inducida por STZ icv.

**[0075]** Ladostigilo no tuvo ningún efecto sobre el déficit en la memoria episódica cuando se administra en una dosis única de 1 mg/kg, cuatro semanas después de la inyección icv de STZ. Sin embargo, cuando está aumentado a 17 mg/kg el déficit de memoria se abolió pero regresó dos días más tarde, cuando ChE ya no se inhibió.

#### Prueba de memoria espacial

**[0076]** ANOVA de medidas repetidas para el ensayo 1 reveló un efecto significativo del DÍA ( $F_{4,26} = 25,67$ ,  $P < 0,0001$ ), pero ninguna interacción significativa GRUPO x DÍA. La prueba *Post hoc* para medios para grupos de más de 5 días mostró que las ratas tratadas con icv STZ sólo tenían latencias significativamente más altas que las inyectadas con CSF o STZ y se trató con ladostigilo. En el ensayo 2 también había un efecto altamente significativo del DÍA ( $F_{4,26} = 23,0$ ,  $P < 0,0001$ ), pero ninguna interacción DÍA x GRUPO (Figura 6). Tampoco hubo diferencias significativas entre el ensayo 1 y ensayo 2 en las latencias de escape para cualquier día en los diferentes grupos de ratas, lo que indica que ICV-STZ no afectó significativamente la memoria de trabajo en esta prueba.

#### Discusión

**[0077]** Inyección Icv de STZ en ratas, que se ha propuesto como modelo de los primeros cambios fisiopatológicos en EA (Arnaiz et al., Impaired cerebral glucose metabolism and cognitive functioning predict deterioration in mild cognitive impairment, *Neuroreport* (2001) 12: 851-5), induce la gliosis reactiva y el estrés oxidativo-nitrato antes de la inducción de los déficits de memoria y el tratamiento previo con ladostigilo puede prevenir estos efectos. La gliosis reactiva implica tanto microglia como astrocitos en la corteza cingulada y corteza motora cerca del sitio de la penetración de la cánula, en la región CA1 del hipocampo, y en el cuerpo calloso, medial y septum lateral cerca de la ventricular lateral. Evidencia de estrés oxidativo nitrato es vista como inmunoreactividad NT en astrocitos en la zona de la penetración de la cánula, el área CA1 del hipocampo y regiones limítrofes de los ventrículos laterales. Esto es seguido de 2-5 semanas más tarde por el deterioro de la memoria episódica y espacial, aunque no hay signos de daño neuronal o reducción en los marcadores colinérgicos específicos en la corteza o el hipocampo están presentes.

**[0078]** El tratamiento previo durante una semana antes y una semana después de la inyección icv de STZ con

ladostigilo (1 mg/kg), una novela bifuncional ChE y el inhibidor de MAO que protege contra la citotoxicidad inducida por un donador ON en cultivo celular, impide la activación microglial y la pérdida de los astrocitos en el entorno de la penetración de la cánula y áreas del hipocampo y previene el aumento de inmunoreactividad NT. El desarrollo de los déficits de memoria se evitó tres semanas más tarde.

**[0079]** La microglía es muy sensible a los cambios en su microambiente y se activa fácilmente en respuesta a la infección, lesión cerebral y cuando la barrera hematoencefálica se rompe (McGeer et al., *Inflammatory processes in Alzheimer's disease*, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* (2003) 27: 741-9). Se demostró que la inyección icv de STZ aumentó considerablemente el número de microglia activada, caracterizado por el acortamiento de sus procesos celulares y ampliación de soma, en los alrededores del sitio de penetración de la cánula, en el hipocampo y en regiones limítrofes de los ventrículos laterales. Las áreas de la corteza y el hipocampo que muestran la mayor concentración de microglia activada tenían una densidad mucho más baja de astrocitos que en las ratas inyectadas de CSF. Su desaparición podría haber sido causado por la secreción por microglia de citoquinas proinflamatorias y neurotóxicas, ON y superóxido que también son perjudiciales para las neuronas (McCarty et al. 2006). Al ser astrocitos importantes para secuestrar glutamato, su pérdida puede haber resultado en la actividad del glutamato exceso y el estrés excitotóxico (Lipton y Rosenberg, 1994). En apoyo de esta sugerencia se ha demostrado que el antagonista de glutamato, la memantina redujo la activación de la microglia y los astrocitos y los déficits de memoria vistos después de la inyección icv de A<sub>(1-40)</sub> en ratas (Miguel-Hidalgo et al., *Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid (1-40)*, *Brain Res* (2002) 958: 210-21).

**[0080]** En una zona de penetración cortical adyacente a la forma predominante de microglia tenían soma polimórfica con una variedad de procesos fibrosos. Estos contenían un gran número de astrocitos activados con procesos fibrosos largos que mostraron un aumento de la inmunoreactividad de GFAP reminiscente de los inducidos por ROS y en ratas de edad avanzada (Finch, *Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging*, *Neurobiol. Aging* (2003) 24: S123-7). La microglia en esta zona no difirió en la densidad de los de ratas de CSF-inyectado, y sugirió que estimularon la producción de GFAP pero no la liberación de citoquinas que eran tóxicas para astrocitos.

**[0081]** Astrocitos activados también se observaron en diferentes regiones del hipocampo de ratas inyectadas por STZ y contenían cantidades significativamente mayores de NT que después de icv CSF. Esto puede haber resultado de la inducción de ROS por STZ, como la que se observa en el páncreas después de su administración parenteral (Takasu et al., 1991) y también se observa en roedores envejecidos y seres humanos. Se ha demostrado que ON y superóxido alteran la función mitocondrial y la energía celular en astrocitos y en las neuronas vecinas (Bolanos et al., *Regulation of glucose metabolism by nitrosative stress in neural cells*, *Mol. Aspects Med.* (2004) 25: 61-73). Cambios similares incluyendo el aumento de la inmunoreactividad NT y la función mitocondrial deprimida se ven en los cerebros de los sujetos con EA (Finch, 2003). Esto podría explicar la alteración en el metabolismo de la glucosa inducida por icv STZ descrito previamente (Nitsch et al., *The intracerebroventricularly streptozotocin-treated rat: impairment of cerebral glucose metabolism resembles the alterations of carbohydrate metabolism of the brain in Alzheimer's disease*, *J. Neural Transm.* (1989) 1:109-10). El aumento en la expresión de GFAP en astrocitos activados puede también contribuir a una reducción en la función sináptica, en última instancia afecta a la memoria espacial y episódica. Se ha informado de la presencia de gliosis asociada con el estrés oxidativo-nitrativo en la EA (Griffin et al., *Glialneuron interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression*, *Brain Pathol.* (1998) 8:65-72) y podría resultar en una supresión de la función mitocondrial. El aumento de expresión de GFAP en astrocitos activados se ha asociado con una reducción en la función sináptica (Finch, 2003). Por lo tanto, el incremento de GFAP visto después de icv STZ podría haber contribuido a la alteración de la memoria espacial (reconocimiento de lugar) y episódica (prueba de reconocimiento de objetos) sin causar una pérdida medible de los marcadores colinérgicos. El aislamiento parcial de la corteza cingulada (situada entre las cánulas bilaterales) inducida por icv STZ también podría explicar el déficit de la memoria episódica, ya que la cicatriz glial formada alrededor del sitio de la penetración de la cánula incluye todas las capas corticales y del cuerpo calloso. Esta cicatriz podría interrumpir las conexiones de la corteza cingulada a la corteza peri-rhinal lo cual es importante para el reconocimiento de la objección (Winters et al., 2004). La constelación de la activación microglial, cambios en la morfología de astrocitos y el estrés oxidativo-nitrativo que preceden a la aparición de deficiencias en el metabolismo de la glucosa y la memoria apoya la validez de la rata inyectada por icv STZ como modelo de los primeros cambios fisiopatológicos en EA.

**[0082]** Aunque ladostigilo no es un antioxidante, se ha demostrado que bajas concentraciones previenen la citotoxicidad inducida por ROS y no en las células neuronales cultivadas (Youdim y Weinstock, 2001). En el presente estudio, la administración crónica de una dosis baja de ladostigilo antes y después de la inyección de STZ reduce significativamente las alteraciones en la microglía y astrocitos previenen el aumento de la inmunoreactividad NT, y tres semanas más tarde, el desarrollo de los déficits de memoria episódica. Es posible que la prevención por ladostigilo de la pérdida de reconocimiento de objetos resultó de la inhibición de ChE de 28% en la corteza. Sin embargo, esto no puede explicar su efecto sobre el reconocimiento de lugar, que depende de la actividad colinérgica del hipocampo y en el que no se produjo ninguna inhibición de la colinesterasa. Por tanto, es probable que el efecto neuroprotector de ladostigilo resultó de otras acciones de la droga. Éstas podrían incluir un efecto directo en microglia como se muestra en los datos preliminares de experimentos en nuestro laboratorio en el que las concentraciones de 0,1-10  $\mu$ M redujeron en 20-40% la liberación de ON a partir de microglia cultivadas inducida por LPS. Estas concentraciones son demasiado bajas para inhibir la ChE en microglia. Ladostigilo (0,1-10 m M) también

impidió apoptosis en células SH-SY5Y de neuroblastoma dopaminérgico expuestas al donador ON de SIN1, mediante la reducción de la caída en el potencial de membrana mitocondrial (Maruyama et al., 2003). Esta acción probablemente no se debe a la inhibición de la MAO o la colinesterasa, ya que es compartida por otros derivados de aminoindano que contienen propargilamina que no tienen ningún efecto sobre estas enzimas.

**[0083]** El tratamiento crónico una vez al día con ladostigilo (1 mg/kg) redujo el número de microglia activada y astrocitos restaurados en la zona (i) del sitio de la penetración de la cánula después de la inyección icv STZ a los observados después de la inyección de CSF. También evitó el aumento de la inmunoreactividad NT y el desarrollo de los déficits de memoria, proporcionando con ello una conexión etiológica entre ellos. El mecanismo por el cual ladostigilo produce estos efectos antiinflamatorios y neuroprotectores no se entiende completamente. Una posibilidad es que se activa receptores nicotínicos alfa 7 indirectamente como resultado de la inhibición de AChE (Shytle et al., Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors, *J. Neurochem.* (2004) 89:337-43). Aunque tal acción podría contribuir a la prevención de la gliosis en la corteza en la que se produjo aproximadamente un 20% de inhibición de AChE, no se puede explicar la reducción marcada en inmunoreactividad NT y activación de astrocitos en el hipocampo en la que no se produjo ninguna inhibición de AChE significativa. La neuroprotección tampoco resultó de la inhibición de MAO-B, que no excede del 15%. Una explicación más probable es que ladostigilo reduce la apoptosis y la muerte celular en las neuronas y astrocitos mediante la prevención de la caída del potencial de membrana mitocondrial inducida por ON y anión de superóxido liberado de microglia (Takuma et al., Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection, *Prog. Neurobiol.* (2004) 72:111-127). Tal acción de ladostigilo se demostró en células SH-SY5Y de neuroblastoma dopaminérgico expuestas al donador de ON, Sin1.

**[0084]** La administración aguda de ladostigilo (1 mg/kg), que sólo inhibe ChE en alrededor de 8% fue incapaz de revertir los déficits de memoria una vez que se habían producido. Esto se logró mediante una dosis más grande que inhibía ChE cortical en un 40%. Los datos sugieren que la prevención de gliosis, el estrés oxidativo-nitrato y déficits de memoria inducidos por la administración crónica de una dosis baja de ladostigilo resulta de una combinación de acciones sobre las células neuronales y gliales. La capacidad de inhibir ChE puede contribuir al efecto sobre la memoria episódica.

### Ejemplo 3

**[0085]** La condición clínica del deterioro cognitivo leve (DCL) es uno en el cual las personas experimentan pérdida de memoria que es mayor que lo que se esperaría para su edad (Petersen et al., 2001). Una proporción significativa de los sujetos con deterioro cognitivo leve desarrollan demencia de tipo Alzheimer (EA) dentro de unos pocos años. Inhibidores de la colinesterasa retardan la progresión del deterioro cognitivo en la EA, pero aún no se sabe si pueden retrasar o prevenir la progresión de MCI a EA. Como los humanos, ratas desarrollan una pérdida de memoria relacionada con la edad que se asocia con una reducción en el número y tamaño de las terminaciones nerviosas colinérgicas en células piramidales corticales (Turrini et al., 2001, Casu et al., 2002). A la edad de 18 meses, las ratas ya muestran una reducción del 40-50% en la liberación de ACh en la corteza y el hipocampo. Esto se puede aumentar a niveles normales por la administración aguda de los inhibidores de ChE en dosis que mejoran sus déficits de memoria (Scali et al., 2002). Sin embargo, no se sabe si cualquier inhibidor de ChE, y ladostigilo en particular, pueden prevenir la progresión a deterioro de la memoria en ratas de edad avanzada; ni se sabe qué dosis sería eficaz.

**[0086]** Los experimentos se realizaron en 30 ratas macho de la cepa Wistar. A la edad de 16 meses el 80% de ellas mostró el reconocimiento de objetos intactos, en comparación con el 90% de los mayores de 3 meses. Las ratas se alojaron en pares a una temperatura ambiente de 21 °C. Se pesaron una vez por semana y su ingesta de líquidos se midió diariamente durante dos semanas y luego dos veces por semana para los restantes 4 meses. Diez de las ratas fueron iniciadas en ladostigilo 1 mg/kg/día en el líquido de beber a los 16 meses de edad y dado el fármaco durante cuatro meses. A las 10 ratas restantes de la misma edad se les dio agua potable regular. Al final de los cuatro meses de memoria espacial de estas 20 ratas y de otros 10 años de edad de 3 meses se ensayó en el laberinto de agua de Morris como se ha descrito previamente (Shoham et al., 2006).

**[0087]** Las ratas de edad sin tratamiento mostraron una adquisición significativamente más lenta de aprendizaje espacial que las ratas jóvenes. La diferencia en el aprendizaje entre ratas jóvenes y viejas fue abolida sustancialmente por una baja dosis de tratamiento de ladostigilo (Fig. 1a, b). Los datos muestran que el tratamiento crónico con una dosis baja de ladostigilo puede prevenir el desarrollo de los déficits de memoria en ratas de edad avanzada.

### Discusión

**[0088]** El deterioro cognitivo leve (MCI) es una condición en general caracterizada por la pérdida de memoria reciente leve sin demencia o deterioro significativo de otras funciones cognitivas. MCI causa problemas de memoria que son mayores que normalmente se espera con el envejecimiento, pero una persona con MCI no muestra otros síntomas de demencia, como el juicio o razonamiento deteriorados. Las causas de la MCI no se entienden bien. Un panel asesor de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos dictaminó en 2001 que MCI, una condición separada de la enfermedad de Alzheimer, es un objetivo válido para nuevos tratamientos

farmacológicos. El Comité Asesor sobre Fármacos del Sistema Nervioso Central y Periférico ha indicado que más del 80% de los pacientes con deterioro cognitivo leve desarrollan la enfermedad de Alzheimer dentro de 10 años. Los científicos todavía están trabajando para entender MCI y su relación con la enfermedad de Alzheimer. Debido a que cuestiones básicas sobre este trastorno siguen sin respuesta, la definición de MCI sigue evolucionando. (deterioro cognitivo leve-Alzheimer, parte XVI, Harold Rubin, MS, ABD, CRC, 14 de noviembre de 2006).

**[0089]** Recientemente se ha demostrado que el deterioro cognitivo leve existe en dos subtipos distintos: MCI neurodegenerativa y MCI vascular. Los sujetos con MCI neurodegenerativa exhiben atrofia medial del lóbulo temporal, mientras que los sujetos con MCI vascular se presentan con lesiones vasculares, ambas de las cuales pueden ser observadas por resonancia magnética (MRI). Recientemente se ha informado de que los sujetos MCI neurodegenerativos poseen dominios cognitivos deteriorados que involucran la memoria, lo cual es predictivo para la conversión a la demencia o la enfermedad de Alzheimer (Meyer et al., 2005). Hasta hace poco tiempo, existía poca evidencia para apoyar la hipótesis de que MCI era un precursor de la enfermedad de Alzheimer; sin embargo, Meyer et al. enseñan claramente que MCI puede tomar la forma de un trastorno neurodegenerativo y posteriormente tomar la forma de demencia o de Alzheimer.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

- 5
1. R(+)-6-(N-metilo,N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano o una sal del mismo para uso en el tratamiento de deterioro definitivo leve COG (MCI) en un sujeto humano, en una cantidad eficaz para tratar MCI siendo no más que 0,37 mg/kg/día R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano de la presente, o una cantidad correspondiente de la sal del mismo.
- 10
2. El R(+)-6-(N-metilo,N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano para el uso según la reivindicación 1, en el que el R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano se manifiesta en forma de una sal.
- 15
3. El R(+)-6-(N-metilo,N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano para el uso según la reivindicación 2, en el que la sal es la sal de tartrato.
- 20
4. El R(+)-6-(N-metilo,N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano para el uso según la reivindicación 3, en el que la cantidad correspondiente de la sal es de no más de 0,46 mg/kg /día.
- 25
5. El R(+)-6-(N-metilo,N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano para el uso según la reivindicación 1, en el que la cantidad es eficaz para retrasar el progreso de MCI a la enfermedad de Alzheimer.
- 30
6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de R(+)-6-(N-metilo,N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano o una sal del mismo para uso en el tratamiento de la MCI en un sujeto humano; donde la cantidad de R(+)-6-(N-metilo, N-etilo-carbamoiloxi)-N'-propargilo-1-aminoindano o una sal del mismo es de 10 mg/día - 25 mg/día o una cantidad correspondiente de la sal del mismo

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

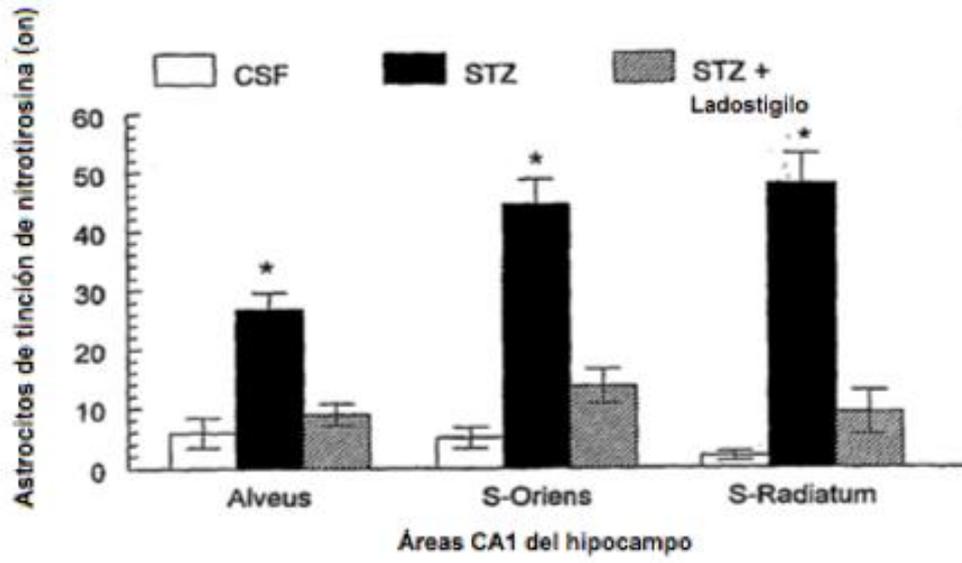


Figura 2

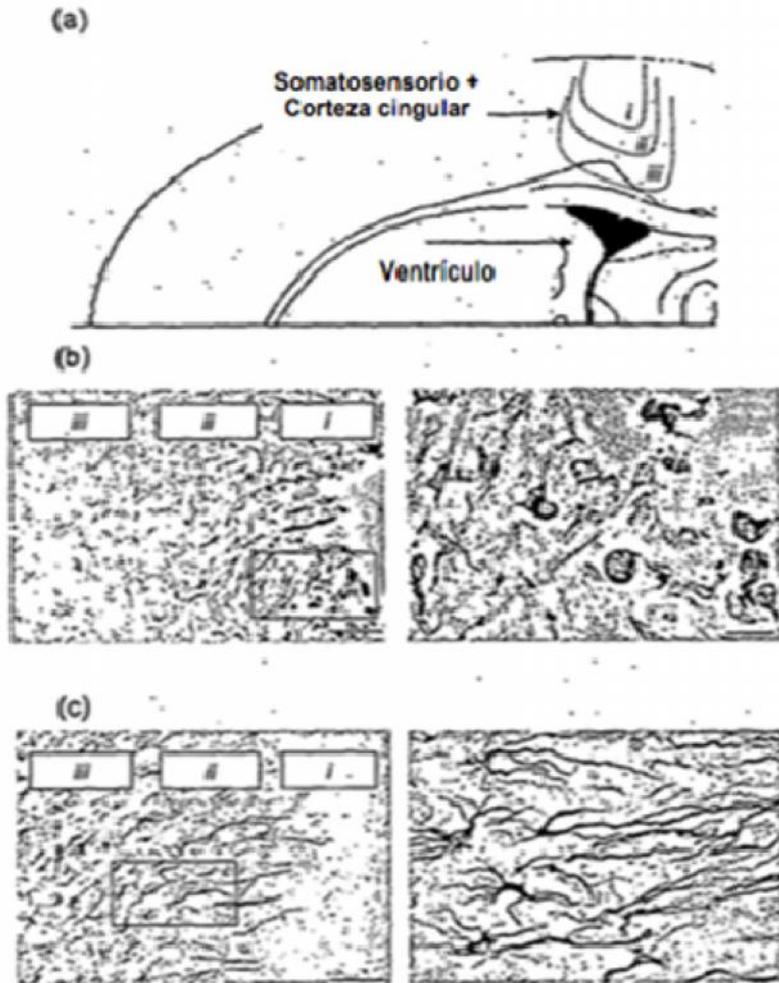


Figura 3

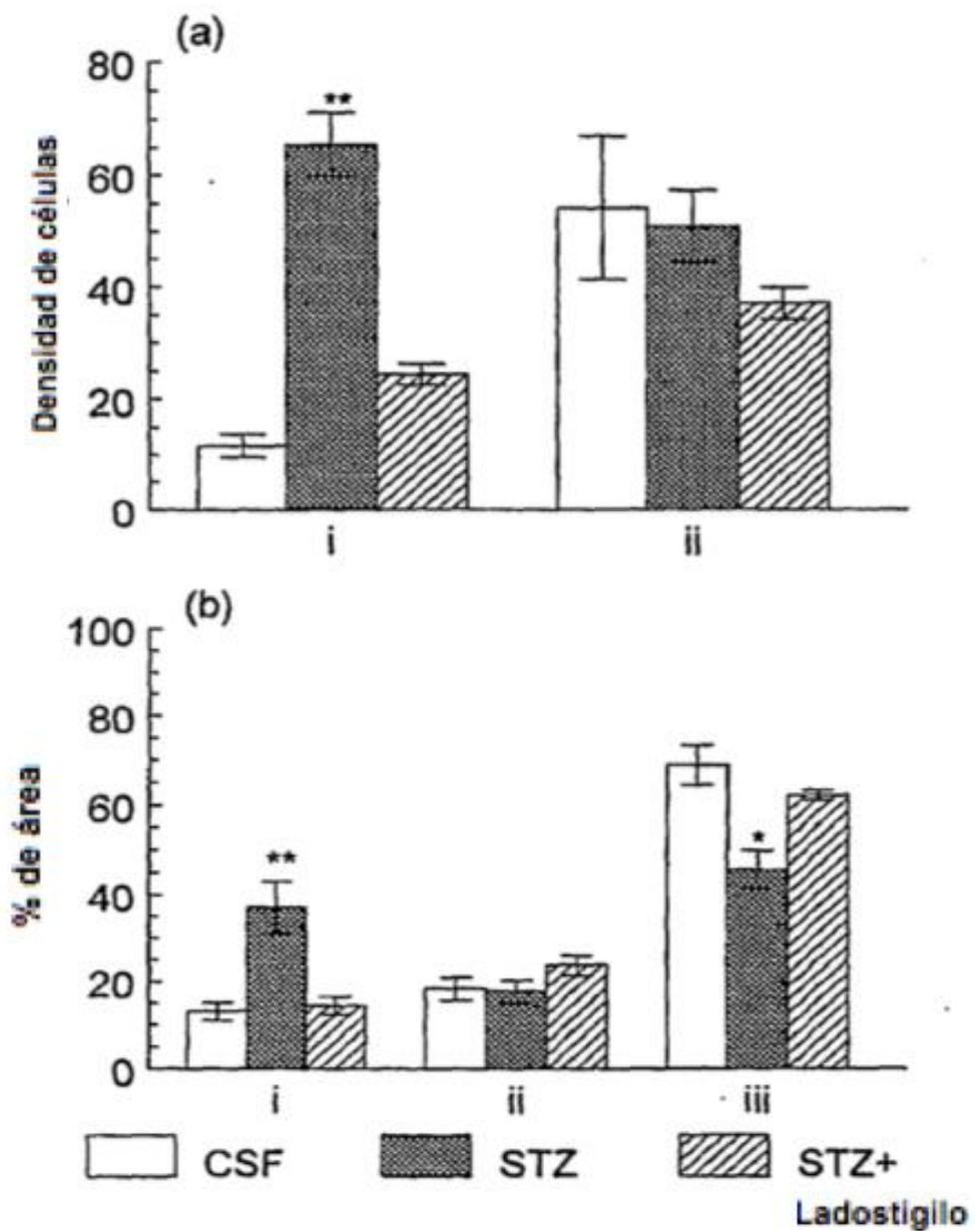


Figura 4

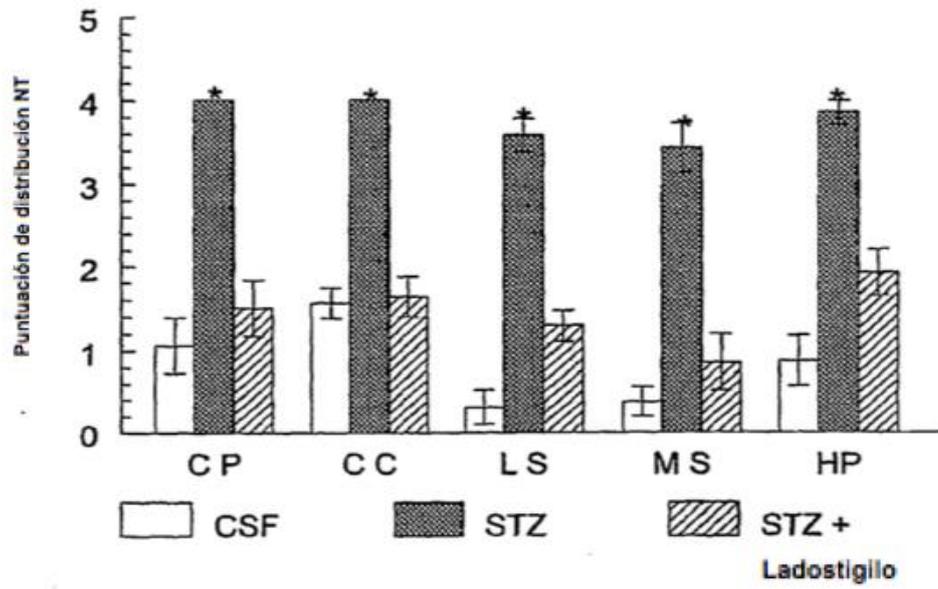


Figura 5

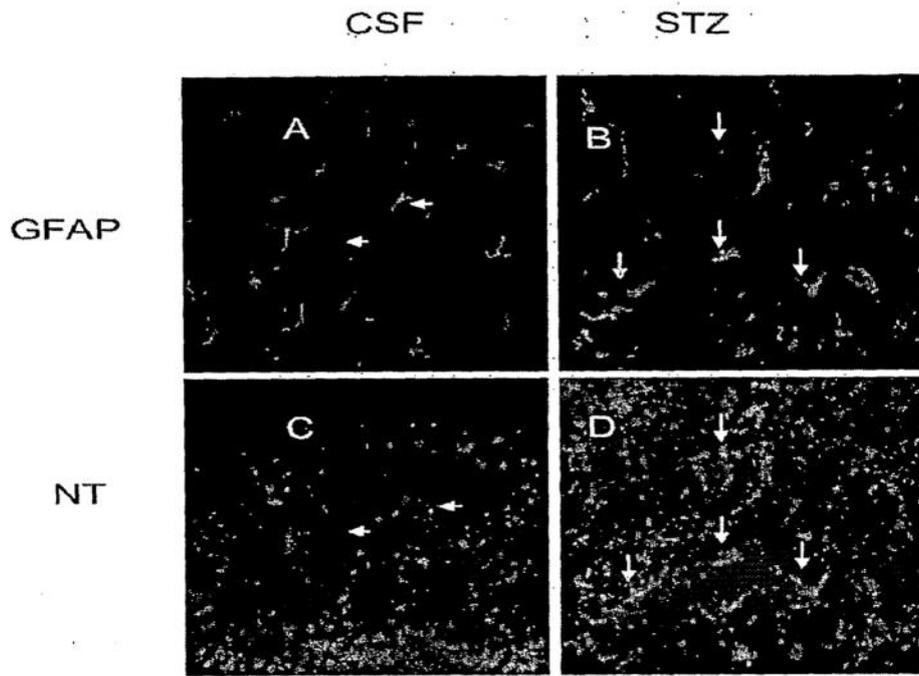


Figura 6

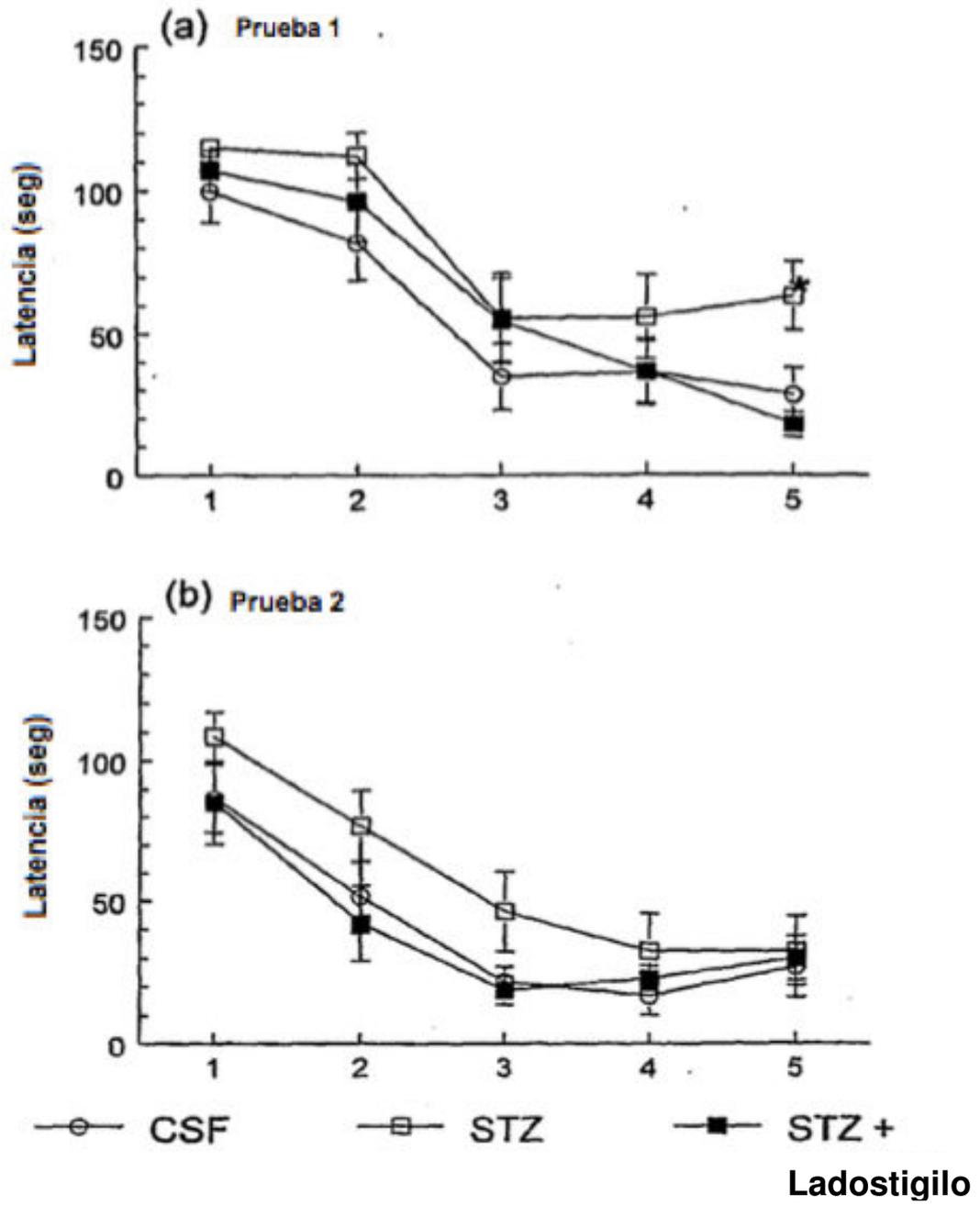


Figura 7

