

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 727**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4015** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2010 PCT/EP2010/065961**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11048208**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2010 E 10778589 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2490685**

54 Título: **Terapia causal de enfermedades o estados asociados con desmielinización del SNC o del SNP**

30 Prioridad:

**22.10.2009 US 253985 P**

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

**23.04.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE DUBLIN NATIONAL  
UNIVERSITY OF IRELAND, DUBLIN (100.0%)  
Belfield  
Dublin 4, IE**

72 Inventor/es:

**PICKERING, MARK y  
MURPHY, KEITH**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 664 727 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

Terapia causal de enfermedades o estados asociados con desmielinización del SNC o del SNP

5 **Campo técnico**

La invención se refiere al tratamiento de enfermedades o estados asociados con desmielinización del sistema nervioso central o periférico en un sujeto humano, según las reivindicaciones. En particular, la invención se refiere a una terapia causal de esclerosis múltiple (EM).

10

**Antecedentes de la invención**

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmunitaria que se produce cuando los linfocitos T invaden el SNC y dañan a los oligodendrocitos responsables del mantenimiento de las vainas de mielina axónicas, dando como resultado actividad neuronal afectada. La enfermedad está caracterizada sintomáticamente por diversos grados de disfunción visual, motora, de sensibilidad y cognitiva. La EM se clasifica en términos generales en cuatro categorías, definidas por el patrón de evolución de la enfermedad (Lublin y Reingold, 1996). Para la mayoría de los pacientes, la enfermedad comienza como EM remitente-recurrente, caracterizada por periodos de remisión espontánea entre recaídas sintomáticas. Esto evoluciona a menudo a una forma donde las remisiones cesan, dando como resultado deterioro neurológico continuo, un tipo clasificado como EM progresiva secundaria. En los casos en que no se produce remisión después de la aparición de la enfermedad y el posterior empeoramiento de los síntomas neurológicos, la enfermedad se clasifica como EM progresiva primaria. La categoría final, EM progresiva recurrente, es el subtipo menos común, y se caracteriza por un aumento constante en la gravedad de las disfunciones neurológicas, con ataques agudos superpuestos de mayor gravedad.

25

Aunque hay alguna evidencia de que los factores genéticos aumentan el riesgo de EM (Sadovnick, 1996), se desconoce el “desencadenante” que produce la enfermedad y la aparición no puede predecirse, lo que elimina la posibilidad de que se desarrollen estrategias preventivas en el futuro próximo. La tasa de prevalencia de la EM se ha estimado en aproximadamente 1 en 700, afectando a las mujeres aproximadamente dos veces la tasa de los varones, aunque las estimaciones de prevalencia varían enormemente dependiendo de la región (Rosait, 2001). Como enfermedad progresiva con incapacidad resultante considerable, el estado está asociado con un alto coste de la enfermedad, refiriéndose una proporción significativa a los costes en fármacos. En los EE.UU. en 2004, el 98,1% de todos los pacientes con EM usaron medicamentos con un coste medio de 18.628 \$ por paciente al año, de los cuales 16.050 \$ fueron el coste de fármacos modificadores de la enfermedad (Kobelt *et al.*, 2005). En Europa, el coste del tratamiento farmacológico es el más alto en la fase más temprana de la enfermedad, y varía entre países, desde 4.324 € por paciente al año en el reino Unido hasta 12.881 € en Alemania (Kobelt *et al.*, 2006). A pesar de este gasto significativo en el tratamiento, las terapias farmacéuticas actuales, que tienen todas ellas como objetivo el papel del sistema inmunitario en la enfermedad, se limitan a ralentizar el avance de la enfermedad o disminuir la tasa de recurrencia de la enfermedad, y son en gran medida ineficaces en el tratamiento de las formas de enfermedad progresiva.

30

35

40

Se sabe que los compuestos de 2-oxopirrolidina llevan a cabo una función cerebral (publicación de solicitud de patente japonesa n.º: 56.2960/1981). En particular, se ha sugerido en la bibliografía que nefiracetam (N-(2,6-dimetilfenil)-2-(2-oxo-1-pirrolidinil)acetamida) puede mejorar la función cerebral y la cognición (Moriguchi *et al.* 2009, Moriguchi *et al.* 2008), mejorar la capacidad intelectual después de accidente cerebrovascular (solicitud de patente estadounidense n.º: 2002/0055534), y tener efectos anticonvulsivantes y neuroprotectores en modelos animales (Kitano *et al.* 2005).

45

Striano *et al.* (Journal of Neurology, Steinkopff-Verlag, DA, vol. 253(6), págs. 762-766 (2006)) describen el uso de levetiracetam para su uso en el tratamiento de síntomas motores de la EM (temblor cerebeloso), pero el compuesto no mejoró ningún otro síntoma neurológico.

50

Un objeto de la invención es superar al menos uno de los problemas anteriores.

55 **Descripción de la invención**

La invención se basa en el sorprendente hallazgo de que compuestos de 2-oxopirrolidina (a continuación en el presente documento “principio activo”) pueden mantener la integridad (por ejemplo, prevenir la desmielinización y/o promover la remielinización) de las vainas de mielina axónicas en modelos celulares y animales de enfermedades asociadas con desmielinización del SNC o del SNP. Se proporcionan datos a continuación que muestran claramente que el principio activo acelera la reparación de mielina en células axónicas que se han dañado en un modelo animal de cuprizona de desmielinización, y restablece la expresión de mielina tras 6 días de tratamiento (véanse las figuras 4A a 4C). Se proporcionan también datos que muestran que los efectos del principio activo son un efecto no mediado por el sistema inmunitario (véanse las figuras 2 y 3) y que los efectos se logran usando cuatro especies diferentes de la clase de compuestos de 2-oxopirrolidina (véase la figura 1). Por tanto, la invención se refiere en términos generales al uso del principio activo en el tratamiento causal de una enfermedad producida por

60

65

desmielinización axónica, en el que el principio activo mantiene la integridad de la mielinización (por ejemplo promoviendo remielinización, y/o previniendo desmielinización, de las vainas axónicas), en el que la enfermedad es EM. La invención se refiere particularmente al tratamiento causal de enfermedades de desmielinización del SNC tal como se define en las reivindicaciones, es decir a la EM especialmente la EM progresiva primaria y/o la EM remitente-recurrente. El principio activo de la invención puede administrarse adecuadamente cuando un paciente está en recaída (es decir tras recaída), y continuarse mientras el paciente está en recaída, con el fin de atenuar la gravedad de la recaída, y/o de acelerar la remisión de la enfermedad. Alternativamente, el principio activo puede administrarse de manera continua con el fin de prolongar el periodo de remisión, y/o atenuar la gravedad de la recaída, y/o prevenir la recaída. La invención también se refiere al uso del principio activo como tratamiento para los síntomas de la enfermedad de desmielinización reivindicada, es decir la EM, seleccionados de deficiencias visuales, deficiencias de control motor y deficiencias de sensibilidad. Por consiguiente, la invención se refiere en términos generales a un compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso en el tratamiento causal o la prevención de una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en un mamífero manteniendo la integridad de mielinización de las células axónicas, tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. En esta memoria descriptiva, el término "mantener la integridad de mielinización de las células axónicas" debe entenderse que significa llevar a cabo remielinización de las células axónicas, inhibir o impedir la desmielinización de las células axónicas, o ambas cosas. El término tratamiento "causal" debe entenderse que significa un tratamiento de desmielinización como causa subyacente de la enfermedad, y para excluir tratamientos que tienen por objeto abordar directamente los síntomas clínicos de la enfermedad (tratamiento sintomático). En otro aspecto, la invención se refiere en términos generales a una combinación de un compuesto de 2-oxopirrolidina y un inmunosupresor para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en un mamífero manteniendo la integridad de mielinización de las células axónicas, tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso en tratar una recaída, especialmente una recaída aguda, de una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en un mamífero manteniendo la integridad de mielinización de las células axónicas, tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se administra al mamífero una cantidad clínicamente eficaz del compuesto de 2-oxopirrolidina tras recaída de la enfermedad o el estado. Preferiblemente, la administración de la cantidad clínicamente eficaz del compuesto de 2-oxopirrolidina se continúa durante un periodo de recaída de la enfermedad o el estado y preferiblemente se interrumpe tras la remisión de la enfermedad o el estado.

En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso en prolongar un periodo de remisión de una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en un mamífero manteniendo la integridad de mielinización de las células axónicas, tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se administra una cantidad clínicamente eficaz de un compuesto de 2-oxopirrolidina al mamífero durante un periodo de remisión de la enfermedad o el estado. Preferiblemente, la administración de la cantidad clínicamente eficaz del compuesto de 2-oxopirrolidina se continúa durante un periodo de recaída de la enfermedad o el estado.

En otro aspecto, la invención se refiere a una terapia no mediada por el sistema inmunitario (preferiblemente una terapia causal no mediada por el sistema inmunitario) para una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en un mamífero, especialmente esclerosis múltiple (EM), especialmente EM primaria progresiva. Se administra una cantidad clínicamente eficaz de un compuesto de 2-oxopirrolidina al mamífero en una cantidad suficiente para dar como resultado una remielinización, o inhibición de desmielinización, clínicamente significativa, de las vainas axónicas en el mamífero. El término "terapia no mediada por el sistema inmunitario" debe entenderse que significa una terapia que no está orientada a la disminución de la respuesta inmunitaria en el mamífero.

En una realización, los usos de la invención comprenden una terapia de combinación o uso que comprende la administración de un compuesto de 2-oxopirrolidina en paralelo con la administración de un producto terapéutico mediado por el sistema inmunitario. Los términos "producto terapéutico mediado por el sistema inmunitario" o "inmunosupresor" se usan intercambiamente y debe entenderse que significan un producto terapéutico causal que tiene como objetivo modular la respuesta inmunitaria en un mamífero para prevenir, inhibir o mejorar la desmielinización de las vainas axónicas de células neuronales del SNC o del SNP. Ejemplos de productos terapéuticos mediados por el sistema inmunitario o inmunosupresores se conocen bien en el campo, e incluyen natalizumab o TYSABRI (Elan), interferón beta 1b (BETASERON), interferón beta 1a (AVONEX), acetato de glatirámico o COPAXONE (Teva) y daclizumab (ZENEMAX).

El compuesto de 2-oxopirrolidina puede administrarse al mismo tiempo que el producto terapéutico mediado por el sistema inmunitario, o los dos medicamentos pueden administrarse de manera escalonada. En una realización, el compuesto de 2-oxopirrolidina y el producto terapéutico mediado por el sistema inmunitario se proporcionan en una forma de dosis unitaria individual, por ejemplo, un líquido o comprimido o similar.

Por tanto, en una realización adicional, la invención se refiere a una terapia de combinación para una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP)

en un mamífero, por ejemplo esclerosis múltiple, comprendiendo la terapia de combinación el uso de (a) un producto terapéutico mediado por el sistema inmunitario para disminuir o suprimir una respuesta mediada por el sistema inmunitario en el mamífero en tándem con (b) un principio activo para promover la remielinización de neuronas del SNC o del SNP.

5 En un aspecto, la invención se refiere al uso del compuesto de 2-oxopirrolidina en el tratamiento causal de enfermedades o estados asociados con desmielinización del SNC o del SNP en un sujeto humano inhibiendo, mejorando o revirtiendo la desmielinización de células neuronales del SNC o del SNP, administrando al sujeto una cantidad del compuesto de 2-oxopirrolidina eficaz para producir un nivel de inhibición, mejora o reversión  
10 clínicamente significativo de la desmielinización de células neuronales del SNC o del SNP, tal como se expone en las reivindicaciones. En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso en inhibir, mejorar o revertir la desmielinización de células del SNC o del SNP en un sujeto humano en necesidad de ello, en el que se administra una cantidad eficaz del compuesto de 2-oxopirrolidina al sujeto para inhibir, mejorar o revertir la desmielinización de una célula neuronal del SNC o del SNP, según las reivindicaciones. En otro aspecto,  
15 la invención se refiere a un compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso en prevenir o ralentizar la progresión de enfermedades o estados asociados con desmielinización del SNC o del SNP en un sujeto humano inhibiendo, mejorando o revirtiendo la desmielinización de células del SNC o del SNP, en el que se administra una cantidad eficaz del compuesto de 2-oxopirrolidina eficaz para inhibir, mejorar o revertir la desmielinización de células neuronales del SNC o del SNP, según las reivindicaciones. En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso en el tratamiento de uno o más síntomas de una enfermedad o un estado reivindicado asociado con desmielinización del SNC o del SNP en un sujeto humano, se administra al sujeto una cantidad del compuesto de 2-oxopirrolidina se administra eficaz para inhibir, mejorar o revertir la desmielinización de un tipo celular del SNC o del SNP. Los síntomas se seleccionan normalmente del grupo que consiste en deficiencias visuales, deficiencias del control motor, deficiencias de sensibilidad y deficiencias de la función cognitiva. En una  
20 realización preferida, los síntomas se seleccionan de deficiencias visuales, de control motor y de sensibilidad.

En una realización preferida de la invención, el principio activo es nefiracetam. Según la invención, el estado asociado con desmielinización del SNC o del SNP es EM. Por tanto, en una realización particularmente preferida, la invención se refiere a un compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso en tratar causalmente uno o más síntomas de EM en un mamífero seleccionados de deficiencias visuales, deficiencias de sensibilidad y deficiencias de control motor promoviendo la remielinización y/o inhibiendo la desmielinización de las vainas de mielina axónicas, en el que se administra una cantidad clínicamente eficaz de un compuesto de 2-oxopirrolidina al sujeto.

En una realización adicional particularmente preferida, la invención se refiere a un compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso en tratar EM primaria progresiva en un sujeto humano, especialmente el tratamiento sintomático de deficiencias visuales, deficiencias de sensibilidad y/o deficiencias de control motor, y opcionalmente deficiencias de la función cognitiva, en el que se administra una cantidad de nefiracetam eficaz para inhibir, mejorar o revertir la desmielinización de células axónicas en el SNC al sujeto.

En una realización adicional particularmente preferida, la invención se refiere a un compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso en tratar causalmente uno o más síntomas de EM primaria progresiva en un sujeto humano seleccionados de deficiencias visuales, deficiencias de sensibilidad y deficiencias de control motor y opcionalmente deficiencias de la función cognitiva, en el que se administra una cantidad de nefiracetam eficaz para inhibir, mejorar o revertir la desmielinización de células axónicas en el SNC al sujeto.

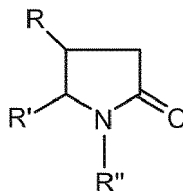
La invención también se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una terapia de combinación de un producto terapéutico mediado por el sistema inmunitario del tipo que puede reducir la duración y/o el grado de daño mediado por inflamación para aislar células alrededor de las fibras nerviosas, y un principio activo, tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Una formulación de este tipo será especialmente adecuada para el tratamiento causal o sintomático, o para la prevención de enfermedades o estados autoinmunitarios desmielinizantes.

La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de 2-oxopirrolidina y un producto terapéutico inmunosupresor, en combinación con un portador o diluyente farmacéutico adecuado para su uso en el tratamiento causal o la prevención de una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP), tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

En esta memoria descriptiva, el término "cantidad clínicamente eficaz" debe entenderse que significa una cantidad de principio activo que da como resultado una inhibición, mejora o reversión de desmielinización clínicamente significativa, o una remielinización clínicamente significativa, de células neuronales del SNC o del SNP. Se describen en la bibliografía detalles de dosificaciones de nefiracetam que se toleran fácilmente y se administran por vía oral fácilmente (Robinson *et al.* 2009). De manera adecuada, el principio activo se administra a una dosis de entre 1 microgramo y 50 miligramos diariamente, de manera preferible entre 1 miligramo y 40 miligramos diariamente, de manera más preferible entre 5 miligramos y 40 miligramos diariamente.

Se describen compuestos de 2-oxopirrolidina (el "principio activo") en la publicación de solicitud de patente japonesa n.º: 56.2960/1981 y la publicación de solicitud de patente internacional n.º: WO2006113937. Por tanto, en esta memoria descriptiva, el término "compuesto de 2-oxopirrolidina" o "principio activo" se refiere a un compuesto de fórmula general I:

5



en la que R es hidrógeno, hidroxilo o aminometilo;

10 R' es hidrógeno o grupo piperidinocarbonilo;

R'' es hidrógeno, aminocarbonilalquilo opcionalmente N-sustituido con un grupo dialquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-amino-alquilo (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>), anilincarbonilalquilo opcionalmente mono o disustituido en el anillo de benceno con metilo, metoxilo o halógeno; bencilo, opcionalmente mono o disustituido en el anillo de benceno con metilo, metoxilo o halógeno;

15

en la que uno o dos de R, R' y R'' es hidrógeno; con las condiciones de que cuando R' es distinto de hidrógeno, entonces R y R'' son ambos hidrógeno, y cuando R es distinto de hidrógeno, entonces R' es hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 Ejemplos de compuesto de 2-oxopirrolidina de fórmula general (I) útiles para la presente invención son:

Piracetam: en el que R=R'=H, R''=CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> (aminocarbonilmetilo);

Aniracetam: en el que R=R'=H, R''=CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-pOCH<sub>3</sub> (4-metoxibencilo);

25

Oxiracetam: en el que R=OH, R'=H; R''=CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>;

Pramiracetam: en el que R=R'=H, R''=CH<sub>2</sub>CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N[CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>, (2-disiopropilaminoetil)aminocarbonilmetilo;

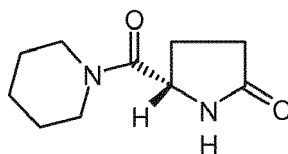
30 Nefiracetam: en el que R=R'=H, R''=CH<sub>2</sub>CONH-(2,6CH<sub>3</sub>)C<sub>6</sub>H<sub>3</sub> (anilincarbonilmetilo);

Nebracetam: en el que R=CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (aminometilo), R'=H; R''=CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (bencilo);

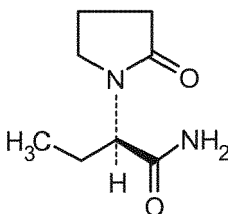
Fasoracetam: en el que R=R''=H, R'=piperidinocarbonilo;

35

Fasoracetam: en el que R=R''=H, R'=piperidinocarbonilo (véase a continuación);



40 Levetiracetam, en el que R=R'=H; R''=1-aminocarbonilpropilo (véase a continuación).



45 Otros compuestos de tipo racetam incluidos dentro del alcance de la invención incluyen fenilpiracetam (Carphedon), etiracetam, nicoracetam (estructura de racetam unida a niacina), rolziracetam, nebracetam, imuracetam, coluracetam (posible uso en la prevención y el tratamiento de retinopatía isquémica y lesión retiniana y del nervio óptico), dimiracetam, brivaracetam y seletracetam.

En una realización preferida, el principio activo se selecciona del grupo que consiste en: piracetam, aniracetam,

pramiracetam, nebracetam, fasoracetam, levetiracetam y oxiracetam. De manera ideal, el principio activo se selecciona del grupo que consiste en piracetam, aniracetam, levetiracetam y nefiracetam. De manera ideal, el principio activo es nefiracetam (N-(2,6-dimetilfenil)-2-(2-oxo-1-pirrolidinil)acetamida).

5 El término “enfermedades o estados asociados con desmielinización del SNC o del SNP” debe entenderse que significa una patología en la que la desmielinización axónica de tipos de células neuronales del SNC o del SNP es una causa subyacente de los síntomas de la patología. Los ejemplos de estas enfermedades/estados incluyen enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central tales como: esclerosis múltiple incluyendo EM remitente-recurrente (EMRR), EM progresiva primaria, EM progresiva secundaria y EM progresiva recurrente; 10 enfermedades desmielinizantes inflamatorias idiopáticas; mielitis transversa; enfermedad de Devic; leucoencefalopatía multifocal progresiva; neuritis óptica; y leucodistrofias y enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso periférico tales como: síndrome de Guillain-Barré y su equivalente crónico, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; neuropatía periférica con anticuerpos anti-MAG; enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; y deficiencia de vitamina B12 (cambio--> la deficiencia de B12 produce degeneración combinada subaguda de la médula espinal... la médula espinal es parte del SNC, la enfermedad es “combinada” b/c de desmielinización de las columnas dorsales (sensación de vibración y propiocepción disminuidas) y síntomas de enfermedad de las neuronas motoras superiores del tracto corticoespinal.

En una realización, la enfermedad o los estados son unos asociados con desmielinización del SNC. En otra 20 realización, la enfermedad o los estados están asociados con desmielinización del SNP.

En esta memoria descriptiva, el término “administrar” debe entenderse que incluye cualquier forma de administración que pueda administrar el principio activo al SNC o al SNP, incluyendo administración intravenosa, administración oral, administración intramuscular, administración intratecal y administración inhalada. Los métodos para lograr estos 25 medios de administración los conocerán bien los expertos en la técnica de administración de fármacos, e incluyen:

- administrados por vía intratecal mediante minibomba osmótica (ref.: Ignacio *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 2005, 1053: 121-136).
- 30 • administración intramuscular directamente dentro del/de los músculo(s) mediante jeringuilla o minibomba osmótica (Azzouz *et al.*, Nat Med. 2005; 11(4):429-33).
- administración intraperitoneal (para administración sistémica) administrada directamente al peritoneo mediante jeringuilla o minibomba osmótica (Kieran *et al.*, Nat Med 2004; 10(4):402).
- 35 • administración subcutánea (para administración sistémica) administrada directamente bajo la piel mediante jeringuilla (Reinholz *et al.*, Exp Neurol. 1999; 159(1):204-16).
- administración intraventricular (administración directa a los ventrículos en el cerebro), mediante inyección o usando un catéter pequeño unido a una bomba osmótica. (Sathasivam *et al.*, 2005 Neuropath App Neurobiol; 31(5): 467).
- 40 • implante (puede prepararse en un implante (por ejemplo implante de silicio pequeño) que liberará el principio activo. El implante puede colocarse en músculos o directamente sobre la médula espinal (Kieran y Greensmith, 2004 Neurosci 125(2):427-39).

Adicionalmente, en las siguientes publicaciones se describe la administración de un principio activo a seres humanos y animales:

- 50 • Feys P, D'hooghe MB, Nagels G, Helsen WF. The effect of levetiracetam on tremor severity and functionality in patients with multiple sclerosis. Mult Scler. 2009 Mar; 15(3):371-8. Epub 23 de junio de 2009. PubMed PMID: 19168602.
- Groom AJ, Smith T, Turski L. Multiple sclerosis and glutamate. Ann N Y Acad Sci. Mayo de 2003; 993:229-75; discusión 287-8.
- 55 • Gusev EI, Bo ko AN, Kol'iak EV, Karalkin AV, Kamchatov PR, Martynov Mlu. [The impact of microcirculation dysfunction on the clinical presentations of multiple sclerosis in patients above 45 years and the possible ways of correction of the vascular pathology]. Zh Nevrol Psikiatr Im S S Korsakova. 2008; 108(5):25-31. Russian. PubMed PMID: 18577954.
- 60 • Hawker K, Frohman E, Racke M. Levetiracetam for phasic spasticity in multiple sclerosis. Arch Neurol. Diciembre de 2003; 60(12):1772-4. PubMed PMID: 14676055.
- 65 • Le DT, Shin C, Jackson-Friedman C, Lyden PD. (2001) Quantitative effects of nefiracetam on spatial learning of rats after cerebral embolism. J Stroke Cerebrovasc Dis. 10:99-105.

- Mula M, Sander JW. Negative effects of antiepileptic drugs on mood in patients with epilepsy. *Drug Saf.* 2007; 30(7):555-67. Review. PubMed PMID: 17604407.
- 5 • Murphy KJ, Foley AG, O'connell AW, Regan CM. (2006) Chronic exposure of rats to cognition enhancing drugs produces a neuroplastic response identical to that obtained by complex environment rearing. *Neuropsychopharmacology.* 31:90-100.
- 10 • Papacostas SS, Papathanasiou ES, Myrianthopoulou P, Stylianidou G. Tuberous sclerosis successfully treated with levetiracetam monotherapy: 18 months of follow-up. *Pharm World Sci.* Agosto de 2007; 29(4):350-2. Epub 1 de marzo de 2007. PubMed PMID: 17333500.
- 15 • Rossi S, Mataluni G, Codecà C, Fiore S, Buttari F, Musella A, Castelli M, Bernardi G, Centonze D. Effects of levetiracetam on chronic pain in multiple sclerosis: results of a pilot, randomized, placebo-controlled study. *Eur J Neurol.* Marzo de 2009; 16(3):360-6. PubMed PMID: 19364364.
- 20 • Solaro C, Brichetto G, Capello E, Abuarqub S, Sanguineti V. Activity, tolerability and efficacy of levetiracetam on cerebellar symptoms in multiple sclerosis patients: a pilot kinematic study. *Eur J Neurol.* Junio de 2008; 15(6):619-26. PubMed PMID: 18474077.
- 25 • Striano P, Coppola A, Vacca G, Zara F, Brescia Morra V, Orefice G, Striano S. Levetiracetam for cerebellar tremor in multiple sclerosis: an open-label pilot tolerability and efficacy study. *J Neurol.* Junio de 2006; 253(6):762-6. Epub 12 de mayo de 2006. PubMed PMID: 16683063.
- Takeo S, Niimura M, Miyake-Takagi K, Nagakura A, Fukatsu T, Ando T, Takagi N, Tanonaka K, Hara J (2003) A possible mechanism for improvement by a cognition-enhancer nefiracetam of spatial memory function and cAMP-mediated signal transduction system in sustained cerebral ischaemia in rats. *Br J Pharmacol.* 138:642-54.
- 30 • Ueda M, Fujita R, Koji T, Ueda H. (2004) The cognition- enhancer nefiracetam inhibits both necrosis and apoptosis in retinal ischemic models in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 309:200-7.
- 35 • Zhao X, Yeh JZ, Narahashi T. Post-stroke dementia. (2001) Nootropic drug modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 939:179-86.
- Documento US2001/0041734 A1 *Method of treating traumatic brain injury and other neuronal disorders.*
- Documento US2002/0055534 A1 *Method for treating neurodegeneration.*
- Documento US6348489 *Method of treating traumatic brain injury and other neuronal disorders.*
- 40 • Documento US6420416 *Method of treating epilepsy.*
- Documento US6423739 *Method for aiding cerebral recovery following neurodegeneration.*
- 45 • Documento US2001/0051653 A1 *Method for improving disturbances of activities of daily living after stroke.*
- Documento US6399650 *Method for improving disturbances of activities of daily living after stroke.*
- Documento WO2003/030900 *REMEDIES FOR ATTENTION DEFICIENT/HYPERREACTIVITY DISORDER.*
- 50 • Documento WO2001/076596 *MEDICINE FOR TREATING TRAUMATIC BRAIN INJURY AND OTHER NEURONAL DISORDERS.*
- Documento US2004/0192759 A1 *Use of nefiracetam for treating neurodegeneration.*
- 55 • Documento US2008/0076820 A1 *METHOD FOR TREATING NEURODEGENERATION.*
- Documento US2006/0241144 A1 *Method for treating apathy syndrome.*
- 60 • Documento EP1171123 B1 *METHOD FOR TREATING NEURODEGENERATION.*
- Documento WO2001/062246 A1 *METHOD FOR TREATING NEURODEGENERATION.*
- Documento WO2006/113937 A2 *METHOD FOR TREATING APATHY SYNDROME.*
- 65 • Documento WO2006/113937 A3R4 *METHOD FOR TREATING APATHY SYNDROME.*

- Documento EP1420782 B1 *USE OF NEFIRACETAM FOR TREATING POST-STROKE NEURODEGENERATION.*
- Documento WO2003/018005 A1 *Use of nefiracetam for treating neurodegeneration.*

5 En una realización, el principio activo se formula para administración oral y contiene entre 1 y 50 mg de principio activo. Los componentes inactivos incluyen lactosa monohidratada, celulosa microcristalina, almidón pregelatinizado, croscarmelosa de sodio, estearato de magnesio, hipromelosa, polietilenglicol, polisorbato 80 y dióxido de titanio. Alternativamente, los componentes inactivos pueden incluir dióxido de silicio coloidal, crospovidona, hipromelosa, lactosa monohidratada, estearato de magnesio, polietilenglicol, polisorbato 80, povidona, almidón pregelatinizado y dióxido de titanio.

15 En esta memoria descriptiva, el término “terapia de combinación” debe entenderse que significa que las dos terapias (terapia mediada por el sistema inmunitario y terapia de remielinización mediada por principio activo) se llevan a cabo al mismo tiempo en el mamífero. Por tanto, los dos agentes farmacéuticamente activos (por ejemplo un producto terapéutico mediado por el sistema inmunitario tal como TYSABRI y un principio activo tal como nefiracetam) pueden coadministrarse a un individuo, en forma de una formulación individual, pueden ser una forma sólida o líquida, o pueden proporcionarse como fármacos físicamente independientes que se coadministran al individuo, o pueden administrarse a intervalos escalonados.

20 En esta memoria descriptiva, el término “composición farmacéutica” debe entenderse que significa composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un principio activo y un inmunosupresor (tal como se definió anteriormente) y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los EE.UU. o en otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto de 2-oxopirrolidina. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, vaselina líquida, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Pueden emplearse también soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, agua, leche desnatada en polvo, glicerol y propilenglicol.

35 La composición, si se desea, puede contener también cantidades pequeñas de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación sostenida.

40 La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del producto terapéutico, preferiblemente en forma purificada, conjuntamente con una cantidad adecuada de portador con el fin de proporcionar la forma para administración apropiada al paciente.

50 En una realización preferida, la composición se formula según procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede incluir también un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los componentes se suministran bien por separado o bien mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o como concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o bolsita indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición va a administrarse mediante infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Donde la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de tal forma que los componentes pueden mezclarse antes de la administración.

60 En una realización preferida de la invención, el mamífero es un ser humano, normalmente un ser humano que padece una enfermedad o estado caracterizado por desmielinización de células neuronales del SNC o del SNP (es decir una enfermedad de desmielinización) tal como EM.

### Breve descripción de las figuras

65 Figura 1: Reparación acelerada de desmielinización inducida por LPC en cultivo de cortes organotípicos de hipocampo es una propiedad de los compuestos de tipo racetam en general. Panel A: imágenes representativas que



muestran la disminución persistente en proteína básica de mielina (PBM; verde) en cortes tratados con LPC en comparación con 24 horas después del tratamiento con LPC de control. Nefiracetam, piracetam, aniracetam y levetiracetam restablecieron todos ellos la expresión de PBM a los niveles de control o superiores. Panel B: cuantificación del efecto de LPC sobre la expresión de PBM en modelo de cultivo de cortes y de la capacidad de los compuestos de tipo racetam para restablecer la expresión de PBM a los niveles normales. Los datos son la media  $\pm$  EEM en porcentaje del campo de visión positivo para PBM,  $6 \leq n \leq 9$ . \* Significativamente diferente (prueba de la t de Student,  $p < 0,05$ ) del control antes de LPC. † Significativamente diferente (prueba de la t de Student,  $p < 0,05$ ) del control tratado con solución salina.

Figura 2: Efecto de nefiracetam en el modelo animal de EAE de esclerosis múltiple. Panel A: diseño del estudio. El panel B muestra la magnitud y el desarrollo cronológico de los síntomas clínicos en el modelo de EAE en controles tratados con solución salina y animales tratados con nefiracetam desde el día de inoculación con PBM. Los datos son la media  $\pm$  EEM de la puntuación clínica,  $n=5$ . No se observó ninguna diferencia significativa.

Figura 3: Efecto de nefiracetam en el modelo animal de EAE de esclerosis múltiple. Panel A: diseño del estudio. El panel B muestra la magnitud y el desarrollo cronológico de los síntomas clínicos en el modelo de EAE en controles tratados con solución salina y animales tratados con dosis crecientes de nefiracetam (9, 15 y 30 mg/kg) desde la aparición de los síntomas clínicos. Los datos son la media  $\pm$  EEM de la puntuación clínica,  $n = 5$ . No se observaron diferencias significativas.

Figura 4: Nefiracetam acelera la reparación de mielina en el modelo animal de cuprizona. Panel A: diseño del estudio. Panel B: imágenes representativas que muestran mielinización disminuida (tinción oscura) en el cuerpo caloso de los ratones C57BL/6 adultos tras 6 semanas con una dieta de cuprizona (al 0,2% peso/peso). Panel C: cuantificación del efecto de cuprizona sobre la expresión de mielina y su recuperación 1, 3 y 7 días tras volver a la dieta normal. El tratamiento con nefiracetam (30 mg/kg/día) restableció completamente los niveles de mielina a niveles normales en el punto de tiempo del día 1. Los datos son la media  $\pm$  EEM de la densidad de mielina en unidades arbitrarias,  $7 \leq n \leq 10$ .

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el uso de compuestos de 2-oxopirrolidina ("principio activo"), especialmente nefiracetam, como tratamiento no inmunomodulador para enfermedades desmielinizantes, especialmente EM, en el que el principio activo actúa para mantener la integridad de mielinización. Este enfoque terapéutico es distinto de todos los fármacos modificadores de la enfermedad usados actualmente en el tratamiento de EM, y es también aplicable para enfermedades desmielinizantes no autoinmunitarias, tales como Charcot Marie Tooth de tipo 1 (CMT1). Nefiracetam, un miembro de la familia de los compuestos de tipo racetam de fármacos nootrópicos, se conoce principalmente por su capacidad para potenciar la función cognitiva, que se cree que se debe a su modulación de receptores de NMDA colinérgicos, nicotínicos y glutamatérgicos (Narahashi *et al*, 2004). Los estudios clínicos han mostrado ya que nefiracetam se tolera bien y se administra fácilmente por vía oral en seres humanos (Robinson *et al*, 2009), lo que hace de él una interesante perspectiva para su aplicación en cohortes de pacientes anteriormente no señalados como objetivo.

#### Parte experimental

##### *Encefalitis autoinmunitaria experimental:*

Se usaron en este estudio un total de 20 ratas de Lewis hembra (de 180-200 g) propensas a desarrollar encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE). Los animales se mantuvieron con comida y agua a voluntad en un ciclo de 12 h de luz/12 horas de oscuridad durante todo el estudio. Bajo anestesia con isoflurano, cada rata recibió 100  $\mu$ l de una emulsión que contenía 50  $\mu$ g de PBM de cobaya, adyuvante incompleto de Freud y 0,2 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra, por medio de inyección subcutánea en la base de la cola. Comenzando a los 7 días después de la inducción de EAE, los animales recibieron diariamente inyecciones intraperitoneales de 9 mg/kg, 15 mg/kg, 30 mg/kg de nefiracetam o de vehículo solo ( $n = 5$  por grupo) hasta la finalización del estudio. Un observador ciego para el tratamiento pesó y valoró los animales para determinar sus síntomas clínicos dos veces al día. Las puntuaciones clínicas de los síntomas se asignaron basándose en los siguientes criterios: 0,5 = flaccidez de la parte distal de la cola; 1,0 = flaccidez de toda la cola; 1,5 = flaccidez de toda la cola con ligera alteración de la marcha; 2,0 = debilidad de las extremidades traseras (marcha de pato o arrastre de una pata); 2,5 = debilidad de las extremidades traseras (arrastre de una pata con alguna pérdida de la función de motilidad en la otra pata); 3,0 = parálisis de las extremidades traseras (arrastre de ambas patas); 3,5 = parálisis de las extremidades traseras con alguna debilidad de las extremidades delanteras; 4,0 = parálisis de las extremidades traseras y de las extremidades delanteras.

##### *Cuprizona:*

Se indujo desmielinización alimentando ratones C57B1/6 de 12 a 14 semanas de edad con una dieta que contenía cuprizona al 0,2% (bis-ciclohexanona oxaldihidrazona) mezclada en gránulos de alimentos. Esta dieta se mantuvo a

voluntad durante 6 semanas antes de devolver a los animales a comida normal (T = 0) con el fin de estudiar la remielinización. Los animales de control recibieron comida de control durante todo el estudio. Comenzando a partir de 5 días antes de volver a la comida normal (T = -5 días), los animales recibieron diariamente inyecciones intraperitoneales de 30 mg/kg de nefiracetam o solo vehículo hasta el final del estudio. En diferentes puntos de tiempo (T = 1 día, T = 3 días, T = 7 días), se sacrificó a los animales, se congelaron los cerebros instantáneamente en compuesto de temperatura de corte óptima (OTC) y se almacenaron. Se obtuvieron cortes congelados frontales, de 20 µm de grosor, usando un criótomo a aproximadamente -1,8 mm de la bregma. Se fijaron los cortes en etanol al 70%, se desengrasaron en cloroformo al 50%/etanol al 50%, se rehidrataron, y después se tiñó la mielina con azul rápido de luxol. Se evaluó el grado de mielinización en el cuerpo calloso basándose en la intensidad de la tinción con azul rápido de luxol.

#### *Cultivo organotípico de hipocampo.*

Se generaron cultivos organotípicos de hipocampo de rata se generaron a partir de cortes de 400 µm de hipocampo de ratas Wistar de 9 días de edad usando el método de interfaz de Stoppini L, Buchs PA, Muller D. (1991) *Neurosci Methods*. 37:173-82. Los cortes se mantuvieron en medio organotípico normal durante 10 días, punto en el que se indujo desmielinización exponiendo los cultivos a 250 µg/ml de lisofosfatidilcolina (LPC) en el medio durante 18 horas. Después de la exposición a LPC, se devolvieron los cortes a medio libre de LPC que contenía o bien 10 µm de nefiracetam, 10 µm de piracetam, 10 µm de levetiracetam, 10 µm de aniracetam, o bien ningún fármaco. Después de 24 horas, los cultivos se fijaron en paraformaldehído al 4% y se marcaron de manera inmunofluorescente para proteína básica de mielina (PBM) usando el método descrito por Gogolla N, Galimberti I, DePaola V, Caroni P. (2006) *Nat Protoc*. 1:2452-6. Se obtuvieron imágenes de la PBM marcada en los cultivos mediante microscopía confocal, y se comparó el grado de mielinización con cultivos coincidentes en el tiempo que no se sometieron a exposición a LPC.

#### *Estudio de EAE para mostrar el alivio mediado por compuestos de tipo racetam de síntomas visuales, de sensibilidad y motores asociados con EM.*

Los estudios de EAE con la raza de rata Lewis sirven como modelo de una recaída de EM aguda. Para entender mejor la capacidad de los compuestos de tipo racetam para aliviar síntomas motores, de sensibilidad y visuales de la EM que se deben a la desmielinización, se emplea el modelo de ratón de EAE con la raza C57BL/6, ya que en este modelo hay recuperación natural deficiente y persisten los síntomas debidos a la desmielinización (Gatson *et al.*, 2010 *J. Neuroimmunology*). Se usaron en este estudio un total de 40 ratones hembra. Los ratones se mantuvieron con comida y agua a voluntad en un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad durante todo el estudio. Bajo anestesia con isoflurano cada ratón recibió una emulsión que contenía PBM de cobaya, adyuvante incompleto de Freud y 0,2 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra, por medio de inyección subcutánea en la base de la cola. Comenzando a los 7 días después de la inducción de EAE, los animales recibieron diariamente inyecciones intraperitoneales de 9 mg/kg, 15 mg/kg, 30 mg/kg de nefiracetam o de vehículo solo (n = 10 por grupo) hasta la finalización del estudio. Un observador ciego para el tratamiento pesó y valoró los animales respecto a sus síntomas clínicos dos veces al día. Las puntuaciones clínicas de los síntomas se asignaron basándose en los siguientes criterios: 0,5 = flaccidez de la parte distal de la cola; 1,0 = flaccidez de toda la cola; 1,5 = flaccidez de toda la cola con ligera alteración de la marcha; 2,0 = debilidad de las extremidades traseras (marcha de pato o arrastre de una pata); 2,5 = debilidad de las extremidades traseras (arrastre de una pata con alguna pérdida de la función de motilidad en la otra pata); 3,0 = parálisis de las extremidades traseras (arrastre de ambas patas); 3,5 = parálisis de las extremidades traseras con alguna debilidad de las extremidades delanteras; 4,0 = parálisis de las extremidades traseras y de las extremidades delanteras. La reducción en estas puntuaciones clínicas mediante tratamiento con compuestos de tipo racetam demostró el tratamiento eficaz de los síntomas motores asociados con la EM. Además de la evaluación anterior, estos ratones se valoraron por un electroretinograma (ERG) y actividad del nervio óptico normales mediante los métodos descritos en Palfi *et al.* (2010 *Hum Gene Ther*. 21:311) para mostrar un efecto beneficioso del tratamiento con un compuesto de tipo racetam sobre los síntomas visuales/de sensibilidad observados en la EM.

#### *Eficacia del tratamiento con nefiracetam en el modelo animal de CMT1A.*

Se sometió a prueba la eficacia del compuesto de tipo racetam nefiracetam en mejorar las habilidades motoras y la función neuromuscular en un modelo de ratón de CMT1A. Se siguió el enfoque usado en el estudio de curcumina de Khajavi *et al* (2007); usando el mismo modelo animal y una evaluación del comportamiento similar. Sin embargo, a diferencia de Khajavi *et al* (2007), el tratamiento con nefiracetam se inició después de la aparición de las deficiencias neuromusculares. La estrategia alternativa, comenzando el tratamiento a edad temprana, tiene una mayor posibilidad de producir efectos terapéuticos positivos, debido a que no hay dependencia en ese caso de que tenga lugar recuperación en el sistema. Sin embargo, en la mayoría de los casos de CMT humana, no hay ninguna oportunidad de comenzar el tratamiento antes de la aparición de los síntomas; cualquier tratamiento eficaz probablemente tendrá que aliviar los síntomas existentes, y revertir o compensar el daño existente. Por tanto, este estudio *in vivo* no está diseñado sólo para obtener un modelo de la enfermedad, sino de la enfermedad en el punto en que es más probable que tenga lugar la intervención.

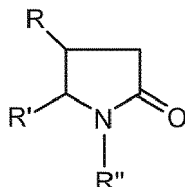
Khajavi *et al* (2007) usaron un tamaño de muestra de 20 animales para demostrar la eficacia de la curcumina en mejorar los efectos de la mutación PMP22 en ratones trembler-J en el control motor y en la estructura y función del nervio ciático, y fue suficiente para detectar efectos terapéuticos significativos del tratamiento, y se empleó la misma especie modelo y el mismo tamaño de muestra. Todos los experimentos se llevaron a cabo en cuatro grupos de tratamiento, de 20 ratones/grupo. Los dos primeros grupos, uno de ratones de tipo natural y otro de ratones trembler-J, recibieron cada uno 15 mg/kg/día de nefiracetam intraperitoneal, mientras los segundos dos grupos (de nuevo uno de tipo silvestre y uno de trembler-J) recibieron vehículo intraperitoneal diariamente. El tratamiento comenzó en los animales a las 8 semanas de edad, es decir después de la aparición de la disfunción motora del fenotipo de la enfermedad. El tratamiento se administró durante un periodo de treinta días, y se llevó a cabo valoración del comportamiento durante dos intervalos; a la mitad del tratamiento (días 13-15) y al final del tratamiento (días 28-30). La valoración del comportamiento de la coordinación motora y del equilibrio se llevó a cabo en todos los animales usando el análisis del cilindro giratorio convencional (ENV-575MA, Med Associates), según se ha usado previamente para someter a prueba los efectos terapéuticos en deficiencias motoras en ratones trembler-J (Khajavi *et al*, 2007). La prueba del cilindro giratorio implica colocar al animal sobre un cilindro giratorio elevado que rota a velocidad creciente, usándose el tiempo transcurrido sobre el cilindro giratorio como indicador del rendimiento motor. Adicionalmente, durante los intervalos de evaluación del comportamiento se observaron los animales en un ámbito de campo abierto para valorar el comportamiento locomotor básico. El ámbito consiste en una caja blanca de 55 cm de ancho, 55 cm de largo y 45 cm de alto. Los animales se colocaron dentro de la caja, orientados hacia la esquina, se les dejó explorar durante un periodo de 5 minutos, y se les sometió a seguimiento usando un sistema de seguimiento informatizado (Ethovision 3.1, Noldus) para registrar la distancia que se movieron durante el periodo de prueba. Esta observación se usó para asegurar que nefiracetam no produce un aumento generalizado en la actividad locomotora que afecte a las observaciones experimentales del cilindro giratorio.

Después de 30 días de administración de nefiracetam o vehículo y de monitorización del comportamiento, se sacrificó a los animales, y los nervios ciáticos se diseccionaron bilateralmente. En cada animal, se usó uno de cada par de nervios para valorar la conducción nerviosa. Se estimularon eléctricamente los nervios aislados en el extremo espinal, y se midió distalmente el potencial de acción del compuesto provocado. Se valoró el potencial de acción del compuesto en el neurograma para establecer el efecto del nefiracetam sobre los cambios en amplitud y velocidad de conducción en los ratones trembler-J en relación con el tipo natural. Se analizó el nervio ciático contralateral para determinar sus cambios en la estructura axónica y de mielina. Se fijaron los nervios, se marcaron con inmunofluorescencia para los marcadores de mielina (PBM) y los axones (neurofilamento-H), se obtuvieron imágenes usando microscopía confocal y se analizaron para valorar el grado de disfunción celular en cada grupo. Se analizaron las imágenes de neurofluorescencia axón por axón usando el programa de análisis de imágenes automatizado personalizado usado previamente (O'Sullivan *et al*, 2010). Los parámetros que se midieron fueron diámetro axónico, grosor de mielina y número de axones mielinizados.

Usar los mismos animales para la valoración del comportamiento, neurofisiológica y estructural permite el análisis de la correlación entre los tres parámetros medidos en cada animal, así como la reducción de los números de animales y procedimientos necesarios para llevar a cabo la investigación.

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso en el tratamiento causal o la prevención de una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en un mamífero manteniendo la integridad de mielinización de las células axónicas, teniendo el compuesto de 2-oxopirrolidina una fórmula general I:



10 en la que R es hidrógeno, hidroxilo o aminometilo;

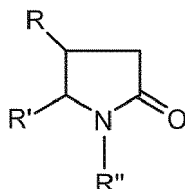
R' es hidrógeno o grupo piperidinocarbonilo;

15 R'' es hidrógeno, aminocarbonilalquilo opcionalmente N-sustituido con un grupo dialquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-aminoalquilo (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>), anilincarbonilalquilo opcionalmente mono o disustituido en el anillo de benceno con metilo, metoxilo o halógeno; bencilo, opcionalmente mono o disustituido en el anillo de benceno con metilo, metoxilo o halógeno;

20 en la que uno o dos de R, R' y R'' es hidrógeno; con las condiciones de que cuando R' es distinto de hidrógeno, entonces R y R'' son ambos hidrógeno, y cuando R es distinto de hidrógeno, entonces R' es hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

25 en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) es esclerosis múltiple (EM).

- 30 2. Combinación de un compuesto de 2-oxopirrolidina y un producto terapéutico inmunosupresor para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en un mamífero manteniendo la integridad de mielinización de las células axónicas, teniendo el compuesto de 2-oxopirrolidina una fórmula general I:



35 en la que R es hidrógeno, hidroxilo o aminometilo;

R' es hidrógeno o grupo piperidinocarbonilo;

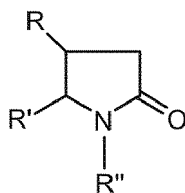
40 R'' es hidrógeno, aminocarbonilalquilo opcionalmente N-sustituido con un grupo dialquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-aminoalquilo (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>), anilincarbonilalquilo opcionalmente mono o disustituido en el anillo de benceno con metilo, metoxilo o halógeno; bencilo, opcionalmente mono o disustituido en el anillo de benceno con metilo, metoxilo o halógeno;

45 en la que uno o dos de R, R' y R'' es hidrógeno; con las condiciones de que cuando R' es distinto de hidrógeno, entonces R y R'' son ambos hidrógeno, y cuando R es distinto de hidrógeno, entonces R' es hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

50 en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) es esclerosis múltiple (EM).

3. Compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso en el tratamiento causal de uno o más síntomas de una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del SNC o del SNP en un sujeto humano, en que los síntomas se seleccionan de un grupo que consiste en deficiencias visuales, deficiencias del control motor, deficiencias de sensibilidad, en el que se administra al sujeto una cantidad de un compuesto de 2-oxopirrolidina eficaz para producir una remielinización clínicamente significativa de células neuronales del

SNC o del SNP, y en el que el compuesto de 2-oxopirrolidina tiene una fórmula general I:



5 en la que R es hidrógeno, hidroxilo o aminometilo;

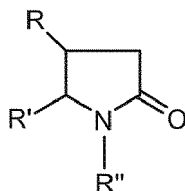
R' es hidrógeno o grupo piperidinocarbonilo;

10 R'' es hidrógeno, aminocarbonilalquilo opcionalmente N-sustituido con un grupo dialquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-aminoalquilo (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>), anilincarbonilalquilo opcionalmente mono o disustituido en el anillo de benceno con metilo, metoxilo o halógeno; bencilo, opcionalmente mono o disustituido en el anillo de benceno con metilo, metoxilo o halógeno;

15 en la que uno o dos de R, R' y R'' es hidrógeno; con las condiciones de que cuando R' es distinto de hidrógeno, entonces R y R'' son ambos hidrógeno, y cuando R es distinto de hidrógeno, entonces R' es hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

20 en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) es esclerosis múltiple (EM), y en el que tratamiento causal significa un tratamiento de desmielinización como causa subyacente de la enfermedad.

4. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de 2-oxopirrolidina y un producto terapéutico inmunosupresor, en combinación con un portador o diluyente farmacéutico adecuado para su uso en el tratamiento causal o la prevención de una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP), en el que el compuesto de 2-oxopirrolidina tiene una fórmula general I



30 en la que R es hidrógeno, hidroxilo o aminometilo;

R' es hidrógeno o grupo piperidinocarbonilo;

35 R'' es hidrógeno, aminocarbonilalquilo opcionalmente N-sustituido con un grupo dialquil (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-aminoalquilo (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>), anilincarbonilalquilo opcionalmente mono o disustituido en el anillo de benceno con metilo, metoxilo o halógeno; bencilo, opcionalmente mono o disustituido en el anillo de benceno con metilo, metoxilo o halógeno;

40 en la que uno o dos de R, R' y R'' es hidrógeno; con las condiciones de que cuando R' es distinto de hidrógeno, entonces R y R'' son ambos hidrógeno, y cuando R es distinto de hidrógeno, entonces R' es hidrógeno, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y

45 en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) es esclerosis múltiple (EM), y en la que tratamiento causal significa un tratamiento de desmielinización como causa subyacente de la enfermedad.

5. Compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 3 o combinación de un compuesto de 2-oxopirrolidina y un producto terapéutico inmunosupresor para su uso según la reivindicación 2, en el que el uso comprende el tratamiento causal o la prevención de una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) se selecciona de EM progresiva primaria, EM progresiva secundaria, EM remitente-recurrente y EM progresiva recurrente.

6. Compuesto de 2-oxopirrolidina o combinación de un compuesto de 2-oxopirrolidina y un producto terapéutico inmunosupresor para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y 5 y composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4, en el que el uso comprende el tratamiento causal o la prevención de una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP), en que el compuesto de 2-oxopirrolidina se selecciona del grupo que consiste en: piracetam (en el que  $R=R'=H$ ,  $R''=CH_2CONH_2$  (aminocarbonilmetilo)); aniracetam (en el que  $R=R'=H$ ,  $R''=CH_2C_6H_4-pOCH_3$  (4-metoxibencilo)); nefiracetam (en el que  $R=R'=H$ ,  $R''=CH_2CONH-(2,6CH_3)C_6H_3$  (anilino-carbonilmetilo)); y levetiracetam (en el que  $R=R'=H$ ;  $R''=1$ -aminocarbonilpropilo); y en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) es esclerosis múltiple (EM).
7. Compuesto de 2-oxopirrolidina o combinación de un compuesto de 2-oxopirrolidina y un producto terapéutico inmunosupresor, o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en el que el uso comprende el tratamiento causal o la prevención de una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP), en que el compuesto de 2-oxopirrolidina es nefiracetam (en el que  $R=R'=H$ ,  $R''=CH_2CONH-(2,6CH_3)C_6H_3$  (anilino-carbonilmetilo)); y en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) es esclerosis múltiple (EM).
8. Compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso según la reivindicación 1 y composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 5 a 7, en los que el uso comprende tratar una recaída aguda de la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP), en los que se administra una cantidad clínicamente eficaz del compuesto de 2-oxopirrolidina al mamífero tras la recaída de la enfermedad o el estado; y en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) es esclerosis múltiple (EM).
9. Compuesto de 2-oxopirrolidina y composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, en el que el uso comprende tratar una recaída aguda de la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en que la administración de la cantidad clínicamente eficaz del compuesto de 2-oxopirrolidina se continúa durante un periodo de recaída de la enfermedad o el estado; y en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) es esclerosis múltiple (EM).
10. Compuesto de 2-oxopirrolidina para su uso según la reivindicación 1 y composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 5 a 7, en los que el uso comprende prolongar un periodo de remisión de la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en un mamífero, en que se administra una cantidad clínicamente eficaz del compuesto de 2-oxopirrolidina al mamífero durante un periodo de remisión de la enfermedad o el estado; y en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) es esclerosis múltiple (EM).
11. Compuesto de 2-oxopirrolidina y composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en los que el uso comprende prolongar un periodo de remisión de la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en un mamífero en que la administración de la cantidad clínicamente eficaz del compuesto de 2-oxopirrolidina se continúa durante un periodo de recaída de la enfermedad o el estado; y en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) es esclerosis múltiple (EM).
12. Combinación del compuesto de 2-oxopirrolidina y el producto terapéutico inmunosupresor para su uso según la reivindicación 2 y composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 5 a 7, en las que el uso comprende prolongar un periodo de remisión de la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en un mamífero, en que se administra una cantidad clínicamente eficaz del compuesto de 2-oxopirrolidina y del producto terapéutico inmunosupresor al mamífero durante un periodo de remisión de la enfermedad o el estado; y en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) es esclerosis múltiple (EM).
13. Combinación del compuesto de 2-oxopirrolidina y el producto terapéutico inmunosupresor para su uso según la reivindicación 12 y composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en las que el uso comprende prolongar un periodo de remisión de la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en un mamífero en que la administración de la cantidad clínicamente eficaz del compuesto de 2-oxopirrolidina y el producto terapéutico inmunosupresor se continúa durante un periodo de recaída de la enfermedad o el estado; y en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del

sistema nervioso periférico (SNP) es esclerosis múltiple (EM).

14. Combinación del compuesto de 2-oxopirrolidina y el producto terapéutico inmunosupresor para su uso según la reivindicación 2 y composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4 y 6, en las que el uso comprende el tratamiento causal o la prevención de una enfermedad o un estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) en que el producto terapéutico inmunosupresor se selecciona de natalizumab, interferón beta 1b, interferón beta 1a, acetato de glatirámico y daclizumab; y en que la enfermedad o el estado asociado con desmielinización del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) es esclerosis múltiple (EM).

5

10

FIGURA 1A

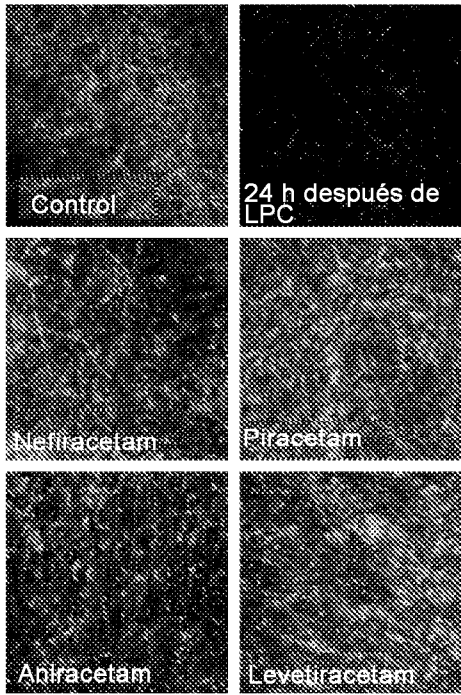


FIGURA 1B

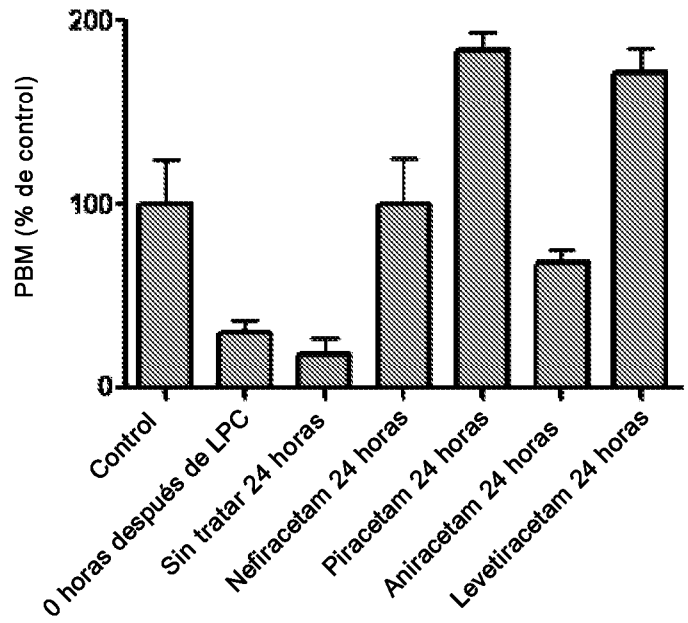




FIGURA 2A

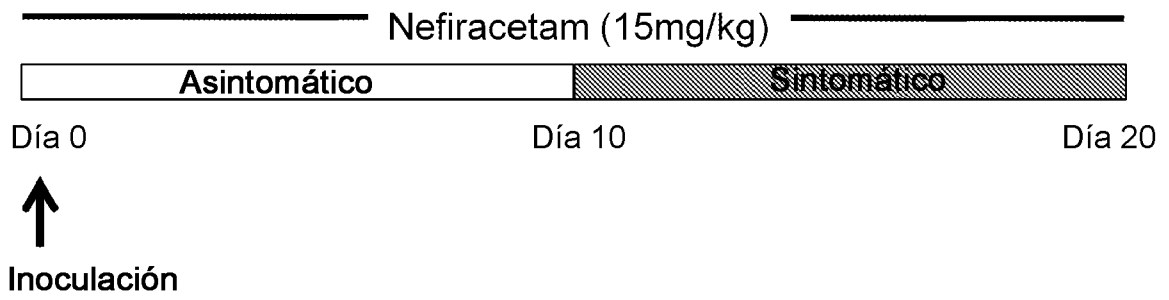


FIGURA 2B

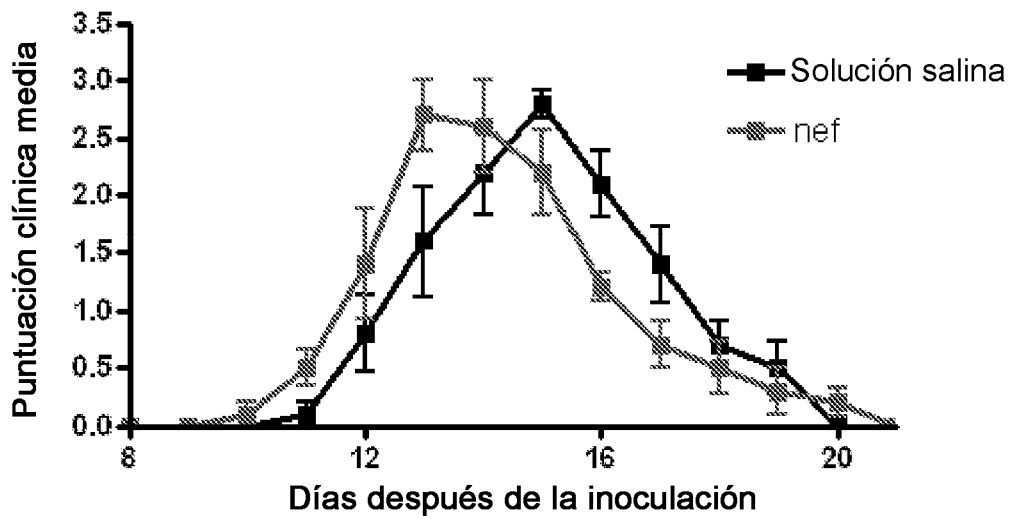


FIGURA 3A

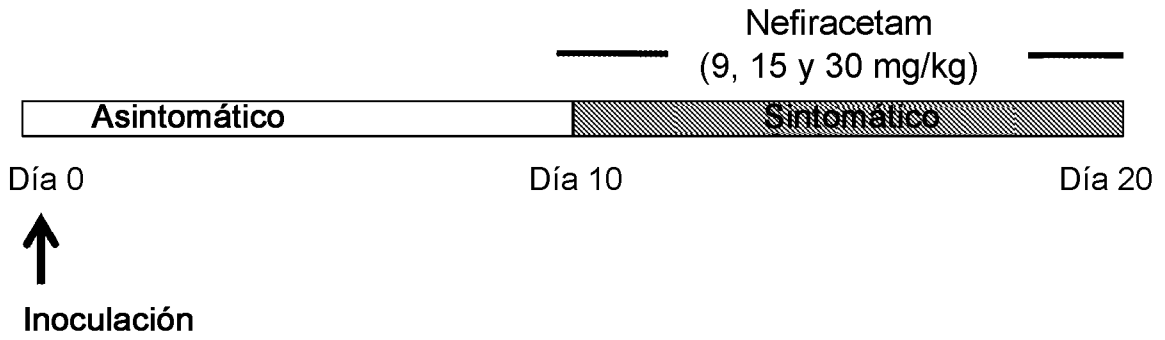


FIGURA 3B

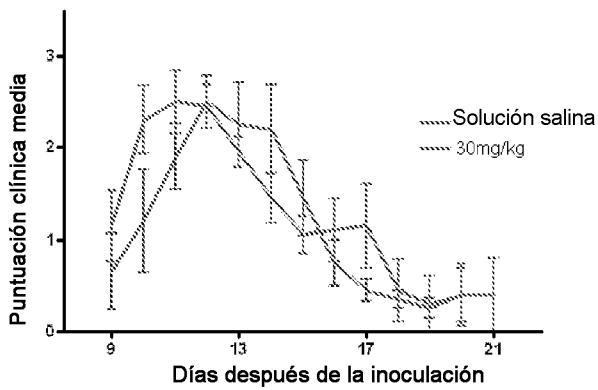
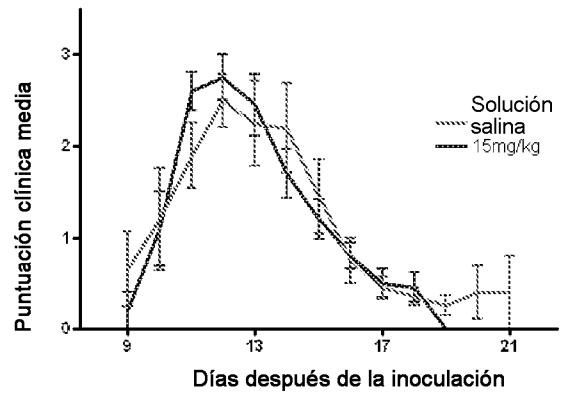
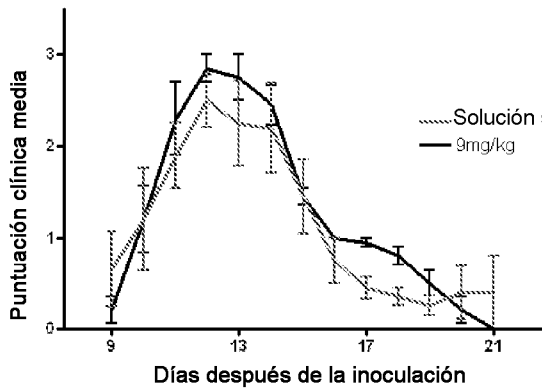


FIGURA 4A

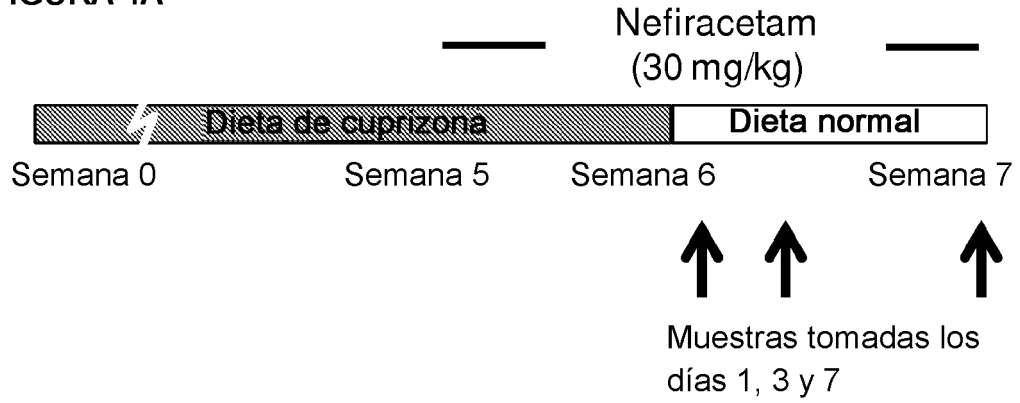


FIGURA 4B

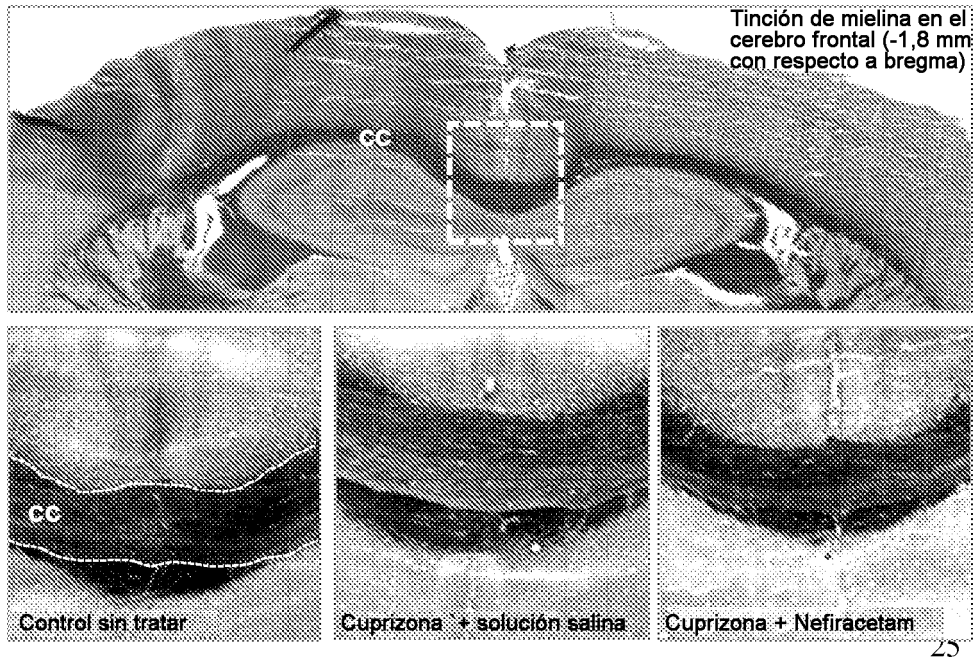


FIGURA 4C

