

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 238**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/551** (2006.01)

**A61P 25/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2013 PCT/EP2013/054804**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13135596**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2013 E 13708430 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2825175**

54 Título: **Inhibidores de rho-quinasas para uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica**

30 Prioridad:

**12.03.2012 US 201261609576 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.11.2017**

73 Titular/es:

**GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN  
STIFTUNG ÖFFENTLICHEN RECHTS  
UNIVERSITÄTSMEDIZIN (100.0%)  
Robert-Koch-Strasse 40  
37099 Göttingen, DE**

72 Inventor/es:

**LINGOR, PAUL y  
TÖNGES, LARS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 644 238 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

Inhibidores de rho-quinasas para uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica

La presente invención se refiere a un nuevo uso de un inhibidor de la rho-quinasa conocido en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

5 **Antecedentes de la invención**

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, es una de las enfermedades neuromusculares más comunes en todo el mundo y afecta a personas de todas las razas y orígenes étnicos. La ELA se diagnostica con mayor frecuencia en personas entre 40 y 60 años y frecuentemente afecta un poco más a los hombres que a las mujeres. Una o dos de cada 100.000 personas desarrollan ELA cada año y se estima que en Estados Unidos cada año 5.000 personas son diagnosticadas con la enfermedad. La ELA es una enfermedad progresiva caracterizada por debilidad rápidamente progresiva, atrofia muscular y fasciculación, espasticidad, disartria, disfagia y compromiso respiratorio. Es un trastorno del movimiento neurodegenerativo causado por la degeneración de las neuronas ubicadas en el asta anterior de la médula espinal y las neuronas corticales. Incapaces de funcionar, los músculos se debilitan y atrofian. En la mayoría de los pacientes se mantiene generalmente la función cognitiva, aunque ~5% también desarrollan demencia frontotemporal. ~30-50% de los pacientes muestra también cambios cognitivos sutiles que pueden revelarse por medio de ensayos neuropsicológicos detallados.

En la ELA familiar existe un factor hereditario conocido, aunque esto representa sólo alrededor de 5-10% de todos los casos. Aproximadamente el 20% de los casos de ELA familiar se han relacionado con un defecto genético autosómico dominante en el cromosoma 21, que codifica la superóxido-dismutasa (SOD1). La ELA más común que provoca la mutación de SOD1 en América del Norte es A4V, caracterizada por una progresión excepcionalmente rápida desde el inicio hasta la muerte. Un estudio reciente identificó un gen llamado FUS ("Fused in Sarcoma", ALS6) como responsable de 1 de cada 20 casos de ELA familiar.

La degeneración de la primera y segunda motoneuronas en la ELA es un proceso patológico multifactorial. Se ha examinado una variedad de agentes neuroprotectores para contrarrestar la iniciación y/o progresión de la enfermedad, pero sólo el antagonista de glutamato Riluzol (comercializado por Sanofi-Aventis con la marca registrada Rilutek), que tiene como diana los transportadores de glutamato, ha conseguido hasta ahora uso clínico. Se ha encontrado que mejora la supervivencia en un grado modesto y también amplía el tiempo hasta que una persona necesita apoyo de ventilación. Riluzol no invierte el daño ya hecho a las neuronas motoras, y a las personas que lo toman se les debe controlar el deterioro hepático (que se produce en ~10% de las personas que toman el fármaco). Otros efectos secundarios conocidos del Riluzol son náuseas y fatiga que pueden hacer que los pacientes interrumpan el tratamiento.

Fasudil es un potente inhibidor de rho-quinasa (ROCK) y vasodilatador. En el pasado, se ha utilizado para el tratamiento del vasoespasmio cerebral, que es debido con frecuencia a hemorragia subaracnoidea, así como para mejorar el deterioro cognitivo observado en las víctimas de un accidente cerebrovascular. Además, se ha encontrado que es útil para el tratamiento de la hipertensión pulmonar y para potenciar la memoria y mejorar el pronóstico de los pacientes con Alzheimer.

Los inventores han mostrado previamente que la inhibición farmacológica de la rho-quinasa por Y-27632 (un derivado de 4-aminopiridina) y fasudil (un derivado de isoquinolina) no sólo mejora la regeneración, sino que también la supervivencia de las neuronas lesionadas del SNC *in vivo* e *in vitro* (Lingor, Teusch et al., 2007; Lingor, Tonges et al., 2008; Planchamp, Bermel et al., 2008; Bermel, Tonges et al., 2009). Además de los efectos establecidos en el citoesqueleto de actina, los inventores pudieron mostrar que la inhibición de ROCK da como resultado la activación de vías intracelulares que median la supervivencia neuronal. Además, los inventores han demostrado que la inhibición farmacológica de ROCK en el modelo de lesión del nervio óptico conduce a una regeneración de los axones del nervio óptico lesionado y es capaz de mejorar la supervivencia de las células ganglionares retinianas lesionadas (Lingor et al., 2010). El potencial neuroprotector de la inhibición de ROCK en la enfermedad neurodegenerativa ha sido además corroborado por otros grupos. Por ejemplo, se ha documentado una mejora de la función neurológica y un aumento de la supervivencia en modelos animales con la enfermedad de Huntington y atrofia muscular espinal (AME) (Li, Huang et al., 2009; Bowerman, Beauvais et al., 2010). Sin embargo, un efecto distinto de prolongación de la supervivencia en estos modelos animales sólo se mostró en modelos neurodegenerativos bastante agudos, como en el modelo de lesión del nervio óptico donde se evalúa la supervivencia de las células ganglionares retinianas 14 días después de la lesión y en el modelo de AME en el que los ratones generalmente mueren después de varias semanas de vida.

El documento WO 2009/155777 A1 se refiere a la aplicación de fasudil para inducir la regeneración de células madre de nervios craneales adultos. El documento WO 2005/117896 A1 describe formulaciones farmacéuticas de fasudil y su uso en el tratamiento, entre otras, de la regeneración neuronal.

El documento JP 2009 292782 A describe el uso de fasudil o hidroxifasudil como un agente regenerador de nervios para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como la ELA. Lingor et al., *Cell and Tissue Research*

349 (1): 289-311 (2012), describe que la degeneración de los axones ocurre en la ELA en una fase temprana, y que los inhibidores de ROCK tienen propiedades neuroprotectoras.

Todavía existe la necesidad en la técnica de tratamientos nuevos y eficaces de la ELA, en particular de tratamientos que tengan menos efectos secundarios que los conocidos actualmente.

## 5 Sumario de la invención

Los inventores decidieron evaluar el potencial terapéutico del inhibidor de ROCK, fasudil, en el modelo de ratón SOD1 G93A crónico de ELA (B6SJL-TgN (SOD1-G93A) 1 Gur), que refleja muy bien la evolución clínica de la enfermedad ELA durante un período de hasta 22 semanas. El estudio fue diseñado para que incluyera un grupo de tratamiento farmacológico presintomático (d50) y otro sintomático (d80) con fasudil frente a un control con vehículo. Los parámetros que se evaluaron fueron el comienzo de la enfermedad, la prolongación de la supervivencia y la función motora. Además, los inventores realizaron un análisis detallado de la influencia del tratamiento sobre la patología de la ELA en el sistema nervioso central y periférico, teniendo en cuenta todos los compartimentos principalmente afectados de esta enfermedad neurodegenerativa. En particular, los inventores realizaron un extenso examen inmunohistológico de los diferentes grupos de tratamiento y evaluaron tanto la supervivencia de las motoneuronas de la médula espinal como la infiltración glial con astrocitos y microglia activada en la médula espinal.

Los datos mostrados en los Ejemplos demuestran que el tratamiento con Fas30 prolonga significativamente la supervivencia de ratones SOD1 G93A hembras. Este efecto beneficioso también se refleja en una función de coordinación motora mejorada como se demuestra en la prueba del cilindro giratorio y se refleja inmunopatológicamente en un aumento de la supervivencia de las motoneuronas de la médula espinal y una disminución de la infiltración astrológica de la médula espinal.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende 1-(5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina (fasudil), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de un sujeto que padece ELA familiar, tal como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, la composición farmacéutica consiste en fasudil.

Igualmente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende 1-(5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina (fasudil), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de un sujeto propenso a padecer ELA familiar, como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, la composición farmacéutica consiste en fasudil.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un derivado de fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de un sujeto que padece ELA familiar, como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, la composición farmacéutica consiste en dicho derivado de fasudil. El derivado de fasudil es 1-(1-hidroxil-5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina (hidroxil-fasudil) o (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolinil)sulfonil]hexahidro-1*H*-1,4-diazepina (dimetil-fasudil).

Igualmente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un derivado de fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de un sujeto propenso a padecer ELA familiar, como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, la composición farmacéutica consiste en dicho derivado de fasudil. El derivado de fasudil es 1-(1-hidroxil-5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina (hidroxil-fasudil) o (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolinil)sulfonil]hexahidro-1*H*-1,4-diazepina (dimetil-fasudil).

Por tanto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en fasudil, o un derivado de fasudil seleccionado de hidroxil-fasudil y dimetil-fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de un sujeto que padece o es propenso a padecer ELA familiar, como se define en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en la mejora de la coordinación motora en un sujeto que padece ELA familiar, como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, la composición farmacéutica consiste en fasudil.

Igualmente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en la mejora de la coordinación motora en un sujeto propenso a padecer ELA familiar, como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, la composición farmacéutica consiste en fasudil.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un derivado de fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en la mejora de la coordinación motora en un sujeto que padece ELA familiar, como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, la composición farmacéutica consiste en dicho derivado de fasudil. El derivado de fasudil es 1-(1-hidroxil-5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina (hidroxil-fasudil) o (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolinil)sulfonil]hexahidro-1*H*-1,4-diazepina (dimetil-fasudil).

Igualmente, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un derivado de fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en la mejora de la coordinación motora en un sujeto propenso a

padecer ELA familiar. Preferiblemente, la composición farmacéutica consiste en dicho derivado de fasudil. El derivado de fasudil es 1-(1-hidroxil-5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina (hidroxil-fasudil) o (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolinil)sulfonil]hexahidro-1*H*-1,4-diazepina (dimetil-fasudil).

5 Por tanto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende o consiste en 1-(5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina (fasudil) o un derivado de fasudil seleccionado de 1-(1-hidroxil-5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina (hidroxil-fasudil) y (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolinil)sulfonil]hexahidro-1*H*-1,4-diazepina (dimetil-fasudil), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para el uso en la mejora de la coordinación motora en un sujeto que padece o es propenso a padecer ELA familiar, como se define en las reivindicaciones.

10 Con respecto a cualquier aspecto descrito en la presente memoria, la ELA familiar, es la ELA de fase temprana diagnosticable por los criterios de diagnóstico de Awaji-shima, y la administración de dicha composición se inicia presintómicamente. La composición farmacéutica es particularmente eficaz si el sujeto es una hembra. Preferiblemente, la composición farmacéutica se debe administrar por vía oral. Se prefiere además que el fasudil sea administrado al sujeto en una dosificación de 1-12 mg/kg de peso al día, preferiblemente en una dosificación de 1,25-8 mg/kg de peso al día, tal como en una dosificación de 1,5-6 mg/kg de peso al día, más preferiblemente en una dosificación de 1,75-5 mg/kg de peso al día, incluso más preferiblemente en una dosificación de 2-4 mg/kg de peso al día, y lo más preferiblemente en una dosificación de 2,4-3,6 mg/kg de peso al día. En contraste con esto, el derivado de fasudil se debe administrar preferiblemente al sujeto en una dosificación de 10-1200 ng/kg de peso al día, preferiblemente en una dosificación de 12,5-800 ng/kg de peso al día, tal como en una dosificación de 15-600 ng/kg de peso al día, más preferiblemente en una dosificación de 17,5-500 ng/kg de peso al día, incluso más preferiblemente en una dosificación de 20-400 ng/kg de peso al día, y lo más preferiblemente en una dosificación de 24-360 ng/kg de peso al día. Preferiblemente, la composición farmacéutica se formula como una formulación de liberación sostenida o de liberación prolongada. Por ejemplo, una mejora de la coordinación motora en un sujeto se puede determinar de acuerdo con la escala de clasificación funcional de la ELA. El objeto que no está abarcado por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención.

#### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende o que consiste en 1-(5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina (fasudil) o un derivado de fasudil seleccionado de 1-(1-hidroxil-5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina (hidroxil-fasudil) y (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolinil)sulfonil]hexahidro-1*H*-1,4-diazepina (dimetil-fasudil), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de un sujeto que padece o es propenso a padecer ELA familiar, como se define en las reivindicaciones.

El fasudil, el hidroxil-fasudil y el dimetil-fasudil son conocidos en la técnica y están descritos, por ejemplo, en el documento US 4.678.783. El fasudil y el derivado de fasudil se pueden usar en sus formas libres o como sus sales. La sal es una sal no tóxica que es farmacológicamente aceptable y se puede formar por adición de un ácido. Como ejemplos del ácido, se pueden mencionar ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico y ácido sulfúrico, y ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico y ácido metanosulfónico. Preferiblemente, la sal es un hidrocloreto, hidrocloreto hemihidrato, hidrocloreto hidrato, hidrocloreto trihidrato, fosfato monobase, fosfato dibase, fosfato, hidrogenosulfato, sulfato, mesilato, etilsulfonato, maleato, fumarato o tartrato. Más preferiblemente, el fasudil o derivado de fasudil está en forma de un hidrocloreto, hidrocloreto hemihidrato o hidrocloreto hidrato, como, por ejemplo, se ha descrito en los documentos EP 1110553 y US 5.942.505. Además, el fasudil y sus derivados se pueden usar en forma de sus metabolitos activos formados *in vivo*. Dichos metabolitos activos son conocidos en la técnica. Más preferiblemente, el fasudil o su derivado están en forma de un hidrocloreto. La composición farmacéutica puede comprender fasudil, un derivado de fasudil o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Alternativamente, la composición farmacéutica puede consistir en fasudil, un derivado de fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables como el único agente activo. Sin embargo, la composición farmacéutica puede comprender además otros agentes auxiliares, tales como cargas, disolventes y estabilizantes, tales como conservantes, así como agentes de puesta en suspensión y/o dispersantes.

La administración de la composición farmacéutica se puede efectuar o administrar por diferentes vías, por ejemplo, enteral, oral (por ejemplo, píldora, comprimido (bucal, sublingual, oral, desintegrante, cápsula, película delgada, solución o suspensión líquida, polvo, cristales sólidos o líquido), rectal (por ejemplo, supositorio, enema), por inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica), por inhalación (por ejemplo, intrabronquial), tópica, vaginal, epicutánea o intranasal. En una realización, la composición se administra por inyección, en particular por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intradérmica; más particularmente la composición se administra por vía intravenosa. Por consiguiente, la composición farmacéutica puede estar en forma de una solución inyectable, supositorio, pulverización nasal, implante de liberación gradual, parche transdérmico, o similar. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas, estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloru-

ro de sodio, aceites de Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes y similares.

- 5 La formulación inyectable puede presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, o en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, incluyendo aunque sin limitación, agua estéril exenta de pirógenos, tampón, solución de Ringer o solución de dextrosa, antes de su uso. Para administración transdérmica, la formulación farmacéutica puede estar en forma de un disco o parche adhesivo, que libera lentamente el ingrediente activo para absorción percutánea. Opcionalmente, dichas formulaciones farmacéuticas para administración transdérmica se pueden formular junto con potenciadores de permeación, que se pueden usar para facilitar la penetración transdérmica. Para las vías de administración rectal y vaginal, los ingredientes activos se pueden formular como pomadas, soluciones o supositorios. Para administración bucal, la composición farmacéutica puede tener forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional. Sin embargo, la composición farmacéutica también se puede formular para administración por inhalación, por ejemplo en forma de un envase presurizado o nebulizador. En caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar por medio de una unidad dosificadora, usando un agente propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contenga una mezcla en polvo del agente activo y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón. Sin embargo, más preferiblemente, la composición farmacéutica se administra por vía oral, por ejemplo, en forma de un comprimido o cápsula. La composición farmacéutica para administración oral se puede formular con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón-glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato sódico), y pueden recubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral, tales como soluciones, jarabes o suspensiones, se pueden preparar con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de puesta en suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o de propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes.

- Preferiblemente, el fasudil, el derivado de fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se formula como una formulación con liberación sostenida o liberación prolongada con el fin de proporcionar una alargada semivida en plasma y evitar variaciones en la concentración plasmática entre la dosificación y la biodisponibilidad eventualmente potenciada del fármaco. Para un suministro prolongado, la composición farmacéutica se puede formular como una preparación de depósito, para administración por implantación; por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica o intramuscular. Así, por ejemplo, la composición farmacéutica se puede formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble. En la técnica se conocen formulaciones con liberación sostenida o liberación prolongada de fasudil o de un derivado de fasudil, en particular para administración oral, por ejemplo a partir del documento WO 2005/117896. La composición farmacéutica se puede proporcionar en un envase, tal como un envase blíster, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias, y que puede ir acompañado de instrucciones para su administración.

- El sujeto puede ser un mamífero, tal como ratón, rata, cobaya, perro, gato, cerdo, oveja, caballo o vaca. Preferiblemente, el sujeto es un primate, y lo más preferiblemente un ser humano. Como se puede deducir del apartado experimental, la invención es preferiblemente eficaz en hembras. Por consiguiente, en una realización preferida de la invención, el sujeto es una hembra.

- La ELA puede ser una ELA esporádica. Como derivable del término "esporádica", dicho tipo de ELA es raro y con una incidencia dispersa y por tanto sin patrones. Sin embargo, la ELA también puede ser ELA familiar, cuando el sujeto está genéticamente predispuesto a desarrollar la ELA. Los siguientes genes han sido asociados al desarrollo de la ELA: Dominante autosómico: ALS-1, *Ch 21q, SOD1*; ALS-2, *Ch 18q21*; ALS-4, *Ch 9q34, Senataxin*; ALS-6, *Ch 16p11, FUS*; ALS-7, *Ch 20p*; ALS-9, *Ch 20q13, VAPB*; ALS-9, *Ch 14q11, Angiogenin*; ALS-10, *Ch 1p36, TARDBP*; ALS-11, *Ch 6q21, mutaciones FIG4*; ALS-12, *Ch 10p15, variantes o mutaciones Optineurin*; *Ch 12q24, mutación D-aminoácido-oxidasa*; *Ch 9p13, mutaciones VCP*; ALS-FTLD, *Ch 9q21, gen desconocido*. Recesivo autosómico: ALS-2, *Ch 2q33, Alsin*; ALS-5, *Ch 15q21, Spatacsin*; ALS-12, *10p15, Optineurin*. Para una revisión, véase de *Carvalho & Swash* (2011). Los sujetos que se sospecha que tienen o desarrollan ELA son comúnmente citados aquí como sujetos propensos a padecer ELA. Como se muestra en los ejemplos, es ventajoso iniciar el tratamiento de ELA de acuerdo con la presente invención tan pronto como sea posible. Por tanto, el tratamiento que usa la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se inicia presintómicamente. Este puede ser el caso si se sospecha que el sujeto tiene ELA, aunque no se pueda sacar una conclusión final, o si el sujeto es propenso a padecer ELA.

La ELA es difícil de diagnosticar, aunque está documentado que ciertos biomarcadores están correlacionados con la ELA (véase, *Carvalho & Swash* (2011), apartado titulado "*Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis*"). La ELA pro-

voca debilidad muscular y atrofia en todo el cuerpo causada por la degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores. Los síntomas más tempranos de la ELA son típicamente debilidad obvia y/o atrofia muscular. Otros síntomas presentes incluyen fasciculación muscular (contracción), calambre o rigidez de los músculos afectados; debilidad muscular que afecta a un brazo o una pierna; y/o balbuceo y voz gangosa. Las partes del cuerpo afectadas por los síntomas tempranos de la ELA dependen de qué neuronas motoras del cuerpo se lesionen en primer lugar. Los pacientes con la forma inicial en las piernas pueden presentar torpeza al andar o correr o se puede observar que tropiezan o dan un traspie, a menudo con un "pie caído" que arrastran suavemente por el suelo. Los pacientes con iniciación en los brazos pueden experimentar dificultades en las tareas que requieran destreza manual, tales como abotonar una camisa, escribir o girar una llave en una cerradura. De hecho, la presencia de los signos en las neuronas motoras superior e inferior en una sola extremidad es altamente sugerente de la ELA. La electromiografía (EMG) es una técnica especial que detecta la actividad eléctrica en los músculos, y ciertos hallazgos en la EMG pueden apoyar el diagnóstico de la ELA.

El uso de datos electrofisiológicos en el diagnóstico de la ELA se revisó en una conferencia de consenso celebrada en Awaji-shima, Japón, en 2006. Se recomendó que los hallazgos electrofisiológicos fueran considerados equivalentes a la evaluación clínica en el reconocimiento de la menor implicación de las neuronas motoras. Además, en el contexto de un diagnóstico clínico sospechoso de ELA, los potenciales de fasciculación (PF) deben ser considerados equivalentes a los potenciales de fibrilación (fib) y a las ondas agudas positivas (sw) en el reconocimiento de la des-nervación, en particular en los músculos fuertes de las extremidades y en los músculos inervados craneales. Por último, se hizo hincapié en la importancia de buscar inestabilidad en los potenciales de fasciculación y en los potenciales de unidad motora (PUM) en la ELA. No se modificaron los criterios topográficos tempranos establecidos en los criterios de El Escorial. Las recomendaciones de consenso de Awaji-shima para la aplicación de ensayos electrofisiológicos al diagnóstico de la ELA son las siguientes:

1. Principios (a partir de los criterios de Airlie House)

El diagnóstico de la esclerosis lateral amiotrófica [ELA] requiere:

(A) la presencia de: (1) evidencia de la *degeneración de la neurona motora inferior* (NMI) por examen clínico, electrofisiológico o neuropatológico; (2) evidencia de la *degeneración de la neurona motora superior* (NMS) por examen clínico; y (3) propagación progresiva de síntomas o signos dentro de una región o a otras regiones, según lo determinen el historial, el examen físico o los ensayos electrofisiológicos;

(B) la ausencia de (1) *evidencia electrofisiológica o patológica de otros procesos patológicos* que pudieran explicar los signos de la degeneración de NMI y/o NMS, y (2) la *evidencia por neuroimagen de otros procesos patológicos* que pudieran explicar los signos clínicos y electrofisiológicos observados.

2. Criterios de los diagnósticos

La *ELA clínicamente definida* se define por evidencia *clínica o electrofisiológica* por la presencia de signos de NMI y/o NMS en la región bulbar y al menos dos regiones medulares o la presencia de signos de NMI y NMS en tres regiones medulares.

La *ELA clínicamente probable* se define por la evidencia *clínica o electrofisiológica* por los signos de NMI y NMS en al menos dos regiones con algunos signos de NMS necesariamente rostrales (por encima) de los signos de NMI.

La *ELA clínicamente posible* se define cuando los signos *clínicos o electrofisiológicos* de la disfunción de NMS y NMI se encuentran en una sola región; o los signos de NMS se encuentran solos en dos o más regiones; o los signos de NMI se encuentran rostrales respecto a los signos de NMS. Se habrán realizado estudios de neuroimagen y de laboratorio clínico y se habrán excluido otros diagnósticos.

Los criterios para la detección del cambio neurogénico por electromiografía (EMG) de aguja en el diagnóstico de la ELA son los siguientes:

1. Para la evaluación de la enfermedad de la NMI en la ELA en cualquier región del cuerpo dada, las anomalías clínicas y electrofisiológicas tienen igual importancia en el diagnóstico.

2. Se deben encontrar las características de la EMG del cambio neurogénico crónico, por ejemplo:

- a. PUM de amplitud aumentada y duración aumentada, usualmente con un aumento en el número de fases, evaluados por estudios cualitativos o cuantitativos.
- b. Disminución del reclutamiento de unidades motoras, definido por la activación rápida de un número reducido de unidades motoras. En las extremidades afectadas por características clínicas de anomalías significativas de NMS, no se puede lograr una activación rápida.
- c. Utilizando un filtro de paso de banda estrecha (500 Hz a 5 kHz) se observarán PUM inestables y complejos en la mayoría de los casos de ELA.

3. En la ELA se registran usualmente fibrilaciones-ondas agudas positivas (fib-sw) en músculos fuertes, no inutilizados.

4. En presencia de un cambio neurogénico crónico en la EMG de aguja en la ELA, los potenciales de fasciculación (PF), preferiblemente de morfología compleja, son equivalentes a fibrilaciones y ondas agudas positivas (fib-sw) en su significación clínica.

*PF complejos*: una característica de aumento de la duración, polifásica (> 4 fases) o aumento de la amplitud en comparación con los valores normales de los PUM en el músculo estudiado. Los PF complejos pueden ser inestables.

*Fib-sw*: (definición de AANEM) duración < 5 ms, amplitud < 1 mV, frecuencia de descarga 1-50 Hz.

*PUM inestables*: utilizar ajuste de filtro de paso de banda bajo > 500 Hz; superponer la secuencia de descargas consecutivas de la unidad motora y buscar mayor inestabilidad (sacudida) y bloqueo de impulsos.

*Cambio neurogénico crónico*: los PUM son de mayor duración, mayor amplitud, y con frecuencia fases aumentadas. Un patrón de interferencia disminuido caracterizado por el aumento de la velocidad de activación de las unidades motoras restantes, y un aumento de la amplitud de envolvente del patrón de interferencia.

Otros trastornos pueden ser excluidos por estudios de conducción nerviosa, en los que los siguientes son compatibles con la ELA:

- Amplitud normal del potencial de acción de los nervios sensitivos (PANS) y velocidades de conducción (VC) sensorial en ausencia de atrapamiento concomitante u otras neuropatías. Son aceptables amplitudes del PANS y VC ligeramente reducidas en presencia de neuropatía de etiología identificada.

- VC motora > 75% del límite inferior del valor normal y latencia de la onda F mínima <130% del límite superior del valor normal.

- Latencia y duración del potencial de acción muscular compuesto (PAMC) distal < 150% del valor normal.

- Ausencia de bloqueo de conducción (BC) y de la dispersión temporal patológica, como es definido por la reducción del área del PAMC negativo básico en la estimulación próxima frente a la distal > 50%, cuando la amplitud máxima del PAMC negativo básico distal sea lo suficientemente grande como para permitir dicha evaluación (generalmente > 1 mV). La duración máxima del PAMC negativo próximo <30% del valor distal sugiere un BC.

La utilidad de la revisión de Awaji-shima de los criterios de diagnóstico de Airlie House ha sido probada con éxito en varios estudios, en los que se encontró que la sensibilidad del diagnóstico mejoró cuando se aplicaron los criterios de Awaji-shima, sin pérdida de especificidad. La utilización de los criterios de Awaji-shima permite un diagnóstico precoz de la ELA, y por tanto un tratamiento temprano de la ELA. Para una revisión, véase de Carvalho et al. (2008). El experto en la técnica sabe cómo realizar estos ensayos. Como se muestra en el apartado experimental, el tratamiento con fasudil y/o un derivado de fasudil parece ser más eficaz si la ELA se encuentra en una fase temprana, es decir, antes o cuando se detectan los primeros signos electrofisiológicos, que son predictivos de la ELA. Por tanto, la presente invención es particularmente útil si el sujeto es diagnosticado por sospechas de ELA o posible ELA. La invención es particularmente útil si la ELA familiar es ELA en fase temprana diagnosticable por los criterios de diagnóstico de Awaji-shima, en particular detectable por EMG de aguja, más particularmente detectable por características de EMG de cambio neurogénico crónico, como se ha definido en el punto 2 anterior, más preferiblemente por las características de EMG de cambio neurogénico crónico como se ha definido en el punto 2a, punto 2b, punto 2c, puntos 2a y 2b, puntos 2a y 2c, puntos 2b y 2c, o puntos 2a y 2b y 2c. Aunque podría ser útil, en el contexto de la presente invención no es absolutamente necesario excluir otros trastornos.

En el apartado experimental, los inventores controlaron las cantidades de bebida de los ratones, que se determinaron que eran 0,2 mL/g de peso/día antes del inicio del tratamiento. Para alcanzar niveles suficientes en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de fasudil, los inventores administraron fasudil (LC Labs, Woburn, EE.UU.; número de producto F-4660) a una concentración baja de 15 mg (Fas30) o a una concentración alta de 50 mg (Fas100) en 100 mL de agua para beber. Los grupos de control recibieron la cantidad respectiva de agua para beber isotónica denominada vehículo (Veh). Por consiguiente, los ratones recibieron una dosificación de 0,2 mL/g de peso/día x (15 mg/100 mL) = 0,03 mg/g de peso = 30 mg/kg de peso (Fas30); y 0,2 mL/g de peso/día x (50 mg/100 mL) = 100 mg/kg de peso (Fas100), respectivamente.

El traslado de la dosis de un animal a otro animal o de un animal a estudios humanos es bien conocido en la técnica, véase Reagan-Shaw et al. (2007), en particular la Figura 1 y la Tabla 1. Por consiguiente, la dosis humana equivalente (DHE, mg por kg de peso) se puede calcular como sigue:  $DHE (mg/kg) = Dosis animal (mg/kg) \times (Km animal/Km humano)$ . El factor  $Km$ , el peso (kg) dividido por la superficie corporal ( $SC; m^2$ ), se utiliza para convertir la dosis en mg/kg utilizada en un estudio en una dosis en  $mg/m^2$ . Se dan a continuación los valores de  $Km$  ilustrativos basados en los cálculos medios de la  $SC$  sobre los datos del Proyecto de Directrices de la FDA.

Especie	Peso (kg)	SC (m <sup>2</sup> )	Factor Km
Humana			
Adulto	60	1,6	37
Niño	20	0,8	25
Babuino	12	0,6	20
Perro	10	0,5	20
Mono	3	0,24	12
Conejo	1,8	0,15	12
Cobaya	0,4	0,05	8
Rata	0,15	0,025	6
Hámster	0,08	0,02	5
Ratón	0,02	0,007	3

5 En vista de los datos experimentales dados a continuación, si la composición farmacéutica comprende o consiste en fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, el fasudil se debe administrar al sujeto en una dosificación de 1-12 mg/kg de peso al día, preferiblemente en una dosificación de 1,25-8 mg/kg de peso al día. No obstante, se pudo demostrar que el tratamiento con Fas30 fue particularmente eficaz. Por consiguiente, en una realización preferida, el fasudil se debe administrar en una dosificación de 1,5-6 mg/kg de peso al día, preferiblemente en una dosificación de 1,75-5 mg/kg de peso al día, más preferiblemente en una dosificación de 2-4 mg/kg de peso al día, y más preferiblemente en una dosificación de 2,4-3,6 mg/kg de peso al día.

10 Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender o consistir en un derivado de fasudil, en particular seleccionado de hidroxil-fasudil y dimetil-fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Se sabe en la técnica que el efecto de derivados de fasudil, tales como hidroxil-fasudil y dimetil-fasudil, es de 10 a 100 veces mayor en comparación con el fasudil. Basándose en los datos de fasudil, se prefiere por tanto que el derivado de fasudil se administre en una dosificación de 1/10 - 1/100 de la del fasudil. En particular, se prefiere que el derivado de fasudil se administre al sujeto en una dosificación de 10-1200 ng/kg de peso al día, preferiblemente en una dosificación de 12,5-800 ng/kg de peso al día, tal como en una dosificación de 15-600 ng/kg de peso al día, más preferiblemente en una dosificación de 17,5-500 ng/kg de peso al día, incluso más preferiblemente en una dosificación de 20-400 ng/kg de peso al día, y lo más preferiblemente en una dosificación de 24-360 ng/kg de peso al día. El régimen de dosificación real será determinado por el médico y por los factores clínicos. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, la superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que estén siendo administrados simultáneamente.

20 Además, se pudo demostrar que el fasudil es capaz de mejorar la coordinación motora en un sujeto que padece ELA, o en un sujeto propenso a padecer ELA. A la vista de este hallazgo, es plausible que se pueda lograr el mismo efecto ventajoso con una sal farmacéuticamente aceptable de fasudil, o con un derivado de fasudil, por ejemplo con hidroxil-fasudil o dimetil-fasudil, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho derivado.

25 Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende o consiste en fasudil, o un derivado de fasudil seleccionado de hidroxil-fasudil y dimetil-fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en un método para mejorar la coordinación motora en un sujeto que padece o es propenso a padecer ELA familiar, comprendiendo dicho método la administración a un sujeto, de una composición farmacéutica, que comprende o consiste en fasudil, o un derivado de fasudil seleccionado de hidroxil-fasudil y dimetil-fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, como se define en las reivindicaciones.

30 Las realizaciones preferidas de acuerdo con este aspecto adicional son idénticas a las realizaciones preferidas del primer aspecto y se aplican igualmente. En particular, se prefiere que la ELA familiar sea la ELA en fase temprana



diagnosticable por los criterios de diagnóstico de Awaji-shima, como se ha definido anteriormente. Además, la administración de la composición farmacéutica se inicia presintómicamente y el sujeto es preferiblemente una hembra. Aunque la composición farmacéutica se puede administrar por diversas vías, se prefiere particularmente que la composición farmacéutica se administre por vía oral. Respecto a la dosificación, si la composición farmacéutica comprende o consiste en fasudil, se prefiere que el fasudil se administre al sujeto en una dosificación de 1-12 mg/kg de peso al día, preferiblemente en una dosificación de 1,25-8 mg/kg de peso al día, tal como en una dosificación de 1,5-6 mg/kg de peso al día, más preferiblemente en una dosificación de 1,75-5 mg/kg de peso al día, incluso más preferiblemente en una dosificación de 2-4 mg/kg de peso al día, y más preferiblemente en una dosificación de 2,4-3,6 mg/kg de peso al día. Alternativamente, si la composición farmacéutica comprende o consiste en un derivado de fasudil, tal como hidroxil-fasudil o dimetil-fasudil, dicho derivado se administra al sujeto en una dosificación de 10-1200 ng/kg de peso al día, preferiblemente en una dosificación de 12,5-800 ng/kg de peso al día, tal como en una dosificación de 15-600 ng/kg de peso al día, más preferiblemente en una dosificación de 17,5-500 ng/kg de peso al día, incluso más preferiblemente en una dosificación de 20-400 ng/kg de peso al día, y más preferiblemente en una dosificación de 24-360 ng/kg de peso al día. Finalmente, se prefiere además que el fasudil, el derivado de fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se formulen como una formulación con liberación sostenida o liberación prolongada, como se ha descrito anteriormente.

La mejora de la coordinación motora en un sujeto se puede determinar de acuerdo con una puntuación definida por la escala de clasificación funcional de la ELA, revisada de acuerdo con Cedarbaum 1999 (Cedarbaum, Stambler et al., 1999):

- 20 1. *Habla*: Procesos normales del habla (4); Alteración detectable del habla (3); Inteligible con repeticiones (2); Habla combinada con comunicación no vocal (1); Pérdida del habla útil (0)
2. *Salivación*: Normal (4); Ligera pero cierto exceso de saliva en la boca, puede presentar babeo nocturno (3); Saliva moderadamente excesiva, puede presentar babeo mínimo (2); Exceso marcado de saliva con algo de babeo (1); Babeo marcado, requiere pañuelo constante
- 25 3. *Deglución*: Hábitos alimentarios normales (4); Problemas alimentarios tempranos - asfixia ocasional (3); Cambios en la consistencia dietética (2); Necesidad de alimentación suplementaria por tubos (1); *Nil per os* (NPO) - alimentación exclusivamente parenteral o enteral (0)
4. *Escritura manual*: Normal (4); Lenta o descuidada - todas las palabras son legibles (3); No todas las palabras son legibles (2); Capaz de coger la pluma pero incapaz de escribir (1); Incapaz de coger la pluma (0)
- 30 5. *Corte de alimentos y manipulación de utensilios*:
  - a. Pacientes sin gastrostomía: Normal (4); Algo lentos y torpes, pero no necesitan ayuda (3); Pueden cortar la mayoría de los alimentos, aunque torpes y lentos, necesitan alguna ayuda (2); La comida debe ser cortada por alguien, pero todavía pueden alimentarse lentamente (1); Necesitan ser alimentado (0)
  - 35 b. Pacientes con gastrostomía: Función normal (4); Torpes pero capaces de realizar independientemente todas las manipulaciones (3); Necesitan algo de ayuda con cierres y cremalleras (2); Necesitan una mínima asistencia del cuidador (1); Incapaces de realizar ningún aspecto de las tareas (0)
6. *Aseo e higiene*: Función normal (4); Cuidado personal independiente y completo con esfuerzo o disminución de la eficacia (3); Asistencia intermitente o métodos sustitutivos (2); Necesidad de atención para el cuidado personal (1); Dependencia total (0)
- 40 7. *Giro en la cama y ajuste de la ropa de cama*: Normal (4); Algo lento y torpe, pero no necesita ayuda (3); Puede girar solo o ajustar las sábanas, pero con gran dificultad (2); Puede iniciar los movimientos, pero sin girar ni ajustar las sábanas solo (1); Incapaz (0)
8. *Andar*: Normal (4); Dificultades tempranas de deambulación (3); Paseos con asistencia (2); Movimiento funcional no ambulatorio (1); Movimiento de las piernas sin finalidad (0)
- 45 9. *Subida de escaleras*: Normal (4); Lento (3); Ligera inestabilidad o fatiga (2); Necesidad de asistencia (1); No puede hacerlo (0)
10. *Disnea*: Ninguna (4); Ocurre cuando anda (3); Ocurre con uno o más de las siguientes funciones: comer, bañarse, vestirse (2); Ocurre en reposo, dificultad respiratoria cuando se sienta o se tumba (1); Dificultad significativa, a pesar del uso de un soporte respiratorio mecánico (0)
- 50 11. *Ortopnea*: Ninguna (4); Algunas dificultades para dormir por la noche debido a problemas respiratorios, no usando habitualmente más que dos almohadas (3); Necesita almohadas extra para dormir (más de dos) (2); Sólo puede dormir sentado (1); Incapaz de dormir (0)

12. *Insuficiencia respiratoria*: Ninguna (4); Uso intermitente de BiPAP (3); Uso continuo de BiPAP durante la noche (2); Uso continuo de BiPAP durante la noche y el día (1); Ventilación mecánica invasiva por intubación o traqueotomía (0)

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren adicionalmente la invención.

5 **Descripción de las figuras**

**Figura 1:** Gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier para el comienzo de una enfermedad neurológica sintomática en ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados desde el día 50 (d50) (A) o desde el día 80 (d80) (B) diferenciados por sexos. Vehículo (VEH): línea continua; Fas30: línea discontinua; Fas100: línea de puntos.

10 **Figura 2:** Gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier para la edad de muerte en ratones SOD1<sup>G93A</sup>. VEH: línea continua; Fas30: línea discontinua; Fas100: línea de puntos.

**Figura 3:** Gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier para la edad de muerte en ratones SOD1<sup>G93A</sup> machos y hembras tratados presintómicamente y sintómicamente. VEH: línea continua; Fas30: línea discontinua; Fas100: línea de puntos.

15 **Figura 4:** Duración de la enfermedad para ratones SOD1<sup>G93A</sup> machos y hembras tratados presintómicamente y sintómicamente. VEH: línea continua; Fas30: línea discontinua; Fas100: línea de puntos.

**Figura 5:** Gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier para comportamiento en la prueba del cilindro giratorio durante 180 segundos en ratones SOD1<sup>G93A</sup> machos y hembras tratados presintómicamente y sintómicamente. VEH: línea continua; Fas30: línea discontinua; Fas100: línea de puntos.

20 **Figura 6:** Gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier para comportamiento en la prueba del colgamiento en alambre durante 180 segundos en ratones SOD1<sup>G93A</sup> machos y hembras tratados presintómicamente y sintómicamente. VEH: línea continua; Fas30: línea discontinua; Fas100: línea de puntos.

**Figura 7:** Recuento medio de motoneuronas positivas a colina-acetil-transferasa (ChAT) en el corte lumbar de la médula espinal para ratones SOD1<sup>G93A</sup> machos y hembras tratados presintómicamente el día 100.

25 **Figura 8:** Ejemplo de la medida del tamaño de la zona del cuerpo celular de motoneuronas positivas a ChAT en el corte lumbar de la médula espinal en ratones SOD1<sup>G93A</sup> hembras el día 100.

**Figure 9:** Diferenciación de motoneuronas positivas a ChAT por intervalo de tamaños en ratones SOD1<sup>G93A</sup> hembras el día 100. De izquierda a derecha cada intervalo de tamaños: wt = ratones de tipo natural; tg Veh = ratones transgénicos tratados con vehículo; tg Fas30 = ratones transgénicos tratados con Fas30.

**Figura 10:** Tamaño celular acumulativo en el corte del asta anterior en ratones SOD1<sup>G93A</sup> hembras el día 100.

30 **Figura 11:** (a): Recuento medio de motoneuronas (MN) positivas a ChAT en el corte lumbar de la médula espinal para ratones SOD1<sup>G93A</sup> machos y hembras tratados presintómicamente en el momento de su muerte. (b): Recuento medio de motoneuronas positivas a ChAT en el corte lumbar de la médula espinal para ratones SOD1<sup>G93A</sup> machos y hembras tratados presintómicamente y sintómicamente en el momento de su muerte. De izquierda a derecha: Veh; Fas30; Fas100.

35 **Figura 12:** Astrocitosis en ratones transgénicos SOD<sup>G93A</sup> tratados con control de vehículo (1A - 3A), Fas30 (1B - 3B) o Fas100 (1C - 3C), con control de marcaje inmunohistoquímico (IHC) sin anticuerpo primario (1D - 3D). 1A-D: Cortes axiales de la médula espinal en contraste de fases (visión de conjunto). 2A-D: Cortes axiales de la médula espinal marcados con GFAP/Cy2 (visión de conjunto) [GFAP es la abreviatura en inglés de *Glial Fibrillary Acidic Protein* = proteína gliofibrilar ácida]. Las inserciones correspondientes del asta anterior se presentan con mayor aumento en 3A-D, las líneas discontinuas marcan el borde del asta anterior. La barra de escala en 2 y 3 es 200 μm.

40 **Figura 13:** Astrocitos positivos a la GFAP por 0,2 mm<sup>2</sup> en el asta anterior de la médula espinal lumbar en ratones SOD1<sup>G93A</sup> hembras de tipo natural (wt) y transgénicos (tg) tratados presintómicamente el día 100.

**Figura 14:** Números de astrocitos positivos a GFAP por 0,2 mm<sup>2</sup> del asta anterior de la médula espinal lumbar en ratones SOD1<sup>G93A</sup>.

45 **Figura 15:** Número de axones totales en el nervio ciático de ratones SOD1<sup>G93A</sup> hembras el día 100.

**Figura 16:** Número de axones totales en el nervio ciático de ratones SOD1<sup>G93A</sup> hembras el día 100 diferenciados por intervalo de tamaños. De izquierda a derecha cada intervalo de tamaños: wt; tg Veh; tg Fas30.

50 **Figura 17:** Supervivencia de motoneuronas expuestas a ácido kaínico (abreviadamente en lo sucesivo KA, por la expresión inglesa *Kainic Acid*) en cultivos conjuntos de astrocitos-motoneuronas en condiciones de control y tratadas con fasudil.

**Figura 18:** Supervivencia de motoneuronas expuestas a KA en monocultivo en condiciones de control y tratadas con fasudil.

**Figura 19:** Gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier para la edad de muerte de ratones SOD1<sup>G93A</sup> machos y hembras tratados presintómicamente con Y-27632 (10 mg/kg de peso).

5 **Figura 20:** La infiltración de células microgliales inmunopositivas a Iba1 en el asta anterior de la médula espinal es modulada por inhibición de ROCK. (A) Número medio de microglías inmunopositivas a Iba1 por 0,5  $\mu\text{m}^2$  en el asta anterior de la medula espinal en ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados con vehículo, con Fas30 (fasudil 30 mg/kg/día) o con Fas100 (fasudil 100 mg/kg/día) en la fase final de la enfermedad; (B) Número medio de microglías inmunopositivas a Iba1 por 0,5  $\mu\text{m}^2$  en el asta anterior de la medula espinal en ratones de tipo natural (wt) tratados con vehículo y en  
10 ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados con vehículo o con Fas30 (fasudil 30 mg/kg/día) el día 100; (C, D) Imágenes representativas del marcaje inmunofluorescente de microglías positivas a Iba1 en el asta anterior de la médula espinal en la fase final (C) o el día 100 (D) (Iba1/Cy3 (rojo) y DAPI (azul)). La barra representa valores medios  $\pm$  error estándar de la media (SEM). n.s. = no significativo; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Barras de escala, 100  $\mu\text{m}$ .

15 **Figura 21:** Cambios activadores morfológicos de microglías en la médula espinal lumbar después de inhibición de ROCK. (A) Análisis cuantitativo del número relativo de células que pertenecen a tres subtipos morfológicos diferentes (delgadas ramificadas, gruesas ramificadas, redondeadas) de microglías inmunopositivas a Iba1 en ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados con vehículo, con Fas30 (fasudil 30 mg/kg/día) o con Fas100 (fasudil 100 mg/kg/día) en la fase final. (B) Análisis cuantitativo de la morfología de microglías como en (A) de ratones de tipo natural tratados con vehículo y ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados con vehículo o con Fas30 (fasudil 30 mg/kg/día) el día 100. (C) Imágenes  
20 microscópicas ilustrativas a gran aumento de tipos morfológicos de microglías analizados (Iba1/Cy3 (rojo), DAPI (azul)). La barra representa valores medios  $\pm$  error estándar de la media (SEM). n.s. = no significativo; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Barra de escala, 50  $\mu\text{m}$ .

**Figura 22:** Reducción de la liberación de citoquinas/quimioquinas microgliales por tratamiento combinado con LPS+fasudil.

## 25 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Materiales y métodos

##### *Animales*

30 Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las regulaciones del consejo local de investigación animal y la legislación del Estado de Baja Sajonia. Ratones B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J con alto número de copias del transgén se obtuvieron de Jackson Labs (Número de inventario 002726; Bar Harbor, EE.UU.) que habían sido producidos originalmente por Gurney et al. (Gurney, Pu et al., 1994). La colonia se mantuvo cruzando los machos C57BL/6 que albergaban el transgén con hembras SJL de tipo natural. Para verificar la presencia del transgén en la progenie F1, se recogieron biopsias de la cola de cachorros de 14 días y se genotiparon usando PCR. A la  
35 edad de 35 - 45 días se trasladaron los ratones a la instalación de ensayo para que se aclimataran al nuevo entorno con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad antes de ser asignados a un estudio.

##### *Grupos experimentales*

40 Ratones de 50 días (presintomáticos, d50) u 80 días (sintomáticos, d80) se separaron en grupos de tratamiento con fasudil-30 (Fas30) y fasudil-100 (Fas100) o de control con vehículo (Veh). Antes de cualquier tratamiento, se constituyeron grupos para minimizar la variabilidad entre los grupos usando los siguientes criterios. Los grupos se equilibraron respecto al sexo y al peso dentro del sexo. Además, los grupos tenían la misma edad y eran de la misma camada. Cada macho y hembra en el grupo de tratamiento tenía un macho y hembra correspondiente en el grupo de control con vehículo. El estudio fue ciego para el observador.

##### *Tratamientos*

45 Antes del inicio del tratamiento, los inventores controlaron las cantidades de bebida de los ratones, que se determinaron que eran 0,2 mL/g de peso/día. Para alcanzar niveles suficientes en LCR de fasudil, los inventores administraron fasudil (LC Labs, Woburn, EE.UU.; número de producto F-4660) a una concentración baja de 15 mg (Fas30) o a una concentración alta de 50 mg (Fas100) en 100 mL de agua para beber. Los grupos de control recibieron la cantidad respectiva de agua para beber isotónica denominada vehículo (Veh). El análisis del LCR después de punción  
50 sub-occipital de la cisterna magna demostró que fasudil atravesó fácilmente la barrera hematoencefálica (datos no presentados).

El tratamiento oral crónico con una dosis baja de fasudil (F30) o una dosis alta de fasudil (F100) se inició presintómicamente el día 50 o sintómicamente el día 80 y continuó hasta la muerte.

##### *Control de la progresión de la enfermedad*

*Puntuación neurológica.* Las puntuaciones neurológicas se evaluaron cada tres días para cada ratón a partir de una edad de 50 días. La puntuación neurológica empleó una escala de 0 a 4 que había sido desarrollada anteriormente en pruebas en ratones con ELA. Los *criterios de puntuación* utilizados para asignar cada nivel de puntuación fueron:

5 4 Extensión completa de las patas traseras desde la línea media lateral cuando el ratón está suspendido por su cola, y el ratón puede mantenerse en dicha posición durante 2 segundos, operación realizada 2-3 veces.

3 Colapso o colapso parcial de la extensión de las patas hacia la línea media lateral (debilidad) o temblor de las patas traseras durante la suspensión por la cola.

2 Los dedos se doblan al menos dos veces durante el recorrido de 10 cm, o cualquier parte del pie es arrastrado a lo largo del fondo de la jaula/mesa.

10 1 Parálisis rígida o movimiento mínimo de las articulaciones, no utilizando el pie para andar hacia adelante.

0 El ratón no puede enderezarse en 30 segundos de ningún lado.

\* Si se alcanza el criterio de puntuación 2, se dejan bolitas de alimentos sobre el lecho y se coloca adicionalmente agua en un pocillo sobre el lecho.

15 *Peso.* El peso es un indicador sensible de cualquier malestar que pudiera resultar del tratamiento crónico con fármacos y del deterioro motor que se produzca durante la progresión de la enfermedad. Las mediciones del peso se registraron cada tres días para cada animal a partir de una edad de 50 días.

20 *Supervivencia.* Para cada ratón se registraron la fecha y causa de su muerte. Por razones humanitarias, los animales se controlaron atentamente y se sacrificaron cuando estaban moribundos antes de la muerte real usando criterios de agonía grave. Para determinar la duración de la supervivencia de manera fiable y humanitaria, se utilizó el estado moribundo, definido como la incapacidad de los ratones para enderezarse por sí mismos 30 segundos después de haber sido colocados sobre un lado (una puntuación neurológica de 4). A los ratones moribundos se les dio la puntuación de "muertos" y se sacrificaron usando dióxido de carbono.

*Duración de la enfermedad.* Este parámetro se seleccionó para analizar los efectos del tratamiento en una situación clínicamente relevante desde el momento de aparición de la enfermedad hasta la muerte.

25 *Inmunohistoquímica de cortes de la médula espinal, nervio ciático y músculo gastrocnemio*

30 Después de anestesia profunda, los ratones se perfundieron transcardialmente con solución de PBS seguida de paraformaldehído al 4%. Se extrajeron las médulas espinales, los nervios ciáticos y los músculos gastrocnemios. Las médulas espinales y los músculos gastrocnemios se postfijaron luego durante 2 horas en paraformaldehído al 4%. A continuación, el tejido se deshidrató en sacarosa al 30% durante una noche y se mantuvo a -20°C hasta tratamiento posterior. Se prepararon cortes en corona de la médula espinal lumbar (L3 - L6) (20 µm) y cortes horizontales del músculo tibial (35 µm) utilizando un criostato Leica y se recogieron en portaobjetos de vidrio recubiertos de gelatina.

35 En primer lugar se rehidrataron los *cortes de médula espinal* seleccionados para tratamiento inmunohistoquímico. Después se realizó la recuperación del antígeno durante 4 horas en TBS a 60°C para marcaje posterior con GFAP o Iba1 y durante 30 minutos en citrato de sodio (pH 9,0) a 80°C para marcaje posterior con ChAT. Después de lavado una vez en PBS, los cortes se incubaron a temperatura ambiente en PBS y 10% de suero de cabra normal para marcaje posterior con GFAP o en PBS y suero de burro normal al 5% para marcaje posterior con ChAT para bloquear las uniones no específicas. Los anticuerpos primarios (anti-ChAT 1:100, AB144 P, Millipore; anti-GFAP 1:200, DAKO; anti-Iba1 1:500, WAKO, Osaka, Japón) se aplicaron a 4°C durante una noche para GFAP y durante tres noches para ChAT. Los anticuerpos secundarios (Cy3 anti-cabra o Cy2/Dylight anti-conejo, ambos Dianova) se aplicaron sobre cortes separados 1:300 durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se realizó una contra-

40 tinción nuclear con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (Sigma-Aldrich) antes del montaje en Moviol (Hoechst, Frankfurt, Alemania).

45 Los *nervios ciáticos* se extrajeron por separado y se postfijaron durante 24 horas en paraformaldehído al 4%. Para su incrustación, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 3% en PBS durante 3 horas a 4°C, luego se postfijaron en óxido de osmio al 1% en PBS durante 1 hora a 4°C. Después de tres etapas de lavado, los nervios se incrustaron en Araldit y óxido de propileno con una relación primero de 1:1 y luego de 2:1, cada uno durante 35 minutos. Antes de colocarlo en un molde plano para secado y endurecimiento, el óxido de propileno tuvo que ser evaporado bajo una campana durante 1 hora. Los nervios ciáticos incrustados en bloques de Araldit se cortaron con un microtomo (Leica Ultracut) en cortes semifinos (380 nm) y se recogieron en portaobjetos de vidrio revestidos con gelatina. Luego se tiñeron con solución de Richardson (2:1:1 de solución de azul-2 al 1%, solución de azul de metileno al 2% y solución de bórax al 1% (Di-tetaborato de sodio-10-hidrato)). Después de lavar en agua destilada, las rodajas se secaron y montaron en Depex.

50

Los *cortes del músculo gastrocnemio* se rehidrataron y se realizó una permeabilización durante 2 horas a temperatura ambiente en PBS, seroalbúmina bovina exenta de proteasa y exenta de IgG al 5% (Jackson ImmunoResearch

Laboratories, Lote 91563), Triton X-100 al 0,5% (Molecular Sigma Biology, T-8787). Los anticuerpos primarios (anti-neurofilamento M de conejo, 1:1000, Millipore, AB1987; anti-VACHT de conejo, 1:1000, Sigma-Aldrich, V5387) se aplicaron juntos a 4°C durante una noche en BSA al 1%, Triton X-100 al 0,25%. Después de un lavado exhaustivo en PBS y BSA al 1%, se incubó el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 anticonejo, 1:300; A11034, Invitrogen Molecular Probes) con conjugado de  $\alpha$ -bungarotoxina con Alexa Fluor 594 (1:1000, B13423, Invitrogen Molecular Probes) durante 90 minutos en PBS, BSA al 1% a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes musculares se lavaron tres veces en PBS, una vez en agua y luego se montaron en Moviol (Hoechst, Frankfurt, Alemania).

#### *Evaluación cuantitativa de motoneuronas de la médula espinal, astroglias y microglías, axones del nervio ciático y unión neuromuscular (UNM)*

Con el fin de cuantificar el número de *motoneuronas* en criocortes en corona de la médula espinal lumbar (L3 - L6) primero se definió la zona del asta anterior de acuerdo con los criterios de Kong et al. (Kong and Xu 1998). Las células se contaron como motoneuronas si estaban localizadas en el asta anterior, tenían un nucleolo claramente identificable, tenían un tamaño de al menos 200  $\mu\text{m}^2$  y eran positivas al ChAT (Pitzer, Kruger et al., 2008). Se contaron al menos cinco cortes por médula espinal de ratón que estaban separados 100  $\mu\text{m}$  en una longitud de al menos 500  $\mu\text{m}$  aislados de la médula espinal lumbar. En el grupo de tratamiento d50 analizado al morir, se contaron un total de 20 ratones del grupo con vehículo (3 machos, 3 hembras), con Fas30 (3 machos, 3 hembras), con Fas100 (3 machos, 3 hembras) y de tipo natural (1 macho, 1 hembra). En el grupo de tratamiento d80 analizado al morir, se contó un total de 20 ratones del grupo con vehículo (3 machos, 3 hembras), con Fas30 (3 machos, 3 hembras) y con Fas100 (3 machos, 3 hembras) y de tipo natural (1 macho, 1 hembra). En el grupo de tratamiento d50 analizado el d100, se contó un total de 20 ratones del grupo con vehículo (3 machos, 3 hembras), con Fas30 (3 machos, 3 hembras), con Fas100 (3 machos, 3 hembras) y de tipo natural (1 macho, 1 hembra).

La *astrogliosis* y *microgliosis* se evaluaron por la cuantificación de células positivas a GFAP o Iba1 en el asta anterior de cortes de la médula espinal lumbar, respectivamente. De nuevo, se definió la zona del asta anterior y se contaron manualmente las células positivas a GFAP o Iba1. En el grupo de tratamiento d50 analizado al morir, se contaron un total de 20 ratones del grupo con vehículo (3 machos, 3 hembras), con Fas30 (3 machos, 3 hembras), con Fas100 (3 machos, 3 hembras) y de tipo natural (1 macho, 1 hembra). En el grupo de tratamiento d50 analizado el d100, se contaron un total de 20 ratones del grupo con vehículo (3 machos, 3 hembras), con Fas30 (3 machos, 3 hembras), con Fas100 (3 machos, 3 hembras) y de tipo natural (1 macho, 1 hembra).

Para la evaluación de la morfología de microglías se examinaron al menos 10 células por asta anterior elegidas aleatoriamente con un objetivo de 63 aumentos. Las células se clasificaron como "ramificadas delgadas", "ramificadas más gruesas" y "redondeadas" de acuerdo con una descripción morfológica reciente de Graeber et al. (Graeber, M. B. (2010) *Science* 330(6005): 783-788). Una célula ramificada se definió como una célula que tiene al menos 2 procesos que son al menos dos veces el tamaño del cuerpo celular. Se definieron como células ramificadas delgadas las que tenían un pequeño diámetro de ramificaciones (<0,5  $\mu\text{m}$ ) y un pequeño diámetro del soma celular (<5  $\mu\text{m}$ ). Se definieron como células gruesamente ramificadas las que tenían ramificaciones más gruesas (>0,5  $\mu\text{m}$ ) y un mayor diámetro del soma celular (> 5  $\mu\text{m}$ ). Se definieron como células redondas las que no presentaban procesos y tenían un aspecto redondo.

Los cortes semifinos de *axones del nervio ciático* se evaluaron a partir de imágenes de microscopía óptica para números axonales y tamaño de axoplasmas con el instrumento de recuento semiautomatizado y de medición de tamaños del programa informático Image J. En el grupo de tratamiento d50 analizado el d100, se contaron un total de 17 ratones hembras del grupo con vehículo (5), con Fas30 (7) y de tipo natural (5).

Con el fin de evaluar la integridad de UMJ, se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia, los cortes musculares, que habían sido marcados para las estructuras distales de inervación axonal y placa motora con anti-neurofilamento M/Alexa 488 y anti-VACHT/Alexa 488 y para placas motoras con  $\alpha$ -bungarotoxina/rodamina, respectivamente. Las placas motoras se puntuaron como "inervadas" si había solapamiento completo con el terminal del axón, o "desnervadas" si la placa motora no estaba asociada con un axón. Algunas uniones neuromusculares que solamente presentaban un axón preterminal, o solamente mostraban un solapamiento parcial entre la placa motora y el terminal, se denominaron "intermedias". Para cada músculo se evaluaron 4 cortes de su parte distal, media y próxima que tenían 140  $\mu\text{m}$  de separación de una longitud de al menos 560  $\mu\text{m}$  y contenían al menos 10 placas motoras por corte.

#### *Electrofisiología*

Las velocidades de conducción nerviosa (VCN) y los potenciales de acción muscular compuestos (PAMC) se determinaron a una edad de 100 días como se ha descrito previamente (Meyer zu Horste, Prukop et al., 2007). En resumen, los ratones se anestesiaron utilizando una inyección intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg), mientras que la temperatura corporal se mantuvo constante usando una placa de calentamiento conectada a un sensor de temperatura rectal (cma, Estocolmo, Suecia). Se demostró que la VCN de la cola era más reproducible que los registros del nervio ciático que tuvieron que ser expuestos quirúrgicamente. La estimulación se realizó con un aumento de voltaje hasta que se alcanzó la estimulación supramáxima. El voltaje máximo de PAMC se registró en el músculo de la cola con electrodos de agujas subcutáneas finas usando un instrumento Jaeger-Toennies Neu-

roscreen (Würzburg, Alemania). Las amplitudes del PAMC se calcularon pico a pico. La VCN se calculó a partir de las diferencias de distancia y de latencia motora entre las estimulaciones próximas y distales.

#### *Análisis estadístico*

5 Los datos se analizaron a continuación utilizando el análisis de ajuste de supervivencia de Kaplan-Meier con los ensayos de Log-Rank y Wilcoxon para la significación estadística. También se realizó el análisis de riesgos proporcionales de Cox para determinar las proporciones de riesgo y analizar la significación estadística de sus diferencias usando la prueba de  $\chi^2$  de probabilidad de efecto. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa informático Statistica 9.1 (StatSoft, Hamburgo, Alemania). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

## 10 **Resultados**

### *El inicio de la enfermedad no es modificado por el tratamiento con fasudil presintomático o sintomático*

15 El inicio de la enfermedad se diagnostica cuando se alcanza la puntuación neurológica 3 (colapso o colapso parcial de la extensión de las patas hacia la línea media lateral (debilidad) o temblor de las patas traseras durante la suspensión por la cola). No hubo diferencias estadísticamente significativas en el inicio de la enfermedad en animales tratados a partir del d50 o del d80 diferenciados por sexo (Fig. 1).

### *La supervivencia y la duración de la enfermedad se prolongan en ratones SOD<sup>G93A</sup> tratados presintomáticamente*

20 La proporción de ratones que sobreviven con el tiempo no diferenciados por sexo se muestra en la Fig. 2. Mientras que tanto los grupos sintomáticos tratados con Fas30 como con Fas100 (d80) no mostraron una diferencia estadísticamente significativa en las proporciones de supervivencia con el tiempo, el grupo presintomático tratado con Fas30 (d50) se benefició significativamente del tratamiento.

25 Si se diferenciaban por sexo, el grupo de hembras presintomático tratadas con Fas30 se beneficiaba significativamente del tratamiento, sobreviviendo una media de 141,8 días en comparación con los 130,4 días del grupo de control. El tratamiento presintomático con Fas30 de machos mostró una tendencia en la prolongación de la supervivencia. Si el tratamiento con fasudil se iniciaba sólo desde un momento sintomático, no era capaz de prolongar la supervivencia en el grupo de hembras ni en el de machos.

La duración de la enfermedad se define desde que comienza la aparición de los primeros síntomas clínicos hasta la muerte. En este parámetro, los ratones hembras tratados presintomáticamente mostraron una prolongación del tiempo. Los grupos tratados sintomáticamente no mostraron alteraciones significativas.

30 El seguimiento clínico del estudio de terapia consistió en la puntuación neurológica clínica y el análisis del peso realizados cada tres días a todos los animales. De este modo, los inventores fueron capaces de definir exactamente el inicio de la enfermedad, controlar la progresión de la enfermedad y determinar el tiempo de la muerte. En los animales tratados presintomáticamente, los inventores no observaron ninguna prolongación del inicio de la enfermedad. Este es un hallazgo común en muchos otros estudios de terapia de la ELA, por ejemplo usando Riluzole.

35 Los criterios para terminar el estudio de la terapia (denominado más adelante tiempo de la muerte) se cumplían si los animales habían alcanzado la puntuación neurológica terminal o habían perdido un porcentaje definido del peso máximo. Este punto de tiempo refleja entonces el tiempo de supervivencia de los animales, mientras que la duración de la enfermedad se midió desde el inicio de la enfermedad hasta el momento de la muerte. El grupo de tratamiento presintomático se benefició significativamente del tratamiento con Fas30 respecto a la supervivencia, mientras que el efecto de Fas100 fue menos importante. Si se diferenciaban por sexo, este efecto promotor de la supervivencia era más pronunciado para las hembras. Sin estar vinculado a ninguna teoría, una explicación de esto puede deducirse ya de otros estudios en los que los inventores han analizado anteriormente los inhibidores farmacológicos de ROCK en diversos entornos experimentales. En este caso, los inventores habían observado un importante efecto dependiente de la dosis de la inhibición de ROCK por fasudil (HA-1077) y más importante por su derivado dimetil-fasudil (HA-1152) (Lingor 2007, 2008). Parece que para estos inhibidores farmacológicos de ROCK una concentración óptima siempre ha de ser valorada dependiendo de la aplicación experimental, debido a que la ventana terapéutica de los inhibidores de ROCK parece ser limitada. Como ejemplo, el potencial regenerativo de la inhibición de ROCK para aumentar el número de axones regeneradores después de la lesión de compresión del nervio óptico se redujo significativamente si se había aplicado una alta dosis intravítrea de dimetil-fasudil (40  $\mu\text{mol/L}$ ) en comparación con una dosis media (400  $\text{nmol/L}$ ) (Lingor, Teusch et al., 2007). Los inventores atribuyeron esta disminución en la actividad promotora de proliferación a una actividad co-inhibidora de quinasas relacionadas con el crecimiento, tales como la proteína quinasa N, la proteína quinasa A, la proteína quinasa 1 activada por mitógenos y por estrés, la citronquinasa o la quinasa de cadena ligera de miosina (Davies, Reddy et al., 2000). Curiosamente, la inhibición presintomática de ROCK con el inhibidor de ROCK farmacológicamente más potente, Y-27632, en una dosificación comparable en eficacia con la dosis baja de fasudil no dio resultado en los efectos promotores de la supervivencia (Fig. 19). Por tanto, los efectos beneficiosos de fasudil sobre la supervivencia no parecen ser un efecto de grupo de los inhibidores de ROCK, pero es probable que sean específico para fasudil.

El tratamiento sintomático (d80) no pudo mejorar la supervivencia con ambas concentraciones de fasudil aplicadas. Esto podría deberse a un proceso de la enfermedad ya demasiado avanzado que fasudil no puede detener. Otra posibilidad sería que fasudil no es tan eficaz contra la fisiopatología de la fase terminal de la enfermedad como contra las alteraciones de la fase temprana. Mientras que las fases tempranas se caracterizan por la destrucción de la inervación de UMN y la degeneración axonal, la progresión de la enfermedad sintomática hasta la fase final se caracteriza principalmente por la infiltración de microglías e inflamación general. En comparación, otros muchos tratamientos que han tenido éxito si se iniciaban presintómicamente han fracasado si se aplicaba sólo en fases sintomáticas. Por tanto, un diagnóstico muy precoz es lo más importante en esta enfermedad, de modo que fasudil pueda ejercer sus efectos beneficiosos durante un período de tiempo más largo.

*La coordinación motora, pero no la fuerza muscular global, se mejora por el tratamiento presintomático con fasudil*

Desde el punto de vista del paciente, la supervivencia global no es el único parámetro de una terapia eficaz. Muchos estudios terapéuticos recientes en seres humanos evalúan en su lugar un aumento del tiempo con una mejor calidad de vida. Una mejor función motora podría ser un parámetro que es relevante para la calidad de vida diaria y por tanto los inventores eligieron dos ensayos diferentes para controlar la función motora en el presente modelo animal. La prueba del cilindro giratorio evalúa la coordinación motora fina y es una prueba muy sensible para determinar la capacidad de moverse sobre un suelo inestable.

Cuando se evaluó la coordinación motora sometiendo a los animales a la prueba del cilindro giratorio, el grupo de tratamiento presintomático de hembras tardó en fallar más en la tarea de alcanzar un tiempo de recorrido total de 180 segundos (122,5 días) en comparación con el grupo tratado con vehículo (114,2 días). Para los machos, sólo hubo una ligera tendencia no significativa de mejorar el comportamiento en el grupo tratado presintómicamente con Fas30 (Fig. 5). Los animales de tipo natural siempre alcanzaron el tiempo máximo de 180 segundos (datos no mostrados).

Los ratones tratados presintómicamente mostraron un tiempo prolongado hasta el primer fallo en el ensayo del cilindro giratorio. Este efecto fue más pronunciado para ratones hembras y moderadamente mejorado en ratones machos. Un tratamiento sintomático no fue capaz de mejorar los comportamientos en el ensayo del cilindro giratorio.

La prueba de colgamiento en alambre evalúa la fuerza bruta de agarre de las extremidades superiores. No permite diferenciar entre déficits de resistencia sólo menores debido a que el peso de los animales está en relación con la fuerza de agarre relativamente pesada.

El comportamiento en el colgamiento del alambre que evalúa la fuerza muscular bruta en la tarea de alcanzar un tiempo total de colgamiento en el alambre de 180 segundos no fue diferente en ninguno de los grupos de tratamiento de ambos sexos (Fig. 6). Los animales de tipo natural lograron siempre el tiempo máximo de 180 segundos (datos no mostrados).

En los grupos de tratamiento tanto presintomáticos como sintomáticos, el tiempo hasta el fallo en este ensayo se prolongó sólo hasta una cantidad muy moderada pero no significativa en comparación con los controles. Así, fasudil parece mejorar bastante más la coordinación motora fina que la fuerza muscular bruta.

*Las motoneuronas de ratones SOD<sup>G93A</sup> hembras están protegidas por el tratamiento presintomático con fasudil*

Con el fin de correlacionar los resultados clínicos y conductuales con el proceso de la enfermedad neurodegenerativa a nivel histológico, los inventores eligieron evaluar en primer lugar la supervivencia de las motoneuronas de la médula espinal y en segundo lugar la astrogliosis de la médula espinal. El análisis de las motoneuronas positivas a ChAT en la médula espinal representa un marcador básico de la patología de la ELA, sin embargo, no refleja necesariamente la integridad funcional de esta parte principal de la unidad motora. Aunque los inventores habían realizado repetidamente los ensayos clínicos y conductuales durante todo el proceso de la enfermedad, se limitaron a un punto de tiempo de cada grupo experimental para realizar el análisis inmunohistoquímico después del sacrificio del animal. Como la enfermedad clínica ya es muy obvia el d100, los inventores eligieron este punto de tiempo para el análisis y examinaron adicionalmente a todos los animales en el momento de la muerte.

La función motora depende del número de unidades motoras funcionales que están incluidas en la motoneurona, su axón, la unión neuromuscular y las fibras musculares inervadas. Dado que el número de cuerpos celulares de las motoneuronas es un componente crítico de estas unidades motoras y la inhibición de ROCK ha demostrado ser capaz de conferir un efecto citoprotector sobre las células neuronales, los inventores compararon el número de motoneuronas positivas a ChAT entre los grupos de tratamiento. Por tanto, los inventores analizaron el número de motoneuronas de los animales tratados el día de vida 100 y en el momento de la muerte, que sin embargo puede ser diferente para cada animal (véase la Fig. 3).

El análisis de las motoneuronas realizado al día 100 para ratones hembras tratados presintómicamente mostró solo una pérdida menor de números de motoneuronas entre ratones de tipo natural y los transgénicos tratados con vehículo. Obviamente, la pérdida de motoneuronas es sólo moderada en ese punto de tiempo precoz de la enfermedad clínica. Si se comparan los animales transgénicos que recibieron vehículo o Fas30, estos últimos mostraron una fuerte tendencia a números elevados de motoneuronas (Fig. 7).

Debido a que las motoneuronas presentan grandes cuerpos celulares de motoneuronas y se reconoce generalmente que el tamaño del cuerpo celular también puede verse como un marcador de la viabilidad celular intacta, los inventores midieron los tamaños de todas las motoneuronas en los diferentes grupos de animales (ejemplo en la Fig. 8).

5 Si se diferenciaban los números absolutos de motoneuronas por tamaño del cuerpo celular, los animales transgénicos tenían menos motoneuronas en todos los grupos de tamaño. Aunque el grupo transgénico tratado con Fas30 mostró más motoneuronas en todos los grupos de tamaño, esta tendencia no era significativa (Fig. 9).

Si se comparaban los valores acumulativos del tamaño del cuerpo celular por corte de asta anterior entre los grupos, el tamaño acumulativo en el grupo transgénico tratado con fasudil mostró una tendencia definida a ser mayor que el del grupo tratado con vehículo (Fig. 10).

10 Aunque el número de células motoneuronas no se alteró significativamente en ambos grupos de tratamiento transgénico el día 100, los animales tratados presintómicamente analizados en el momento de su muerte mostraron diferencias significativas. En contraste con el bajo número de células positivas a ChAT por corte de médula espinal lumbar en ratones hembras tratados con vehículo ( $6,1 \pm 0,95$ ), los animales hembras tratados con Fas30 tenían un aumento significativo en el recuento de motoneuronas ( $8,6 \pm 0,36$ ) que no se encontró en el grupo con dosis altas de F100 ( $7,3 \pm 1,00$ ). Los grupos de machos con tratamiento presintomático no se beneficiaron del tratamiento con Fas30 ni con Fas100 (Fig. 11a). Sin embargo, el grupo de machos con tratamiento sintomático presentó mayores números de motoneuronas en el grupo con el tratamiento con Fas30 que en el grupo con vehículo. Los grupos de hembras con tratamiento sintomático no difirieron respecto al recuento de células motoneuronas (resumen de todos los datos en la Fig. 11b).

20 Los ratones tratados presintómicamente con fasudil mostraron una tendencia al aumento del número de motoneuronas de la médula espinal el día 100, sin embargo, esto no era significativo como tampoco en comparación con los animales de tipo natural, en los que la mayoría de las motoneuronas no estaban todavía afectadas por el proceso de la enfermedad. El análisis en el momento de la muerte dio como resultado un aumento del número de motoneuronas para ratones hembras. El tratamiento sintomático no fue capaz de mejorar la supervivencia de las motoneuronas.

25 *La astrocitosis se reduce en ratones tratados presintómicamente con fasudil*

La astrogliosis reactiva representa otro parámetro en la evaluación de la manifestación histológica de la enfermedad ELA. En pacientes humanos con ELA, la progresión clínica de esta enfermedad neurodegenerativa parece estar asociada con cambios en la infiltración de las células astrocíticas en la médula espinal. Por tanto, los inventores evaluaron el grado de astrogliosis en la médula espinal lumbar contando el número de células astrogliales positivas a GFAP en el asta anterior y los valores normalizados con el área (Fig. 12).

30 Comparables con el análisis de las motoneuronas supervivientes, los inventores evaluaron los animales el día 100 de vida y en el momento de la muerte. El número de células astrogliales el día 100 en ratones hembras entre animales de tipo natural y transgénicos fue significativamente mayor en el grupo transgénico tratado con vehículo. En comparación con los animales transgénicos tratados con vehículo, Fas30 redujo significativamente el número de células positivas a GFAP (Fig. 13).

40 El análisis cuantitativo de ratones tratados presintómicamente en el momento de su muerte dio como resultado un menor número de astrocitos en animales transgénicos tratados con vehículo en comparación con el día 100. Comparando los grupos de tratamiento de animales transgénicos, los números de astroglias positivas a GFAP fueron ligeramente superiores para el grupo de machos tratados con Fas30 ( $38,2 \pm 4,4$ ) pero no para el grupo de hembras tratado con Fas30 ( $31,6 \pm 5,9$ ). Los grupos con Fas100 (machos  $29,24 \pm 4,5$ ; hembras  $27,9 \pm 4,0$ ) no difirieron de los controles con vehículo (machos  $31,3 \pm 4,7$ , hembras  $28,91 \pm 4,7$ ) (Fig. 14).

45 Al evaluar los números de astroglias positivas a GFAP en la médula espinal, los animales hembras tratados presintómicamente tenían significativamente menos astroglias infiltrantes, lo que refleja que esta astrogliosis reactiva no había evolucionado tanto como en los ratones no tratados. La capacidad del fasudil para influir en los procesos inflamatorios también ha sido demostrada por otros grupos. El análisis de ratones tratados presintómicamente en el momento de su muerte dio lugar a un hallazgo inesperado. Aquí, los ratones tanto machos como hembras mostraron mayor número de astroglias. Los inventores atribuyen este hallazgo al tiempo de vida prolongado de los animales y especulan que mientras en los mismos puntos de tiempo, como el día 100, los animales presentan menos astrogliosis con el tratamiento con fasudil, tienen una fuerte acumulación "extra" hasta la fase final/momento de la muerte que es por término medio más de una semana más tarde que en animales tratados con vehículo. Parece que tiene lugar una "rotura de un embalse" y conduce a una infiltración exponencial de astroglia en esta fase clínica muy tardía. Curiosamente, el tiempo de vida prolongado no influyó negativamente sobre los números de motoneuronas que más bien parece que se conservaban más establemente desde los puntos de tiempo tempranos.

55 Además, la función motora depende del número de unidades motoras funcionales que están incluidas no sólo en la motoneurona de la médula espinal propiamente dicha, sino también en su axón, la unión neuromuscular y las fibras musculares inervadas. Por tanto, los inventores no sólo investigaron la patología de la ELA en la médula espinal, sino también los compartimentos distales restantes del sistema nervioso periférico (SNP) y del músculo inervado.



Sin embargo, evaluando la patología axonal del nervio ciático y la integridad de la UNM del músculo gastrocnemio, no había diferencias significativas entre animales tratados con fasudil y de control.

En un modelo *in vitro* correspondiente de supervivencia de motoneuronas, el fasudil protege sólidamente las motoneuronas de la muerte celular en un cultivo conjunto con astrocitos pero también en un monocultivo.

#### 5 **La degeneración axonal no se altera después de tratamiento con fasudil**

La degeneración de los axones motores es un episodio temprano en el desarrollo de la enfermedad de ELA que tiene importantes consecuencias funcionales. Por tanto, los inventores analizaron el grado de degeneración axonal en el nervio ciático en ratones de tipo natural y con ELA el día 100 en hembras. El recuento manual del número total de axones preservados en el nervio ciático dio como resultado una disminución significativa del número axonal en los animales transgénicos en comparación con los animales de tipo natural. El grupo transgénico tratado con vehículo y el grupo tratado con Fas30 mostraron números de axones comparables (Fig. 15).

Si se diferenciase por el intervalo de tamaños del diámetro del axoplasma, el número axonal en cada intervalo de tamaños era mayor en animales de tipo natural que en animales transgénicos, excepto en el intervalo de tamaños menor que 3,5  $\mu\text{m}$ . No había diferencias significativas entre los animales transgénicos tratados con vehículo y los tratados con Fas30 (Fig. 16).

#### **Ejemplo comparativo**

Si se trataron ratones SOD<sup>G93A</sup> con el inhibidor de ROCK farmacológicamente más potente, Y-27632 (10 mg/kg de peso) en un modelo de tratamiento presintomático desde el d50 en adelante, no se observaron efectos significativos con relación a la supervivencia (véase la Fig. 19).

#### 20 **Ejemplo 2 (No reivindicado)**

##### ***El fasudil protege motoneuronas cultivadas de la toxicidad del ácido kaínico***

Con el fin de comparar el efecto neuroprotector del fasudil sobre las motoneuronas *in vivo* con un modelo correspondiente *in vitro*, los inventores sometieron motoneuronas primarias de tipo natural cultivadas en un cultivo conjunto de astrocitos/motoneuronas a la toxicidad del ácido kaínico (KA). La exposición al KA durante 24 horas disminuyó acusadamente el número de motoneuronas viables. Sin embargo, si los cultivos habían sido tratados con fasudil a una concentración de 4 o 20  $\mu\text{M}$ , la reducción del número de motoneuronas viables disminuyó significativamente menos. Por tanto, el fasudil protegía las motoneuronas de la muerte celular inducida por KA (Fig. 17).

El fasudil protegía también eficazmente los monocultivos de motoneuronas primarias, indicando por tanto que el efecto protector no depende de los astrocitos cultivados conjuntamente (Fig. 18).

30 En resumen, el fasudil protegía las motoneuronas de la muerte celular en un cultivo conjunto con astrocitos, pero también en monocultivo en un modelo correspondiente *in vitro* de supervivencia de motoneuronas.

#### **Ejemplo 3**

##### **Materiales y métodos**

##### ***Preparación, cultivo y tratamiento de células microgliales***

35 Se prepararon cultivos de células primarias de cerebros completos de ratones recién nacidos (P0) y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco completo (DMEM, Invitrogen/Gibco, Karlsruhe, Alemania), suplementado con suero de ternera fetal al 10% (FCS, Invitrogen/Gibco), 100 U/mL de penicilina y 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomina (ambas de Biochrom, Berlín, Alemania) como se ha descrito previamente (Regen, et al. (2011) *Brain, Behavior and Immunity* 25(5): 957-970). En resumen, cerebros de ratones B6/SJL SOD1<sup>G93A</sup> recién nacidos y de ratones B6/SJL SOD1<sup>wt</sup>, respectivamente, se liberaron de las meninges y vasos sanguíneos, se lavaron con solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Biochrom) y se incubaron con tripsina al 2,5% (Biochrom) durante 10 minutos a 37°C. La reacción enzimática se detuvo por adición de medio completo, suplementado con DNasa [5 mg/mL] (Worthington Biochemicals, Lakewood, NJ, EE.UU). Las agrupaciones de células restantes se separaron mecánicamente y la suspensión se centrifugó a 900 rpm a 4°C durante 10 minutos. El líquido sobrenadante se separó, las células se volvieron a poner en suspensión en medio completo de nueva aportación y se sembraron en frascos de cultivo de 75  $\text{cm}^2$  recubiertos con poli-L-lisina (PLL). Inmediatamente antes de ser usados los frascos se incubaron con 100  $\mu\text{g/mL}$  de PLL (Invitrogen/Gibco) durante 30 minutos a temperatura ambiente y el exceso de PLL se eliminó por tres lavados con ddH<sub>2</sub>O estéril. Posteriormente los cultivos se mantuvieron en una atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Al día siguiente los cultivos gliales mixtos primarios se lavaron tres veces (PBS, Invitrogen/Gibco) y recibieron medio completo de nueva aportación, siendo esto último repetido el día siguiente. Una semana después de la siembra se estimuló la proliferación microglial añadiendo medio completo suplementado con 30% de líquido sobrenadante de cultivo celular acondicionado para L929 (véase el apartado "*Cultivos de fibroblastos de ratones L929*" más adelante). Después de otros dos días, las células microgliales se recogieron separando por agitación la capa de astrocitos, aprovechando sus diferentes propiedades de adhesión. Después de lavado con medio completo y recuento, las

células se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 15.000 células/pocillo para ensayo ELISA o se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 50.000 células/pocillo en portaobjetos recubiertos con PLL para tratamiento inmunocitoquímico posterior. La pureza de las preparaciones microgliales era habitualmente >98%, basada en la tinción nuclear con DAPI, inmunocitoquímica para CD11b e Iba1, así como marcaje basado en isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia* (datos no mostrados).

Los cultivos primarios experimentaron cinco tratamientos generales diferentes: (a) Las células se dejaron sin tratar en el medio sirviendo como controles. (b) Las células se estimularon con LPS con ligando TLR4 (*E. coli* R515; conjunto de ligando 1 Axxora/Appotech TLR, APO.54N-018) durante 18 horas a una concentración final de 10 ng/mL. (c) Las células experimentaron un tratamiento con fasudil a 2  $\mu$ M, 10  $\mu$ M o 50  $\mu$ M, respectivamente, durante 18 horas. (d) Las células se estimularon con LPS, como se ha descrito antes, en presencia de diversas concentraciones de fasudil. (e) Las células se preincubaron durante 1 hora, 4 horas o 12 horas, respectivamente con fasudil a 50  $\mu$ M, antes de enfrentarlas a LPS en presencia continua de fasudil a 50  $\mu$ M. Los experimentos de estimulación se realizaron habitualmente dos veces.

#### **Determinación de la vitalidad de las células microgliales**

La viabilidad de las células microgliales se analizó como la actividad metabólica usando el reactivo WST-1 (4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benceno-disulfonato), basado en la escisión enzimática de la sal de WST-tetrazolio a formazano por el sistema succinato-tetrazolio-reductasa de la cadena respiratoria de mitocondrias intactas. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Después de 3 horas de incubación, la reacción de color resultante se midió a 450 nm (con 655 nm como longitud de onda de referencia) en un lector de microplacas (Bio-Rad, Munich, Alemania). En consecuencia, el fasudil se ajustó a una concentración máxima de 50  $\mu$ M, puesto que hasta esta concentración, no hubo reducción en la actividad metabólica observada.

#### **Cultivos de fibroblastos de ratones L929**

Se cultivaron habitualmente fibroblastos de ratón L929 en medio completo y se sometieron a pases (1:5) cada dos semanas. Después de 14 días de cultivo continuo (sin cambio de medio entre ellos) se aislaron los líquidos sobrenadantes y se conservaron a -20°C hasta que se usaron para la estimulación de la proliferación microglial. Después de 30 pases, se establecieron nuevos cultivos de L929 a partir de una reserva (*stock*) conservada en nitrógeno líquido.

#### **Medidas de citoquinas y quimioquinas (ELISA)**

Después de las estimulaciones y tratamientos microgliales, los líquidos sobrenadantes de cultivo se recogieron y conservaron a -20°C hasta que se analizaron. Los líquidos sobrenadantes se analizaron para determinar la liberación de citoquinas y quimioquinas por sistemas de ensayo con inmunosorbente unido a enzima (ELISA) comerciales. Los niveles de IL-6, CCL2 (proteína quimioatrayente de monocitos, MCP-1), CCL3 (proteína inflamatoria de macrófagos, MIP-1 $\alpha$ ) y CCL5 (regulada por activación de linfocitos T normales expresados y presumiblemente secretados, RANTES) y CXCL1 (quimioquina (resto C-X-C) ligando 1) se determinaron usando kits de desarrollo ELISA DuoSet (R&D Systems). El TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ) se determinó usando el kit MAXTM ELISA (Biolegend). La absorbancia se midió a 450 nm (con una longitud de onda de referencia de 540 nm) usando un lector de microplacas (Bio-Rad).

#### **Resultados**

##### **Las propiedades protectoras de fasudil se pueden deber a microglías activadas del fenotipo neuroprotector M2.**

La activación microglial es un distintivo neuropatológico de la ELA. Las microglías pueden tener estados fenotípicos muy distintos y diferentes, y, dependiendo de las condiciones fisiológicas pueden ejercer un efecto tóxico o protector sobre las neuronas. Las microglías del fenotipo M1 (microglías clásicamente activadas) son citotóxicas debido a la secreción de citoquinas proinflamatorias y especies de oxígeno reactivas. Las microglías del fenotipo M2 (microglías alternativamente activadas) bloquean las respuestas proinflamatorias y producen niveles aumentados de factores neurotróficos y citoquinas anti-inflamatorias (para una revisión véase, Henkel et al. 2009). Hasta la fecha, manipular estas funciones y atributos de efectores neuroprotectores o neurotóxicos microgliales permanece elusivo y mal comprendido.

La extensión de la diseminación de células microgliales en la médula espinal lumbar se evaluó con un marcador de microglías activadas (Iba1) como se ha descrito antes en el epígrafe "*Evaluación cuantitativa de motoneuronas de la médula espinal, astroglías y microglías, axones del nervio ciático y unión neuromuscular (UNM)*"

Los resultados se muestran en la Figura 20. Aunque no hubo diferencias acusadas en la cantidad de células microgliales en todos los grupos en tratamiento en la fase final de la enfermedad (grupo del vehículo  $43,2 \pm 4,2$  células/ $0,5$  mm<sup>2</sup>; grupo de Fas30  $48,8 \pm 3,3$  células/ $0,5$  mm<sup>2</sup>; grupo de Fas100  $50,2 \pm 4,7$  células/ $0,5$  mm<sup>2</sup>) (Fig. 20 A, C), los análisis intermedios durante el curso de la enfermedad el d100 mostraron un número significativamente mayor de

células microgliales inmunopositivas a Iba1 en ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados con fasudil 30 ( $39,5 \pm 3,9$  células/ $0,5 \text{ mm}^2$ ) en comparación con ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados con vehículo ( $27,8 \pm 4,7$  células/ $0,5 \text{ mm}^2$ ). Los ratones de tipo natural tratados con vehículo solamente exhibieron muy pocas microglías en la medula espinal ( $14,0 \pm 2,8$  células/ $0,5 \text{ mm}^2$ ) (Fig. 20 B, D).

- 5 El aspecto aumentado de células microgliales en el grupo de tratamiento con fasudil 30 el d100 pudo indicar una respuesta de las células microgliales M2 beneficiosa y neuroprotectora (véase Henkel et al. 2009).

Con el fin de caracterizar aún más el comportamiento microglial diferencial en los grupos de tratamiento el d100, los inventores realizaron una sub-clasificación morfológica de células microgliales, como se ha descrito antes bajo el epígrafe; *Evaluación cuantitativa de motoneuronas de la médula espinal, astroglias y microglías, axones del nervio ciático y unión neuromuscular (UNM)*. Se sabe que la morfología microglial puede ser alterada debido a su estado de activación y las células pueden presentar formas ramificadas predominantemente delgadas, ramificadas predominantemente gruesas, o redondas/ameboides. Se considera que los dos últimos tipos de morfología celular reflejan un estado de activación microglial aumentado en comparación con un tipo de vigilancia que se caracteriza por cuerpos celulares más pequeños y formas ramificadas delgadas (las imágenes microscópicas ilustrativas se muestran en la Fig. 21 C).

En la fase final de la enfermedad no hubo alteraciones gruesas de la morfología microglial en ninguno de los grupos de tratamiento. En ese momento, el tipo morfológico con formas ramificadas gruesas era el más encontrado (Fig. 21 A). Sin embargo, en el d100 las microglías de ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados con fasudil 30 presentaron formas ramificadas predominantemente delgadas ( $70,8 \pm 5,3\%$ ), menos células con ramificaciones delgadas ( $28,7 \pm 5,3\%$ ) y muy pocas células redondeadas ( $0,5 \pm 0,1\%$ ). En contraste, los ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados con vehículo tenían más células con ramificaciones delgadas ( $52,6 \pm 6,3\%$ ) que con gruesas ( $46,7 \pm 6,3\%$ ) y muy pocas células redondeadas ( $0,7 \pm 0,2\%$ ). El grupo de tipo natural tratado con vehículo presentó mayoritariamente formas ramificadas delgadas ( $95,0 \pm 0,8\%$ ), muy pocas células con ramificaciones gruesas ( $5,0 \pm 0,8\%$ ) y ninguna célula redondeada ( $0,0 \pm 0,0\%$ ) (Fig. 21 B).

- 25 Por tanto parece que tiene lugar un aumento de la activación de células microgliales, que posiblemente presentan el fenotipo neuroprotector M2.

Los cultivos primarios de microglías de ratones recién nacidos de control de tipo natural SOD1 (SOD1<sup>wt</sup>) o mutantes respectivas (de ratones SOD1<sup>G93A</sup> en fase clínica avanzada) (15,000 células/pocillo) se incubaron en presencia simultánea de LPS (10 ng/mL) y diferentes concentraciones de fasudil (2 $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) durante 18 horas, respectivamente. En los líquidos sobrenadantes se determinó el perfil de liberación de citoquinas/quimioquinas. Los resultados se muestran en la Figura 22. Los datos se presentan con respecto al valor correspondiente de la liberación de citoquinas/quimioquinas desencadenada por LPS dentro de cada genotipo respectivamente (ajustados como 100%). Los datos son valores medio  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de cuadruplicados de 2 experimentos independientes.

35 Aunque que el fasudil a concentraciones de 2  $\mu$ M y 10  $\mu$ M no fue eficaz en reducir significativamente la liberación perjudicial de citoquinas proinflamatorias (véase Henkel et al. 2009) de ambas microglías, de SOD1<sup>wt</sup> y SOD1<sup>G93A</sup>, la dosis de fasudil 50  $\mu$ M redujo marcadamente la liberación de TNF $\alpha$ , IL-6, CCL3, RANTES y CXCL1 en ambos genotipos. Se supone generalmente que estos factores median en una respuesta inflamatoria perjudicial. En contraste, los valores para CCL2 estaban ligeramente aumentados (+8.9 %)/no afectados en esta dosis.

40 En resumen, y sin estar vinculados a ninguna la teoría, la supervivencia prolongada y la duración de la enfermedad en ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados con fasudil como se describe en el Ejemplo 1 pueden ser explicadas posiblemente por una mayor infiltración de células microgliales neuroprotectoras M2.

#### Lista de referencias

- EP1110553
- 45 US 5.942.505
- US 4.678.783
- WO 2009/155777 A1
- WO 2005/117896 A1
- JP 2009 292782 A
- 50 Bermel, C., L. Tonges, et al. (2009). "Combined inhibition of Cdk5 and ROCK additively increase cell survival, but not the regenerative response in regenerating retinal ganglion células". *Mol Cell Neurosci* **42**(4): 427-437.
- Bowerman, M., A. Beauvais, et al. (2010). "Rho-kinase inactivation prolongs survival of an intermediate SMA mouse model". *Hum Mol Genet* **19**(8): 1468-1478.

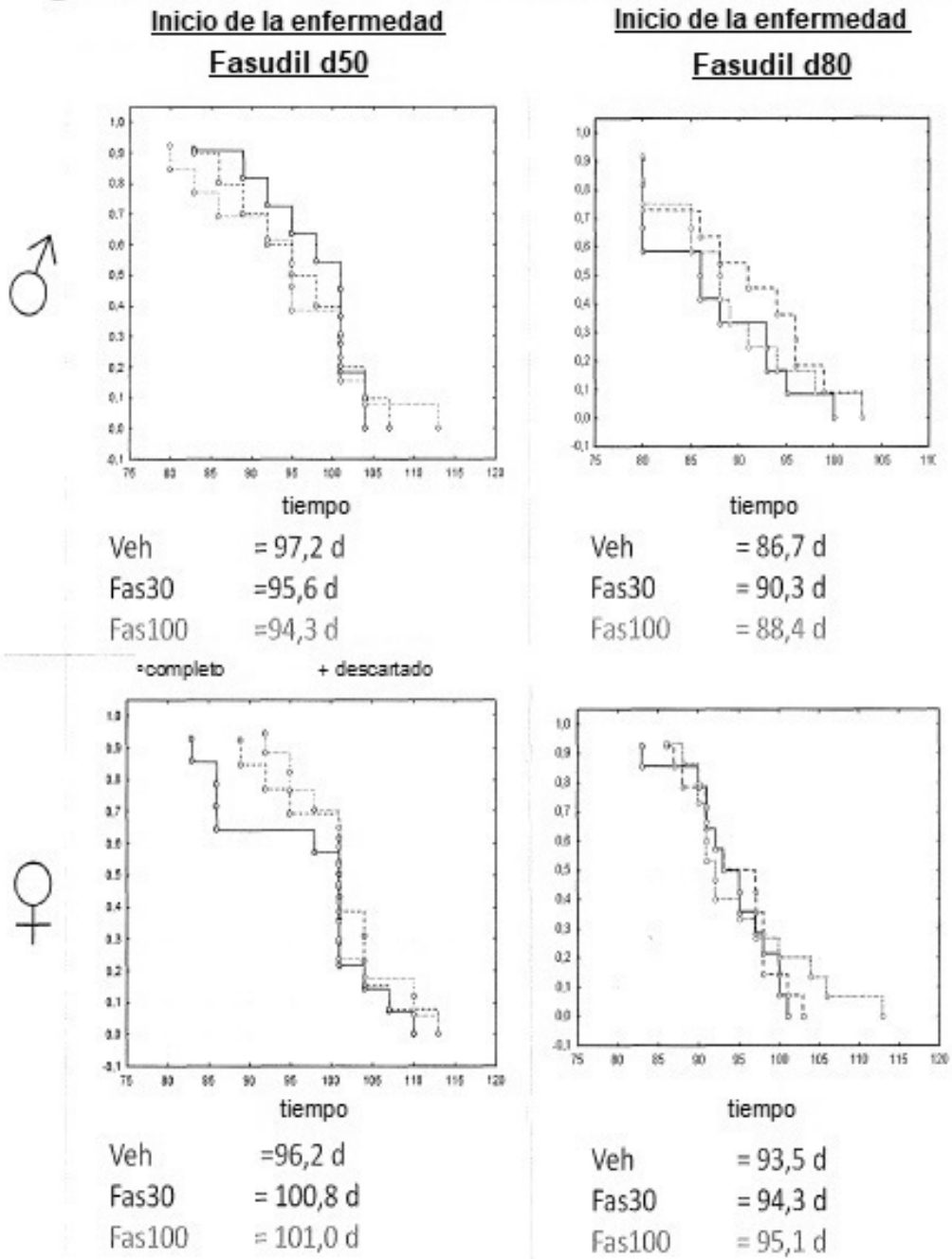
- Cedarbaum, J.M., Stambler N, et al. (1999). "*The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. BDNF ALS Study Group (Phase III)*". J Neurol Sci., **169**(1-2): 13-21.
- de Carvalho et al. (2008). "*Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS*". Clin Neurophysiol **119**: 497-503.
- de Carvalho, M., Swash, M. (2011). "*Amyotrophic lateral sclerosis: an update*". Curr Opin Neurol **24**: 497-503.
- 5 Davies, S. P., H. Reddy, et al. (2000). "*Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*". Biochem J **351**(Pt 1): 95-105.
- Graeber, M. B. (2010) "*Changing Face of Microglia*". Science **330**(6005): 783-788.
- Gurney, M. E., H. Pu, et al. (1994). "*Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation*". Science **264**(5166): 1772-1775.
- 10 Henkel, J.S., D.R. Beers, et al.(2009). "*Microglia in ALS: the Good, the Bad, and the Resting*." Journal of Neuroimmune Pharmacology : the Official Journal of the Society on Neuroimmune Pharmacology. **4**(4): 389-398.
- Kong, J. and Z. Xu (1998). "*Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1*". J Neurosci **18**(9): 3241-3250.
- 15 Li, M., Y. Huang, et al. (2009). "*Y-27632 improves rotarod performance and reduces huntingtin levels in R6/2 mice*". Neurobiol Dis **36**(3): 413-420.
- Lingor, P., N. Teusch, et al. (2007). "*Inhibition of Rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan in vitro and axonal regeneration in the adult optic nerve in vivo*". J Neurochem **103**(1): 181-189.
- Lingor, P., L. Tonges, et al. (2008). "*ROCK inhibition and CNTF interact on intrinsic signalling pathways and differentially regulate survival and regeneration in retinal ganglion células*". Brain **131**(Pt 1): 250-263.
- 20 Lingor, P., J.C. Koch, et al. (2012). "*Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS*" Cell and Tissue Research **349**(1): 289-311.
- Meyer zu Horste, G., T. Prukop, et al. (2007). "*Antiprogestosterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy*". Ann Neurol **61**(1): 61-72.
- 25 Pitzer, C., C. Kruger, et al. (2008). "*Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*". Brain **131**(Pt 12): 3335-3347.
- Planchamp, V., C. Bermel, et al. (2008). "*BAG1 promotes axonal outgrowth and regeneration in vivo via Raf-1 and reduction of ROCK activity*". Brain **131**(Pt 10): 2606-2619.
- 30 Regen, T., Van Rossum, D., Scheffel, J., Kastriti, M.-E., Revelo, N. H., Prinz, M., Brück, W., and Hanisch, U.-K. (2011) "*CD14 and TRIF Govern Distinct Responsiveness and Responses in Mouse Microglial TLR4 Challenges by Structural Variants of LPS*". Brain, Behavior, and Immunity **25**(5): 957-970.

## REIVINDICACIONES

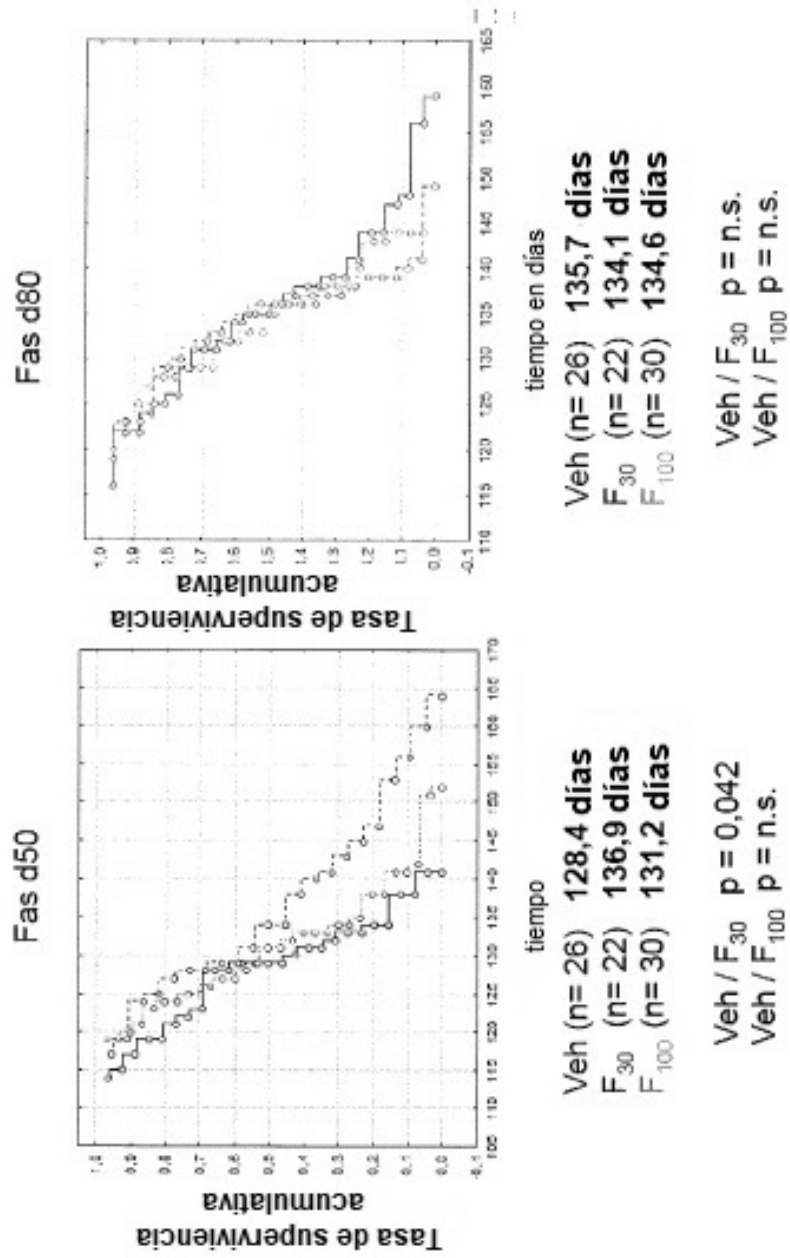
- 5 1. Composición farmacéutica, que comprende o consiste en 1-(5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina (fasudil), o un derivado de fasudil seleccionado de 1-(1-hidroxil-5-isoquinolinasulfonil)homopiperazina (hidroxil-fasudil) y (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolinil)sulfonil]-hexahidro-1*H*-1,4-diazepina (dimetil-fasudil) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en el tratamiento de un sujeto que padece o es propenso a padecer ELA familiar, en donde la ELA familiar es ELA en fase temprana como es diagnosticable por los criterios de diagnóstico de Awajishima; y en donde la administración de dicha composición se inicia pre-sintómicamente.
2. Composición farmacéutica para uso de la reivindicación 1, en donde el sujeto es una hembra.
- 10 3. Composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la composición farmacéutica debe ser administrada por vía oral.
4. Composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la composición farmacéutica comprende o consiste en fasudil.
- 15 5. Composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4, en donde el fasudil debe ser administrado al sujeto en una dosificación de 1-12 mg/kg de peso al día, preferiblemente en una dosificación de 1,25-8 mg/kg de peso al día, tal como en una dosificación de 1,5-6 mg/kg de peso al día, más preferiblemente en una dosificación de en una dosis de 1,75-5 mg/kg de peso al día, incluso más preferiblemente en una dosificación de 2-4 mg/kg de peso al día, y lo más preferiblemente en una dosificación de 2,4-3,6 mg/kg de peso al día.
- 20 6. Composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la composición farmacéutica comprende o consiste en un derivado de fasudil seleccionado de hidroxil-fasudil y dimetil-fasudil.
7. Composición farmacéutica para uso de la reivindicación 6, en donde el derivado de fasudil debe ser administrado al sujeto en una dosificación de 10-1200 ng/kg de peso al día, preferiblemente en un dosificación de 12,5-800 ng/kg de peso al día, tal como en una dosificación de 15-600 ng/kg de peso al día, más preferiblemente en una dosificación de 17,5-500 ng/kg de peso al día, incluso más preferiblemente en una dosificación de 20-400 ng/kg de peso al día, y lo más preferiblemente en una dosificación de 24-360 ng/kg de peso al día.
- 25 8. Composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el fasudil, el derivado de fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables está formulado como una formulación de liberación sostenida o de liberación prolongada.
9. Composición farmacéutica, que comprende o consiste en fasudil, o un derivado de fasudil seleccionado de hidroxil-fasudil y dimetil-fasudil, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en mejorar la coordinación motora en un sujeto que padece o es propenso a padecer ELA familiar, en donde la ELA familiar es ELA en fase temprana como es diagnosticable por los criterios de diagnóstico de Awajishima; y en donde la administración de dicha composición se inicia presintómicamente .
- 30 10. Composición farmacéutica para uso de la reivindicación 9, en donde una mejora de la coordinación motora en un sujeto se determina de acuerdo con la escala de clasificación funcional de ELA.
- 35 11. Composición farmacéutica para uso de la reivindicación 9 o 10, en donde el sujeto es una hembra.
12. Composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde la composición farmacéutica debe ser administrada por vía oral.
13. Composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde la composición farmacéutica comprende o consiste en fasudil.
- 40 14. Composición farmacéutica para uso de la reivindicación 13, en donde el fasudil debe ser administrado al sujeto en una dosificación de 1-12 mg/kg de peso al día, preferiblemente en una dosificación 1,25-8 mg/kg de peso al día, tal como en una dosificación de 1,5-6 mg/kg de peso al día, más preferiblemente en una dosificación de 1,75-5 mg/kg de peso al día, incluso más preferiblemente en una dosificación de 2-4 mg/kg de peso al día, y lo más preferiblemente en una dosificación de 2,4-3,6 mg/kg de peso al día.
- 45 15. Composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde la composición farmacéutica comprende o consiste en un derivado de fasudil seleccionado de hidroxil-fasudil y dimetil-fasudil.
- 50 16. Composición farmacéutica para uso de la reivindicación 15, en donde el derivado de fasudil debe ser administrado al sujeto en una dosificación de 10-1200 ng/kg de peso al día, preferiblemente en una dosificación de 12,5-800 ng/kg de peso al día, tal como en una dosificación de 15-600 ng/kg de peso al día, más preferiblemente en una dosificación de 17,5-500 ng/kg de peso al día, incluso más preferiblemente en una dosificación de 20-400 ng/kg de peso al día, y lo más preferiblemente en una dosificación de 24-360 ng/kg de peso al día.

17. Composición farmacéutica para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-16, en donde el fasudil, el derivado de fasudil o una de sus sales farmacéuticamente aceptable está formulado como una formulación de liberación sostenida o de liberación prolongada.

**Figura 1**

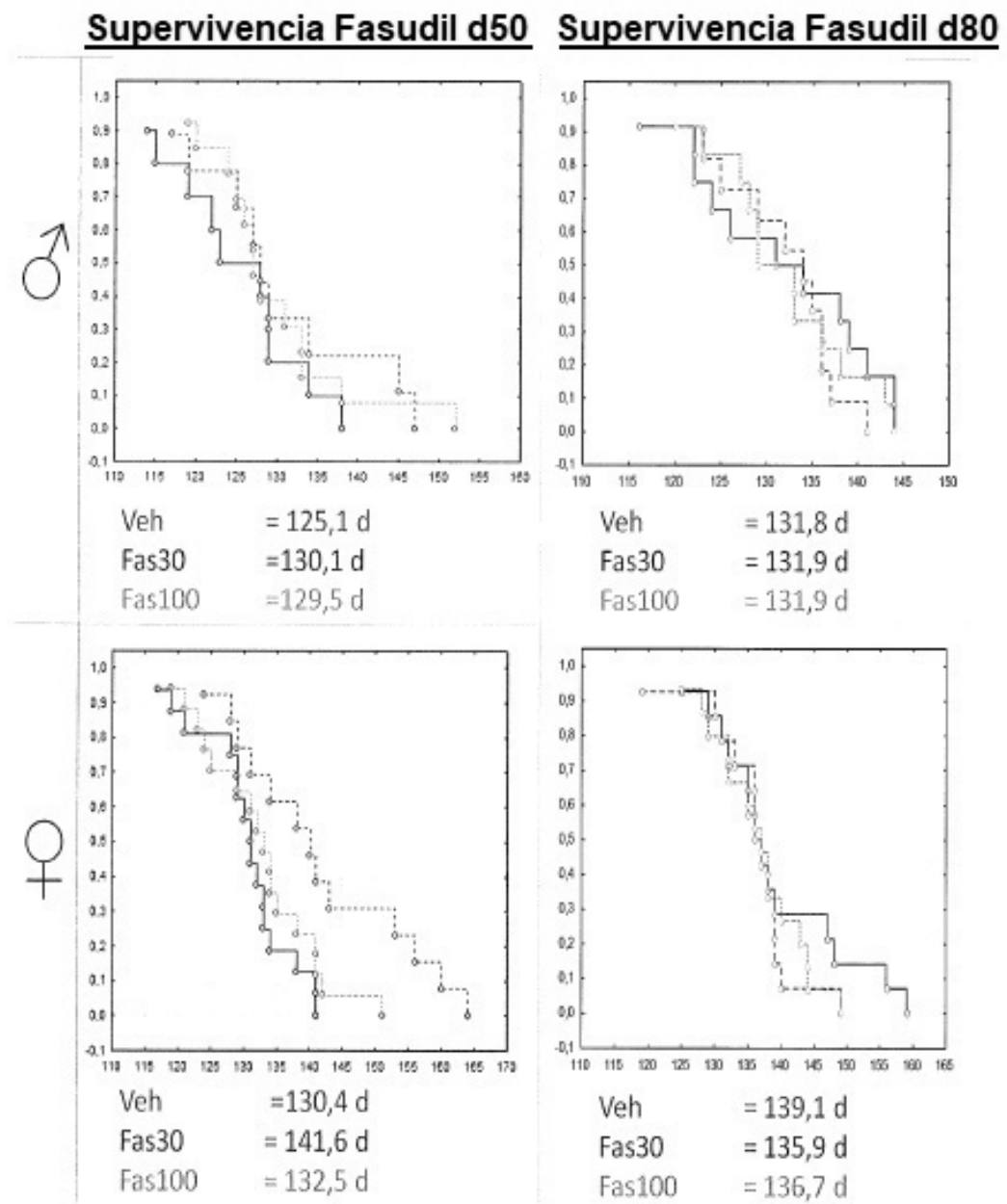


**Figura 2**





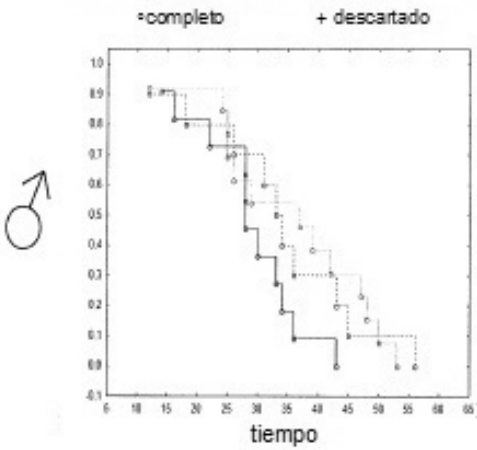
**Figura 3**



**Figura 4**

**Duración de la enfermedad**

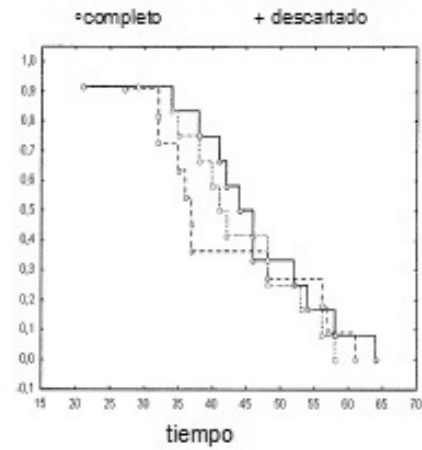
**Fasudil d50**



Veh = 28,7d  
 Fas30 = 33,4 d  
 Fas100 = 35,2 d

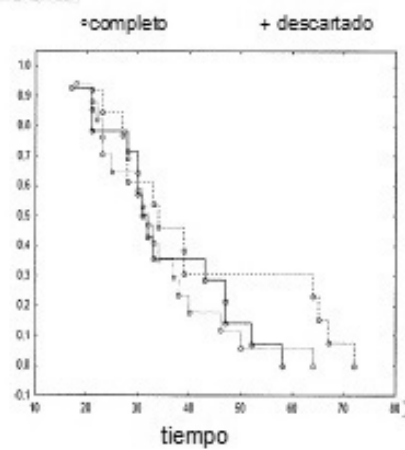
**Duración de la enfermedad**

**Fasudil d80**

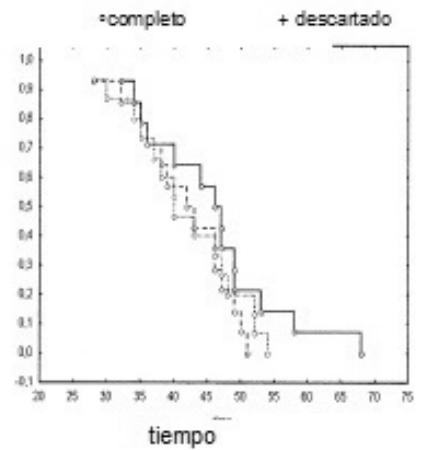


Veh = 45,0 d  
 Fas30 = 41,6 d  
 Fas100 = 43,5 d

♀

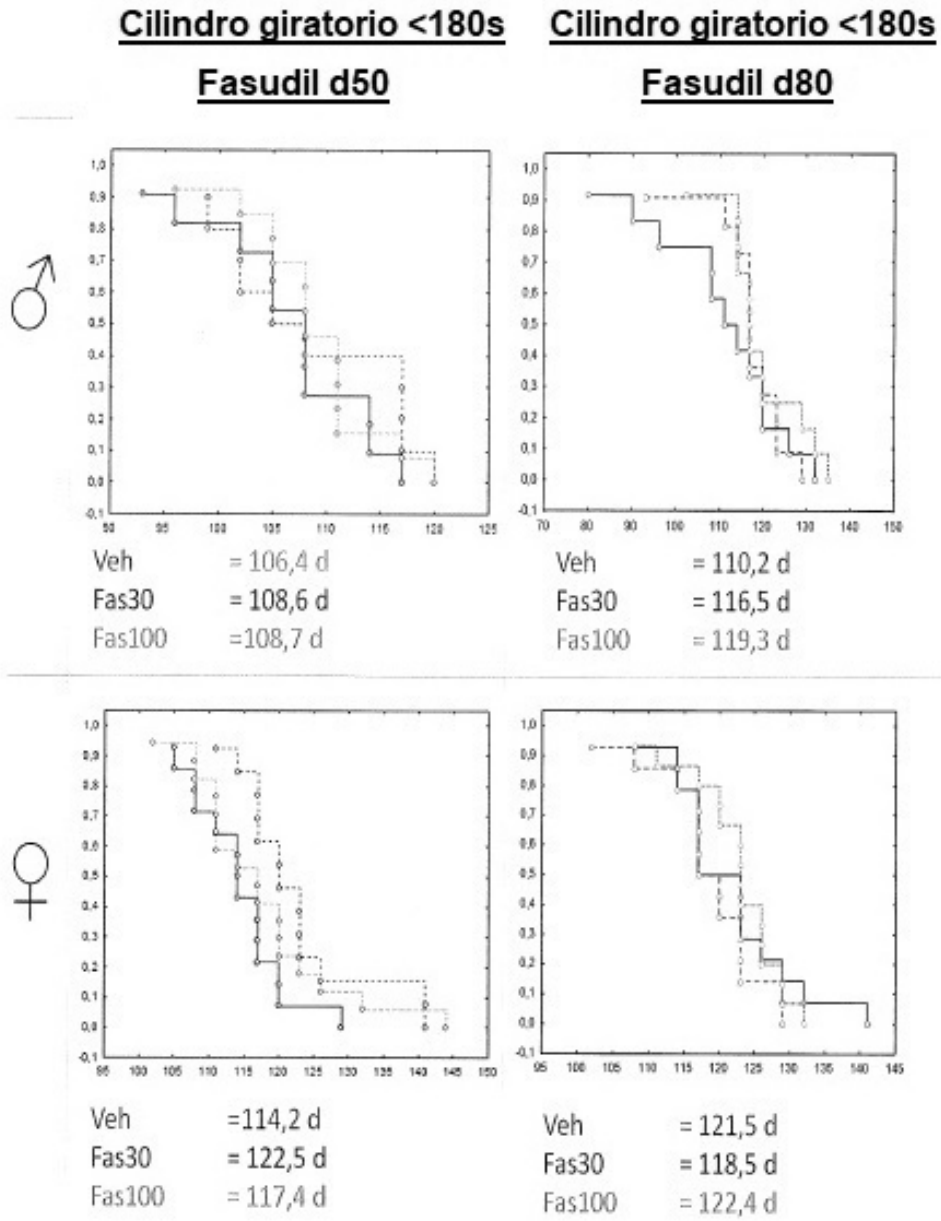


Veh = 35,0 d  
 Fas30 = 41,6 d  
 Fas100 = 33,4 d



Veh = 45,6 d  
 Fas30 = 41,6 d  
 Fas100 = 41,6 d

**Figura 5**

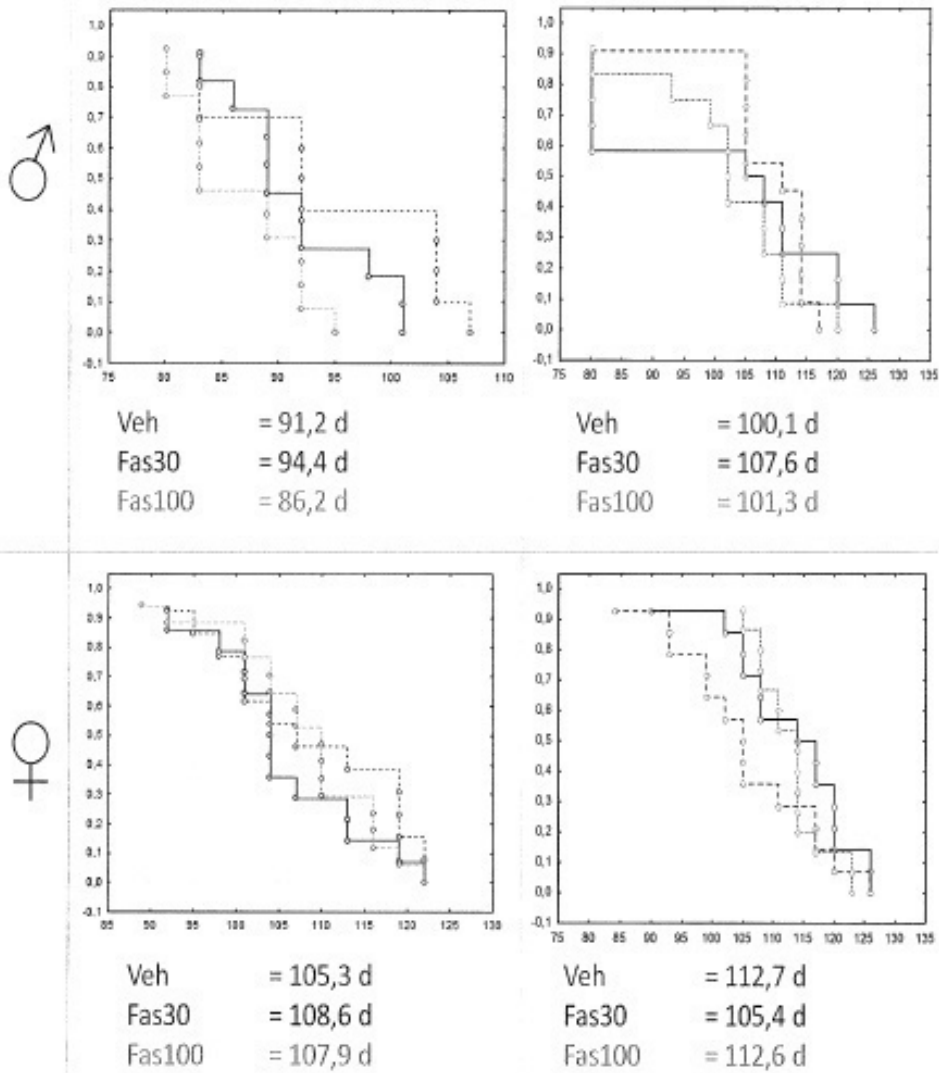


**Figura 6**

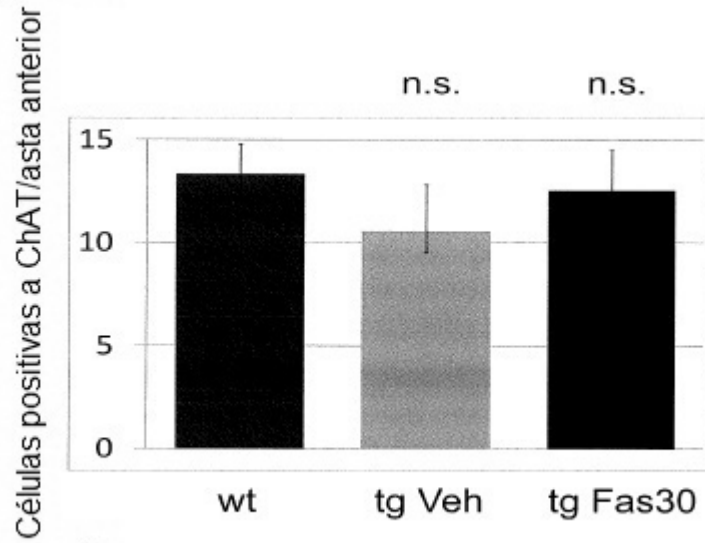
**Colgamiento en alambre <180s**    **Colgamiento en alambre <180s**

**Fasudil d50**

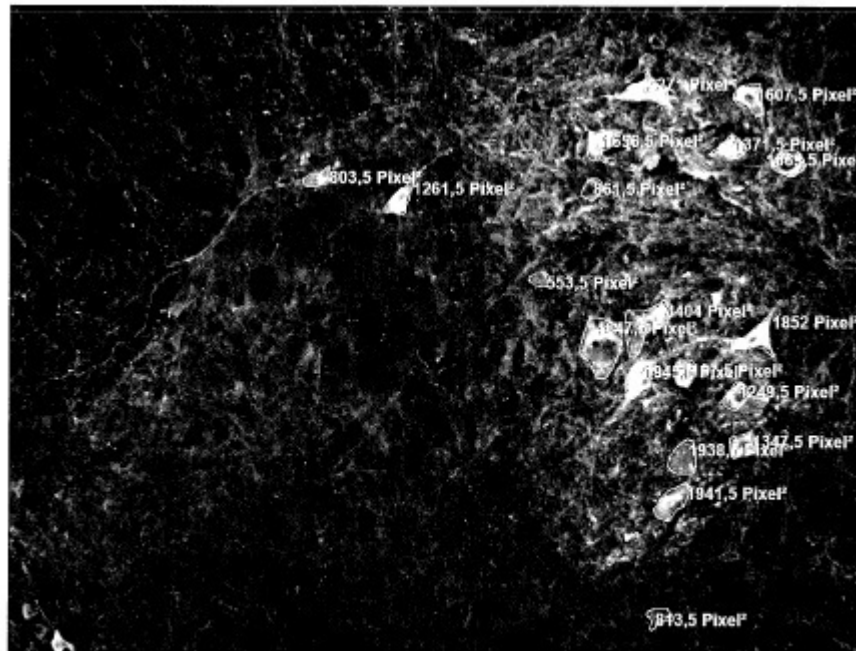
**Fasudil d80**



**Figura 7**

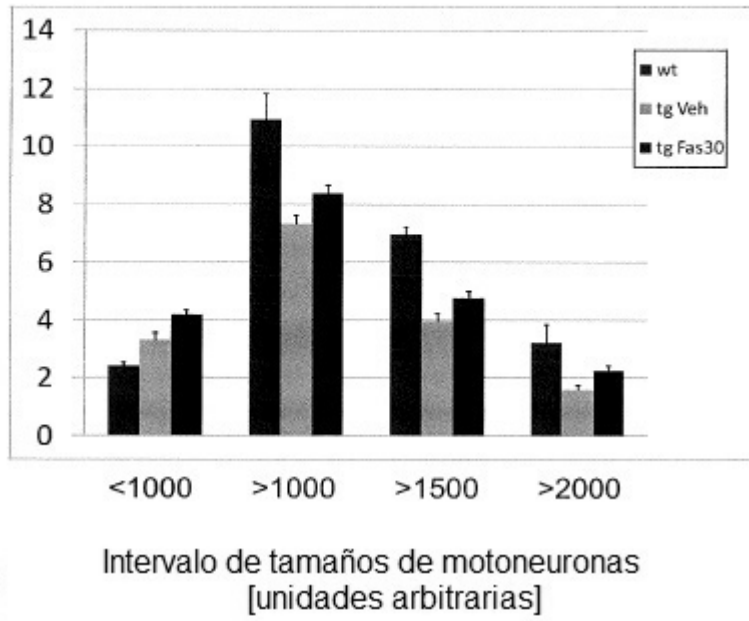


**Figura 8**



Células positivas a ChAT/asta anterior

**Figura 9**



Tamaño acumulativo de células positivas a ChAT/ asta anterior [unidades arbitrarias]

**Figura 10**

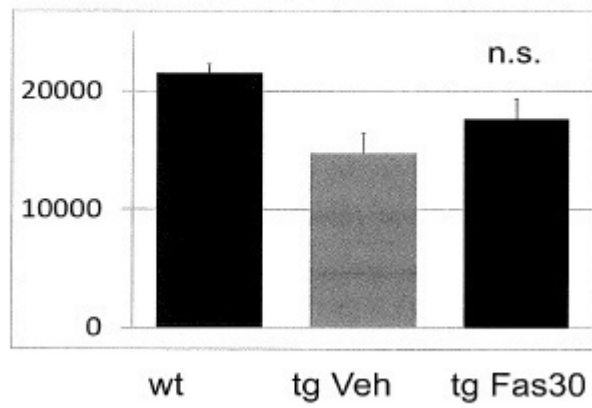
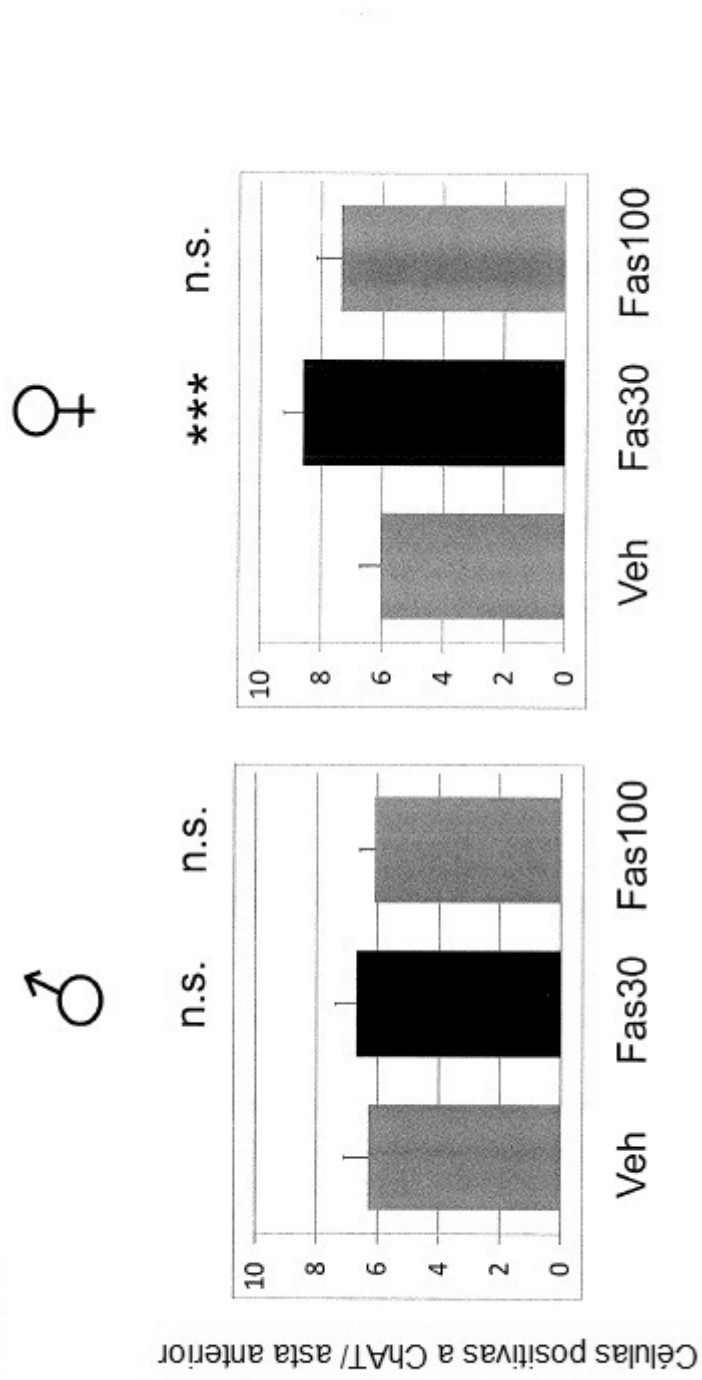
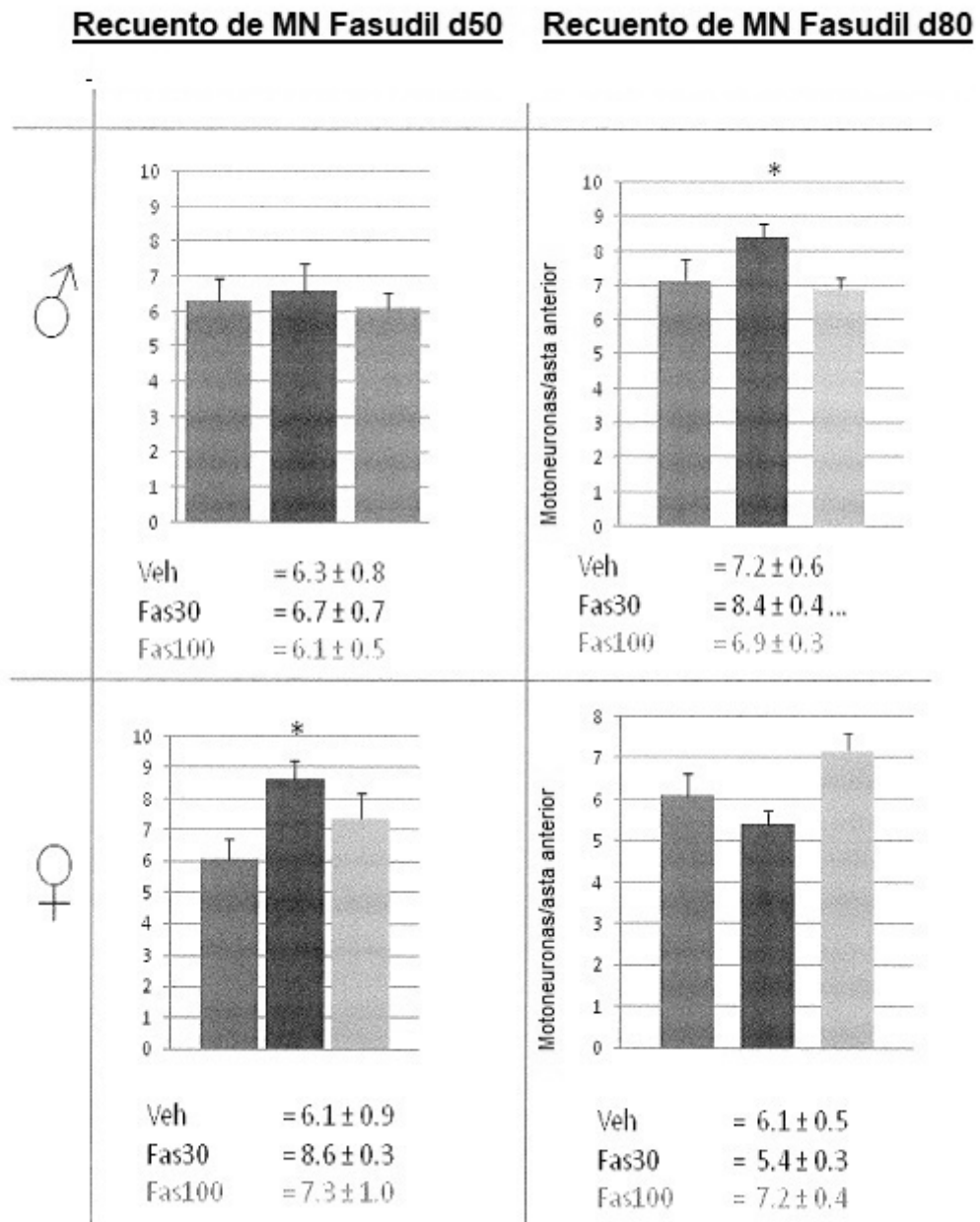


Figura 11a



Células positivas a ChAT/ asta anterior

Figura 11b





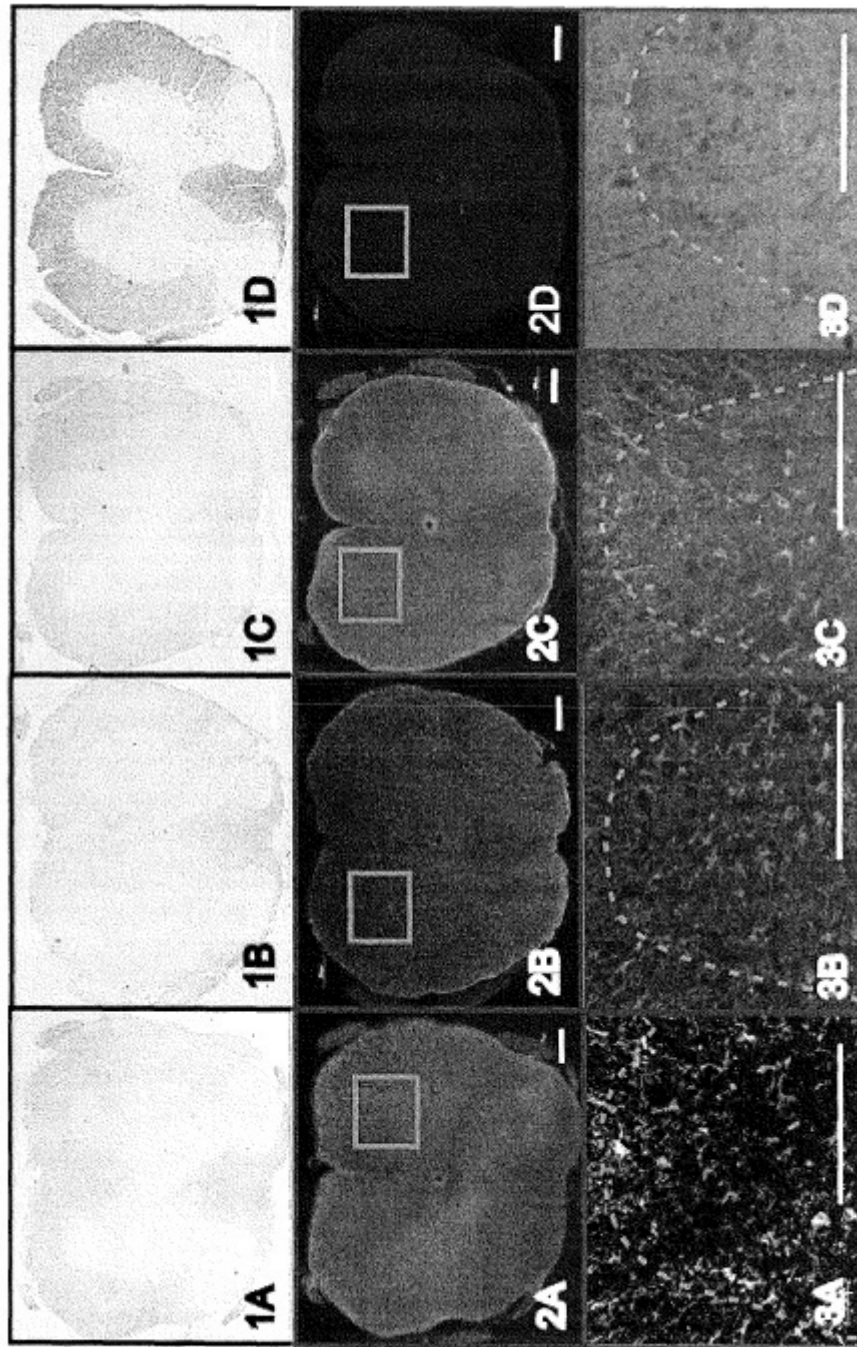
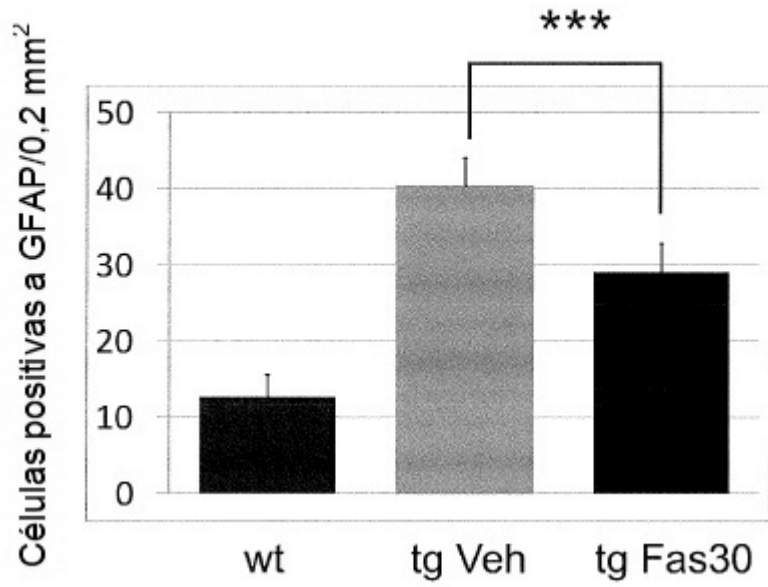
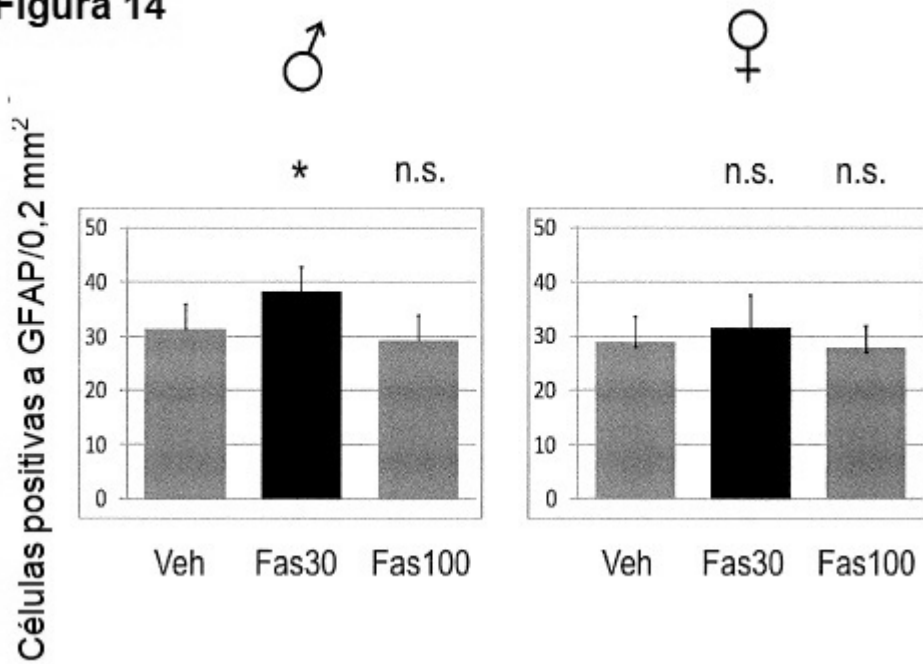


Figura 12

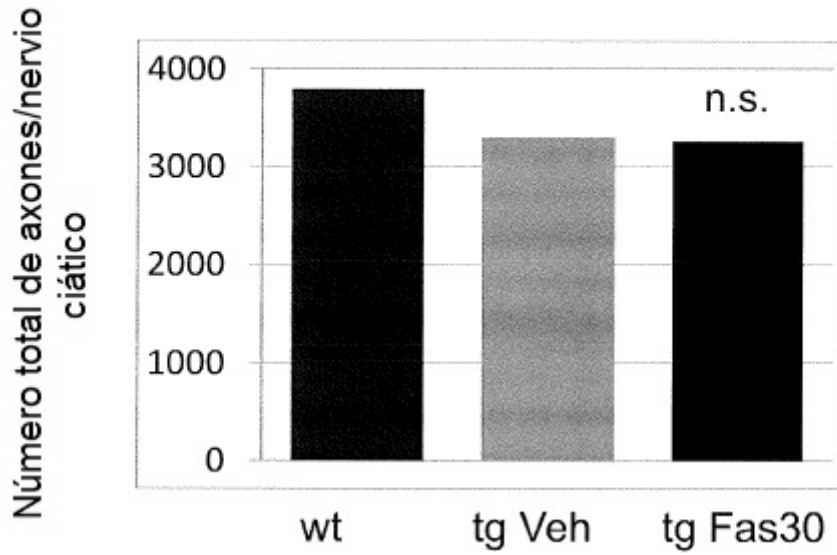
**Figura 13**



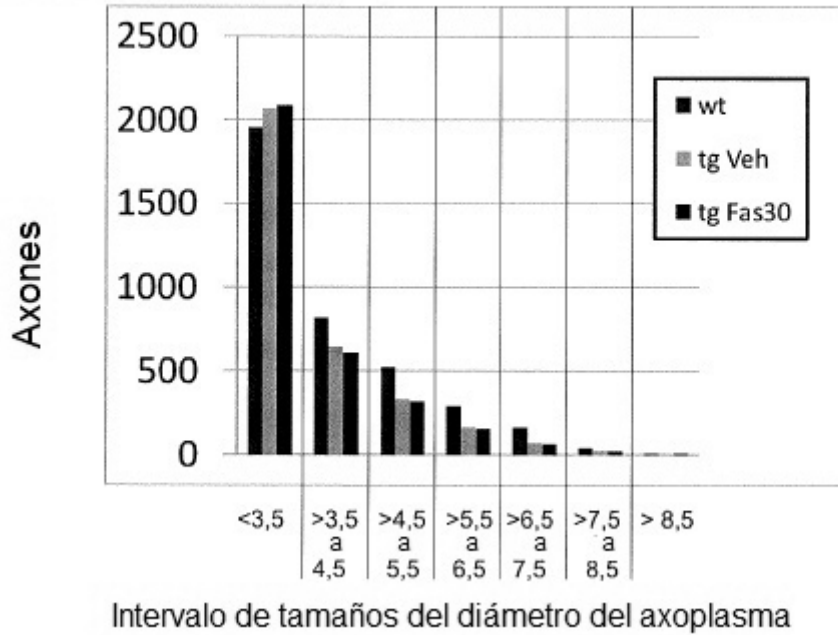
**Figura 14**



**Figura 15**

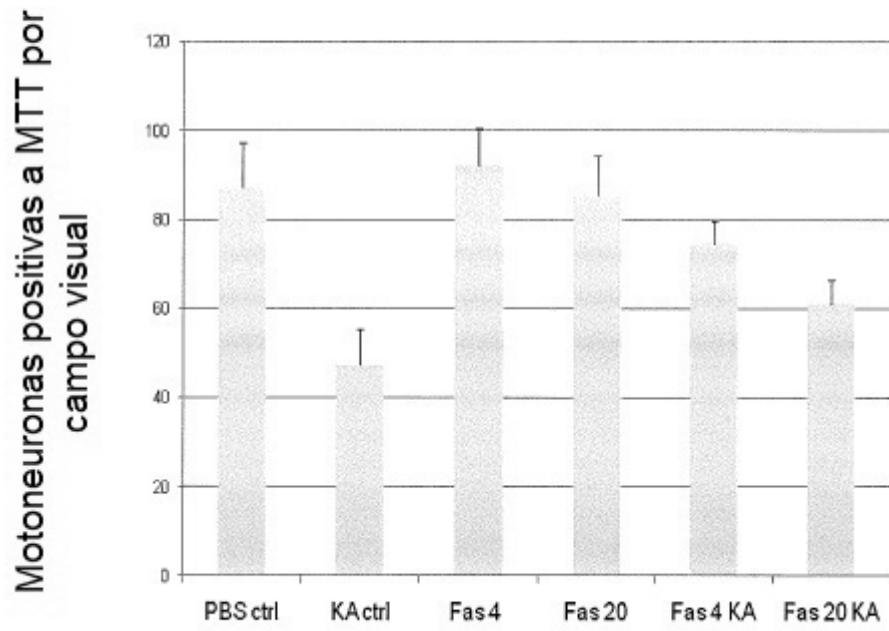


**Figura 16**



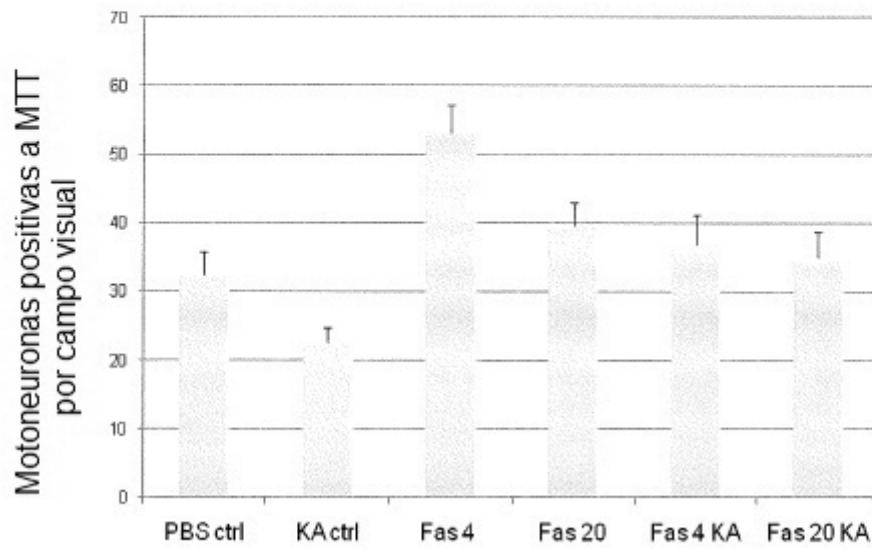
**Figura 17**

**Supervivencia de motoneuronas en astrocitos después de KA 125µM durante 24h en DIV7**

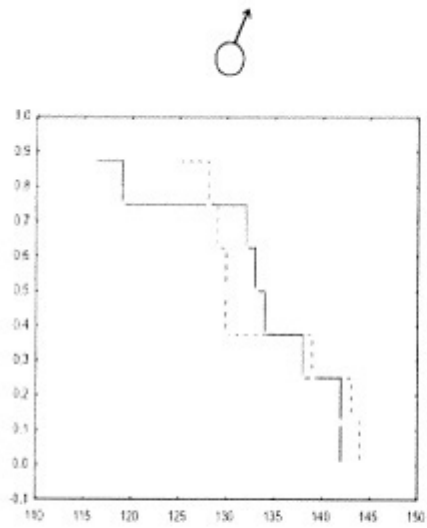


**Figura 18**

**Supervivencia de motoneuronas cultivadas con medio acondicionado con astrocitos después de KA 125µM durante 24h en DIV7**

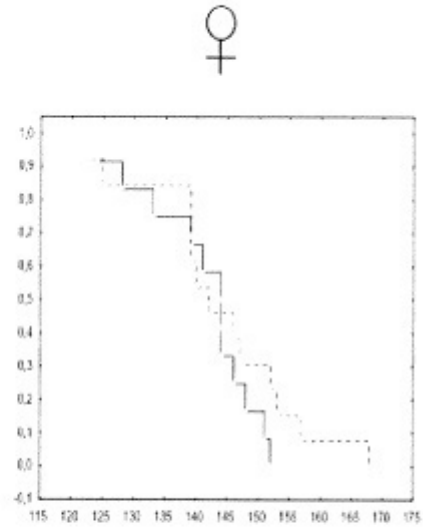


**Figura 19**



**Veh (n= 10) 132,0 días**  
**Y-27632 (n=10) 133,5 días**

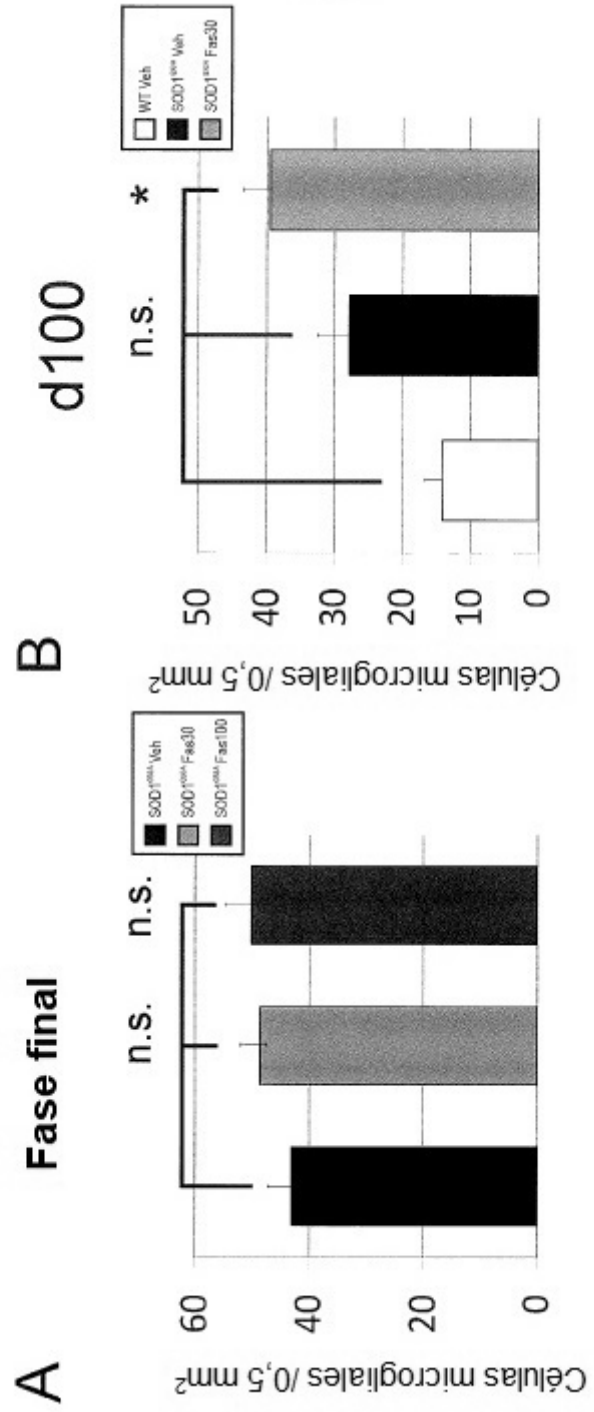
**Veh / Y-27632 p = n.s.**



**Veh (n= 10) 141,2 días**  
**Y-27632 (n= 10) 143,8 días**

**Veh / Y-27632 p = n.s.**

Figura 20



**Figura 20 (continuación)**

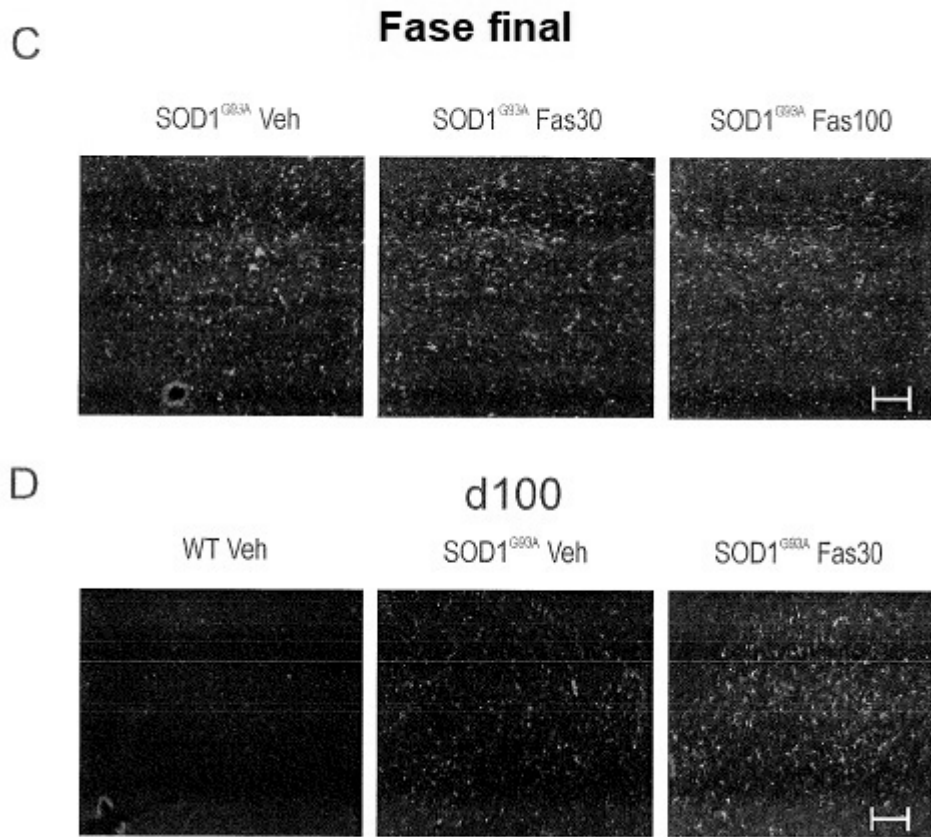




Figura 21

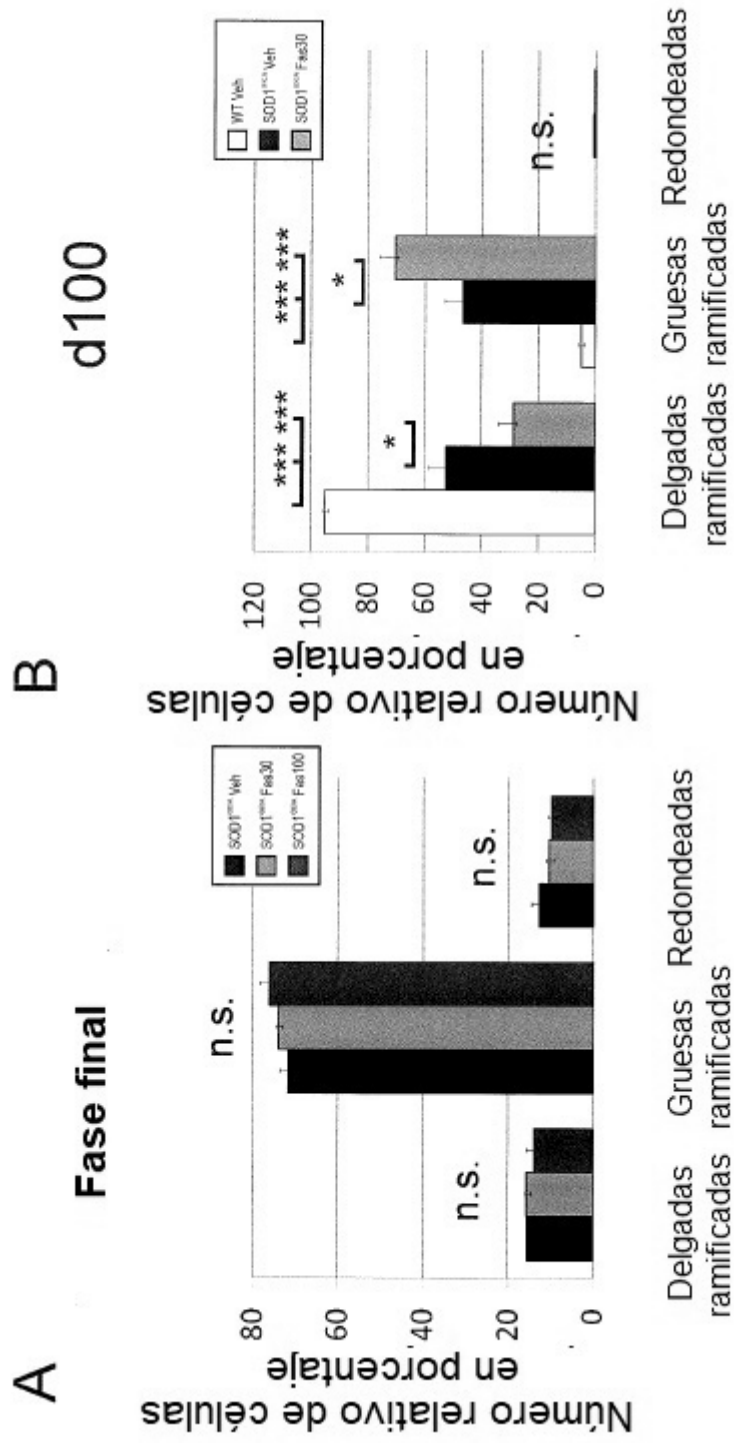
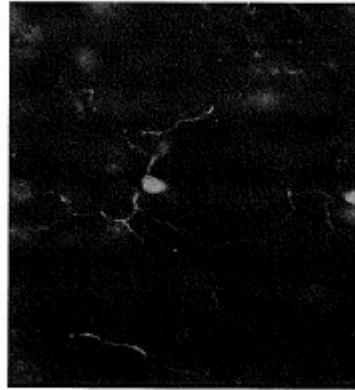


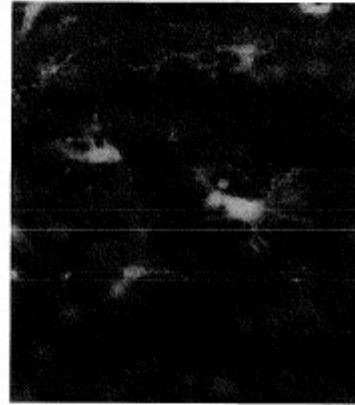
Figura 21 (continuación)

C

Delgadas ramificadas



Gruesas ramificadas



Redondeadas

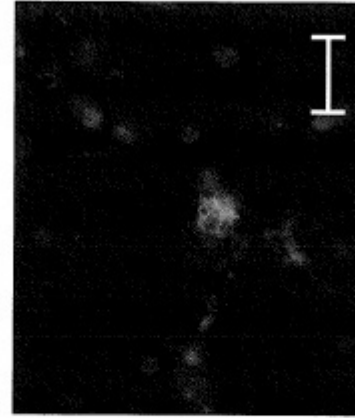
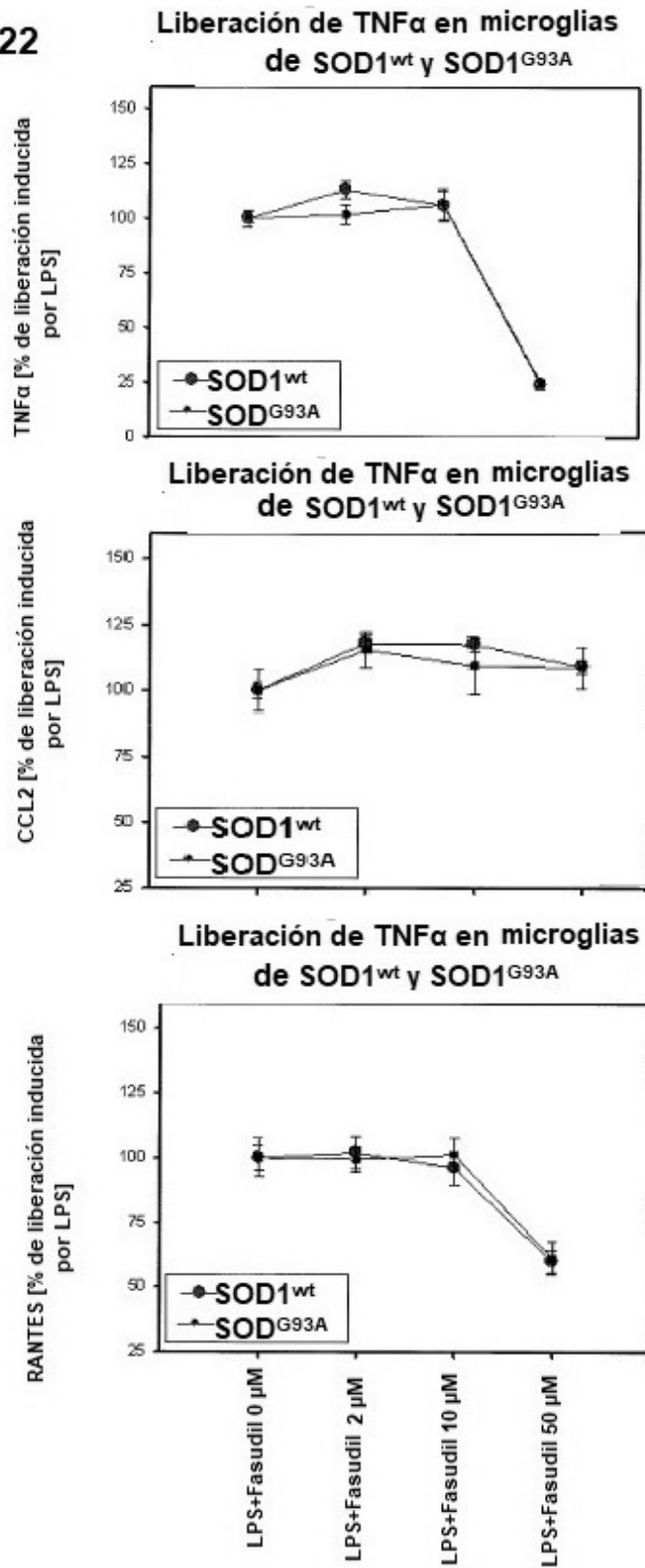


Figura 22



**Figura 22 (continuación)**

