

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 678**

51 Int. Cl.:

A61K 31/451 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2013 PCT/US2013/035124**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13152105**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2013 E 13772325 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2844346**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas para terapia de combinación**

30 Prioridad:

04.04.2012 US 201261620203 P

17.04.2012 US 201261625192 P

14.03.2013 US 201361783730 P

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

31.07.2020

73 Titular/es:

**PRILENIA NEUROTHERAPEUTICS LTD. (100.0%)
10 HaMenofim Street
4672561 Herzliya, IL**

72 Inventor/es:

**WATERS, ROSS, NICHOLAS y
WATERS, EVA, SUSANNA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 776 678 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

Composiciones farmacéuticas para terapia de combinación

Antecedentes de la invención

5 La Pridopidina, es decir, 4-(3-metanosulfonil-fenil)-1-propil-piperidina, es una sustancia farmacológica actualmente en desarrollo clínico para el tratamiento de la enfermedad de Huntington. Este compuesto se describió por primera vez en el documento WO 01/46145.

10 La Pridopidina es un estabilizador dopaminérgico que muestra antagonismo competitivo del receptor D2 de dopamina con una cinética de disociación rápida (Dyhring, 2010). In vivo, la Pridopidina incrementa la renovación y la liberación de dopamina en el cuerpo estriado y en la corteza frontal (Poten, 2010; Pettersson 2010). Los efectos conductuales incluyen antagonismo de la hiperactividad inducida por psicoestimulantes, lo que sugiere propiedades antipsicóticas, pero no efectos inhibitorios sobre la actividad locomotora espontánea (Ponten, 2010; Natesan 2006; Nilsson, 2004).

15 La Tetrabenazina, es decir (SS, RR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ona, es una sustancia farmacológica comercializada para el tratamiento sintomático de ciertos trastornos del movimiento (Etiqueta de la FDA para XENAZINE (Tetrabenzine) 07/06/2011). La Tetrabenazina es un inhibidor del transportador de monoamina vesicular de tipo 2 (VMAT), que bloquea el almacenamiento vesicular de neurotransmisores de monoamina en el cerebro, conduciendo por ello a una liberación sináptica reducida de dopamina, serotonina y norepinefrina (Paleacu, 2007). Esta reducción de la neurotransmisión monoaminérgica se asocia a la supresión de, por ejemplo, funciones dependientes de la dopamina, que incluyen el movimiento y la recompensa. La supresión de los movimientos se usa terapéuticamente para mejorar los movimientos involuntarios en, por ejemplo, la enfermedad de Huntington, la disquinesia tardía y la enfermedad de Tourette. Sin embargo, el tratamiento con Tetrabenazina está asociado a efectos secundarios graves. Tales efectos secundarios incluyen parkinsonismo, es decir, rigidez y función motora deteriorada, depresión y capacidad funcional deteriorada.

25 Se cree que los movimientos involuntarios tales como la corea y la disquinesia, que ocurren como parte de las manifestaciones clínicas de, por ejemplo, la enfermedad de Huntington, están relacionados con una actividad deteriorada en la vía indirecta cortico-estriado-talámica. Por consiguiente, los efectos beneficiosos de la Tetrabenazina en tales movimientos involuntarios se deben a un tono disminuido en los receptores de dopamina D2 en las neuronas espinosas medianas de la vía indirecta, que ocurren como consecuencia de la reducción de la transmisión de dopamina generada por la Tetrabenazina. La disminución del tono del receptor D2 de dopamina conduce a una inhibición reducida de estas neuronas espinosas medianas y, por lo tanto, a una actividad incrementada de la vía indirecta y a una supresión mejorada de los movimientos involuntarios. En consecuencia, los antagonistas de la dopamina D2 también se usan frecuentemente para aliviar la corea en la HD (Steward 2001).

Terapia de combinación

35 La administración de dos fármacos para tratar una afección dada, como un trastorno del movimiento, plantea varios problemas potenciales. Las interacciones in vivo entre dos fármacos son complejas. Los efectos de cualquier fármaco individual están relacionados con su absorción, distribución y eliminación. Cuando se introducen dos fármacos en el cuerpo, cada fármaco puede afectar a la absorción, distribución y eliminación del otro y, por consiguiente, alterar los efectos del otro. Por ejemplo, un fármaco puede inhibir, activar o inducir la producción de enzimas implicadas en una ruta metabólica de eliminación del otro fármaco (Guidance for Industry, 1999). En un ejemplo, se ha demostrado experimentalmente que la administración combinada de GA e interferón (IFN) anula la efectividad clínica de cualquiera de las terapias (Brod 2000). En otro experimento, se informó de que la adición de prednisona en terapia de combinación con IFN- β antagonizó su efecto regulador positivo. De este modo, cuando se administran dos fármacos para tratar la misma afección, es impredecible si cada uno complementará, no tendrá efecto, o interferirá con la actividad terapéutica del otro en un sujeto humano.

45 La interacción entre dos fármacos no solo puede afectar a la actividad terapéutica prevista de cada fármaco, sino que la interacción puede incrementar los niveles de metabolitos tóxicos (Guidance for Industry, 1999). La interacción también puede aumentar o disminuir los efectos secundarios de cada fármaco. Por consiguiente, tras la administración de dos fármacos para tratar una enfermedad, es impredecible qué cambio se producirá en el perfil secundario negativo de cada fármaco. En un ejemplo, se observó que la combinación de natalizumab e interferón β -1a incrementa el riesgo de efectos secundarios imprevistos. (Vollmer, 2008; Rudick 2006; Kleinschmidt-DeMasters, 2005; Langer-Gould 2005)

55 Adicionalmente, es difícil predecir con precisión cuándo se manifestarán los efectos de la interacción entre los dos fármacos. Por ejemplo, las interacciones metabólicas entre fármacos se pueden hacer evidentes tras la administración inicial del segundo fármaco, después de que los dos han alcanzado una concentración en estado estacionario o al retirar uno de los fármacos (Guidance for Industry, 1999).

Por lo tanto, el estado de la técnica en el momento de la presentación es que los efectos de la terapia de combinación de dos fármacos, en particular Pridopidina y Tetrabenazina, no se pueden predecir hasta que los

resultados de los estudios de combinación estén disponibles.

5 Trial Watch – Biobusiness Briefs “NeuroSearch’s dopaminergic stabilizer improves movement disorders in Huntington’s disease” describe un ensayo de Fase II que mostró que el agente que modula la dopamina Pridopidina cumplió el punto final primario de mejorar la función motora voluntaria en pacientes con enfermedad de Huntington. Esta publicación no describía las composiciones farmacéuticas o productos de la presente invención.

Chengzhi Zhang (US 2011/206782) describió nuevos moduladores piperidina de receptores de dopamina, composiciones farmacéuticas de los mismos y métodos de uso de los mismos. Chengzhi Zhang no describe las composiciones farmacéuticas o productos de la presente invención.

10 Xiaowei Jin et al. (WO 2008/133884 A2) describen composiciones, kits, y métodos para tratar, prevenir, y mejorar trastornos neurodegenerativos, por ejemplo, enfermedad de Huntington. Xiaowei Jin et al. no describe las composiciones farmacéuticas o productos de la presente invención.

Andrew Duffield et al. (US 2010/055133 A1) describe una composición farmacéutica que incluye Tetrabenazina y un agente retardante de la liberación; y un método de tratar un trastorno del movimiento hiperkinético. Andrew Duffield et al. no describe las composiciones farmacéuticas o productos de la presente invención.

15 Nicholas Waters et al. (2011/107583 A1) describe el uso de un cierto grupo de 4-fenil-N-alkil-piperidinas sustituidas para prevenir la aparición o la progresión lenta de trastornos neurodegenerativos. Nicholas Waters et al. no describe las composiciones farmacéuticas o productos de la presente invención

Breve Sumario de la invención

20 Se ha encontrado ahora sorprendentemente que la Pridopidina es capaz de revertir la inhibición conductual causada por la Tetrabenazina, mientras mantiene el efecto farmacológico primario de la Pridopidina, es decir, el bloqueo del receptor de dopamina D2. Estos hallazgos sugieren que la coadministración de Pridopidina y Tetrabenazina mejoraría los efectos terapéuticamente beneficiosos de la Tetrabenazina, es decir, aliviaría adicionalmente los movimientos involuntarios, así como reduciría los efectos adversos motores y afectivos.

25 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso como una terapia complementaria o en combinación con una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para tratar un sujeto afectado por la enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.

30 La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en la reducción o prevención de uno o más efectos secundarios de la administración periódica de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable en un sujeto, en la que el uno o más efectos secundarios se seleccionan de depresión, tendencias suicidas, acatisia, inquietud, agitación, parkinsonismo, sedación, somnolencia, y disfagia.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en el tratamiento de un sujeto afectado de obesidad, un trastorno asociado con obesidad, o un efecto secundario cardiovascular de Pridopidina.

40 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en la administración simultánea, separada o secuencial con Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el tratamiento de un sujeto afectado por la enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.

45 La invención también proporciona un producto que contiene una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y una cantidad de Pridopidina o una cantidad farmacéuticamente aceptable de la misma para uso simultáneo, separado o secuencial para tratar un sujeto afectado con enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.

50 La memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para tratar un sujeto afectado por un trastorno del movimiento.

La memoria descriptiva también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad de Tetrabenazina o

una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para tratar un sujeto afectado de obesidad, un trastorno asociado a obesidad, o un efecto secundario cardiovascular de Pridopidina.

- 5 La memoria descriptiva también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en la reducción o prevención de uno o más efectos secundarios de administrar periódicamente una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma a un sujeto.

La presente memoria descriptiva también describe un paquete que comprende:

- 10 a) una primera composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- b) una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y
- 15 c) instrucciones de uso para la primera y la segunda composición farmacéutica juntas para tratar un sujeto afectado por un trastorno del movimiento.

La memoria descriptiva también describe Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso como una terapia complementaria o en combinación con Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en el tratamiento de un sujeto afectado por un trastorno del movimiento.

- 20 La memoria descriptiva también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La memoria descriptiva también describe el uso de:

- a) una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y
- 25 b) una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en la preparación de una combinación para tratar a un sujeto afectado por un trastorno del movimiento en el que la cantidad de Tetrabenazina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma y la cantidad de Pridopidina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administran simultáneamente o contemporáneamente

- 30 La memoria descriptiva también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en el tratamiento de un sujeto afectado por un trastorno del movimiento, en combinación con una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, mediante la administración periódica al sujeto de la composición farmacéutica y la cantidad de Pridopidina o sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

- 35 La memoria descriptiva también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de un sujeto afectado por un trastorno del movimiento, en combinación con una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, administrando periódicamente al sujeto la composición farmacéutica y la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

- 40 La memoria descriptiva también describe Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el tratamiento de un sujeto afectado por un trastorno del movimiento, en la que la Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y la Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.

- 45 La memoria descriptiva también describe un producto que contiene una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un sujeto afectado con un trastorno del movimiento.

- 50 La memoria descriptiva también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o un sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para tratar un sujeto afectado por obesidad, un trastorno asociado a obesidad o un efecto secundario cardiovascular de Pridopidina, en la que las cantidades cuando se toman conjuntamente son efectivas para tratar al sujeto.

La memoria descriptiva también describe una combinación de Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; para el tratamiento, prevención o alivio de la obesidad, o un trastorno asociado a la obesidad, y para el tratamiento, prevención o alivio de los efectos secundarios cardiovasculares de Pridopidina, en un mamífero, incluyendo un ser humano.

- 5 En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una combinación de Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso como un medicamento para el tratamiento, prevención o alivio de un trastorno del movimiento.

10 En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una combinación de Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso como un medicamento.

En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una combinación de Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; para el tratamiento, prevención o alivio de la obesidad, o un trastorno asociado a la obesidad, y para el tratamiento, prevención o alivio de los efectos secundarios cardiovasculares de la Pridopidina, en un mamífero, incluido un ser humano.

- 15 En otro aspecto, la memoria descriptiva describe el uso de una combinación de Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o alivio de un trastorno del movimiento de un mamífero, incluido un ser humano.

20 En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en una terapia de combinación junto con una composición farmacéutica que comprende Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para el tratamiento, prevención o alivio de un trastorno del movimiento.

25 En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos y/o diluyentes.

30 En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con terapia con Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para tratamiento, prevención o alivio de un trastorno del movimiento en un cuerpo animal vivo, incluido un ser humano,

35 En otro aspecto la memoria descriptiva describe un kit de partes que comprende por lo menos dos formas de dosis unitaria separadas (A) y (B), en el que (A) comprende Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (B) comprende Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y opcionalmente (C) instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de la Pridopidina de (A) y la Tetrabenazina de (B), a un paciente que necesite la misma.

En otro aspecto, la memoria descriptiva describe un artículo de fabricación, que comprende (A) una primera forma de dosificación farmacéutica que comprende Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (B) una segunda forma de dosificación farmacéutica que comprende Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; en el que el artículo contiene la primera y segunda formas de dosificación farmacéutica.

40 En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en el tratamiento de un sujeto afectado por un trastorno del movimiento, en el que las cantidades cuando se toman conjuntamente son efectivas para tratar al paciente humano.

50 En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente de la misma, o una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en el tratamiento de un mamífero, incluido un ser humano, afectado por obesidad, o un trastorno asociado a obesidad o efectos secundarios cardiovasculares de Pridopidina, en el que las cantidades cuando se toman conjuntamente son efectivas para tratar al mamífero.

Otros objetivos de la invención serán evidentes para la persona experta en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos.

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

La presente invención se ilustra adicionalmente por referencia a los dibujos adjuntos.

- 5 Fig. 1. Actividad locomotora espontánea (LMA) expresada como un porcentaje del valor medio del grupo de control para Tetrabenazina. La actividad se muestra por dosis para cada período de tiempo registrado. Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (5.5% v/peso de glucosa) y Tetrabenazina ensayada a tres dosis (0.37; 0.64 y 1.1 $\mu\text{mol/kg}$). Todos los compuestos se inyectaron sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.
- 10 Fig. 2. El efecto de la Tetrabenazina en DOPAC (ácido 3,4-dihroxifenilacético) estriatal. Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (5.5% v/peso de glucosa) y Tetrabenazina ensayada a tres dosis (0.37; 0.64 y 1.1 $\mu\text{mol/kg}$). Todos los compuestos se inyectaron sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.
- 15 Fig. 3. Expresión del gen Arc (niveles de ARNm de Arc o Arc) expresada como un porcentaje del valor medio del grupo de control, después del tratamiento con Tetrabenazina. La expresión se muestra por dosis y por región (arc estriatal (arcS) o arc de corteza frontal (arcF)). Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (5.5% v/peso de glucosa) y Tetrabenazina ensayados a tres dosis (0.37; 0.64 y 1.1 $\mu\text{mol/kg}$). Todos los compuestos se inyectaron sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.
- 20 Fig. 4. Actividad locomotora espontánea expresada como un porcentaje del valor medio del grupo de control para Pridopidina. La actividad se muestra por dosis para cada período de tiempo registrado. Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl) y Pridopidina ensayada a tres dosis (11; 33 y 100 $\mu\text{mol/kg}$). Todos los compuestos se inyectaron sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.
- 25 Fig. 5. El efecto de la Pridopidina (NS30016) sobre DOPAC estriatal. Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl) y Pridopidina ensayados a tres dosis (11; 33 y 100 $\mu\text{mol/kg}$). Todos los compuestos se inyectaron sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.
- 30 Fig. 6. Expresión del gen Arc expresada como un porcentaje del valor medio del grupo de control, después del tratamiento con Pridopidina. La expresión se muestra por dosis y por región (Arc estriatal (arcS) o Arc de corteza frontal (arcF)). Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl) y Pridopidina ensayada a tres dosis (11; 33 y 100 $\mu\text{mol/kg}$). Todos los compuestos se inyectaron sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.
- 35 Fig. 7. Actividad locomotora espontánea expresada como un porcentaje del valor medio del grupo de control para Haloperidol. La actividad se muestra por dosis para cada período de tiempo registrado. Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (5.5% v/peso de glucosa) y Haloperidol ensayado a tres dosis (0.12; 0.37 y 1.1 $\mu\text{mol/kg}$). Todos los compuestos se inyectaron sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.
- 40 Fig. 8. Actividad locomotora espontánea expresada como un porcentaje del valor medio del grupo de control para Haloperidol. Los animales se distribuyeron en cinco grupos de tratamiento diferentes, n = 4. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (5.5% v/peso de glucosa) y Haloperidol ensayado a cuatro dosis (0.04; 0.12; 0.37 y 1.1 $\mu\text{mol/kg}$). Todos los compuestos se inyectaron sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.
- 45 Fig. 9. El efecto del Haloperidol en DOPAC estriatal. Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (5.5% v/peso de glucosa) y Haloperidol ensayado a tres dosis (0.12; 0.37 y 1.1 $\mu\text{mol/kg}$). Todos los compuestos se inyectaron sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.
- 50 Fig. 10. Expresión del gen Arc expresada como un porcentaje del valor medio del grupo de control, después del tratamiento con Haloperidol. La expresión se muestra por dosis y por región (Arc estriatal (arcS) o Arc de corteza frontal (arcF)). Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (5.5% v/peso de glucosa) y Haloperidol ensayado a tres dosis (0.12; 0.37 y 1.1 $\mu\text{mol/kg}$). Todos los compuestos se inyectaron sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.
- 55

Fig. 11. Actividad locomotora espontánea expresada como un porcentaje del valor medio del grupo de control para Tetrabenazina + Pridopidina. La actividad se muestra por dosis para cada período de tiempo registrado. Este experimento se completó de una de dos maneras: (1) "Proceso BS81" en el que los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5, los grupos de tratamiento consistían en el Vehículo 1:1 (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl + 5.5% de glucosa con algunas gotas de HAc) el segundo grupo consistía en una dosis única de Tetrabenazina (0.64 mg/kg) y el tercer y cuarto grupos consistían en Pridopidina ensayada en dos dosis (33 y 100 $\mu\text{mol/kg}$ junto con Tetrabenazina en una dosis (0.64 mg/kg) o (2) "Proceso TA284" en el que los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 10, los grupos de tratamiento consistían en Vehículo 1:1 (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl + 5.5 de glucosa con unas pocas gotas de HAc) el segundo grupo consistía en una sola dosis de Tetrabenazina (0.64 mg/kg) y el tercer y cuarto grupos consistían en Pridopidina ensayada en dos dosis (33 y 100 $\mu\text{mol/kg}$ junto con Tetrabenazina en una dosis (0.64 mg/kg). No se recogió tejido cerebral de este experimento. Todos los compuestos se inyectaron sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.

Fig. 12. El efecto de la Pridopidina sobre la Tetrabenazina indujo un incremento de la dopamina estriatal. Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en el Vehículo 1:1 (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl + 5.5% de glucosa con algunas gotas de HAc) el segundo grupo consistía en una dosis única de Tetrabenazina (0.64 mg/kg) y el tercero y cuarto grupos consistían en Pridopidina (NS30016) ensayada a dos dosis (33 y 100 $\mu\text{mol/kg}$ junto con Tetrabenazina a una dosis (0.64 mg/kg). Todos los compuestos fueron inyectados sc cuatro minutos antes del inicio del registro de actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.

Fig. 13. Expresión del gen Arc expresada como un porcentaje del valor medio del grupo de control, después del tratamiento con Tetrabenazina + pridopidina. La expresión se muestra por dosis y por región (Arc estriatal (arcS) o Arc de corteza frontal (arcF)). Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en el Vehículo 1:1 (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl + 5.5% de glucosa con algunas gotas de HAc) el segundo grupo consistía en una dosis única de Tetrabenazina (0.64 mg/kg) y el tercero y cuarto grupos consistían en Pridopidina ensayada a dos dosis (33 y 100 $\mu\text{mol/kg}$ junto con Tetrabenazina a una dosis (0.64 mg/kg) Todos los compuestos fueron inyectados sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.

Fig. 14. Actividad locomotora espontánea expresada como un porcentaje del valor medio del grupo de control para Tetrabenazina + Haloperidol. La actividad se muestra por dosis para cada período de tiempo registrado. Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en el Vehículo 1:1 (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl + 5.5% de glucosa con algunas gotas de HAc) el segundo grupo consistía en una sola dosis de Tetrabenazina (0.64 mg/kg) y el tercero y cuarto grupos consistían en Haloperidol ensayado en dos dosis (0.04 y 0.12 mg/kg junto con Tetrabenazina en una dosis (0.64 mg/kg). Todos los compuestos fueron inyectados sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.

Fig. 15. El efecto del Haloperidol sobre la Tetrabenazina indujo un incremento de dopamina estriatal. Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en el Vehículo 1:1 (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl + 5.5% de glucosa con algunas gotas de HAc) el segundo grupo consistía en una dosis única de Tetrabenazina (0.64 mg/kg) y el tercero y cuarto grupos consistían en Haloperidol ensayado en dos dosis (0.04 y 0.12 mg/kg junto con Tetrabenazina en una dosis (0.64 mg/kg). Todos los compuestos fueron inyectados sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.

Fig. 16. Expresión del gen Arc expresada como un porcentaje del valor medio del grupo de control, después del tratamiento con Tetrabenazina + Haloperidol. La expresión se muestra por dosis y por región (Arc estriatal (arcS) o Arc de corteza frontal (arcF)). Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en el Vehículo 1:1 (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl + 5.5% de glucosa con algunas gotas de HAc) el segundo grupo consistía en una dosis única de Tetrabenazina (0.64 mg/kg) y el tercero y cuarto grupos consistían en Haloperidol ensayado en dos dosis (0.04 y 0.12 mg/kg junto con Tetrabenazina en una dosis (0.64 mg/kg). Todos los compuestos fueron inyectados sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una terapia de combinación que usa Pridopidina y Tetrabenazina para el tratamiento, prevención o alivio de un trastorno del movimiento.

Los efectos de la Pridopidina cuando se administra en combinación con Tetrabenazina sugieren, en primer lugar, que el efecto farmacológico primario de la Pridopidina, es decir, el bloqueo del receptor de dopamina D2, todavía está presente bajo la coadministración con Tetrabenazina. Esto se refleja en el incremento adicional del DOPAC estriatal inducido por Pridopidina en ratas tratadas con Tetrabenazina. Dado que un tono reducido en los receptores de D2 estriatales es el mecanismo propuesto por el cual la Tetrabenazina puede aliviar los movimientos involuntarios

en, por ejemplo, la enfermedad de Huntington, el trastorno de Tourette y la disquinesia tardía, esto sugiere que la combinación de Tetrabenazina con Pridopidina podría proporcionar un beneficio clínico adicional en estos trastornos.

5 En segundo lugar, la Pridopidina revirtió la inhibición conductual causada por la Tetrabenazina. Esta inhibición conductual es un correlato preclínico de algunos efectos secundarios problemáticos relacionados con la dopamina que limitan el uso de Tetrabenazina, especialmente los efectos secundarios motores claros, tales como el parkinsonismo, es decir, la motilidad reducida, pero también posiblemente el estado de ánimo deprimido. Se debe señalar que esta reversión de la inhibición conductual inducida por Tetrabenazina no se debe esperar de un compuesto que actúa como un antagonista puro en los receptores de dopamina D2, tal como Pridopidina, y no se observó en un estudio similar realizado con el antagonista de dopamina D2 Haloperidol. Más bien, el tratamiento
10 conjunto con Haloperidol redujo adicionalmente la actividad locomotora.

Por consiguiente, estos datos conductuales preclínicos implican que la Pridopidina podría contrarrestar los efectos adversos motores y afectivos de la Tetrabenazina. La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso como una
15 terapia complementaria o en combinación con una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para tratar un sujeto afectado por enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 En una realización, la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento de un sujeto afectado por enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.

En otra realización, la composición farmacéutica se va a administrar a un sujeto periódicamente tal que se administran 5-100 mg de Tetrabenazina al sujeto por día.

25 En algunas realizaciones, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma cuando se toman conjuntamente son más efectivas para tratar al sujeto que cuando cada agente se administra solo en la misma cantidad. En realizaciones adicionales, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma cuando se toma sola, o la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma cuando se toma sola, o cada una de tal cantidad cuando se toma sola no es efectiva para tratar un sujeto.

30 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso para reducir o prevenir uno o más efectos secundarios de la administración periódica de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en un sujeto, en la que el uno o más efectos secundarios se seleccionan de depresión, tendencias suicidas, acatisia, inquietud, agitación, parkinsonismo, sedación, somnolencia, y disfagia.

35 En una realización, el sujeto está afectado por un trastorno del movimiento, preferentemente enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.

En otra realización, la composición farmacéutica es efectiva para aliviar un síntoma del trastorno del movimiento, enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.

En algunas realizaciones, el síntoma es corea.

40 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para tratar un sujeto afectado por obesidad, un trastorno asociado a obesidad, o un efecto cardiovascular de la Pridopidina.

45 En una realización, la composición farmacéutica se va a administrar periódicamente tal que de 1.5 a 20 μmol de Pridopidina/kg de peso corporal del sujeto se administra al sujeto por día.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en administración simultánea, separada o secuencial con Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el tratamiento de un sujeto afectado por enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.

50 En una realización, la composición farmacéutica se va a administrar a un sujeto periódicamente tal que 5-100 mg de Tetrabenazina se administra al sujeto por día.

La invención también proporciona un producto que contiene una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso simultáneo, separado o secuencial para tratar un sujeto afectado por enfermedad de Huntington,

síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.

- 5 La memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para tratar un sujeto afectado por un trastorno del movimiento.
- 10 La memoria descriptiva también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para tratar un sujeto afectado por obesidad, un trastorno asociado con obesidad, o un efecto secundario cardiovascular de la Pridopidina.
- 15 En una realización, las cantidades cuando se toman conjuntamente son más efectivas para tratar al sujeto que cuando cada gente se administra solo con la misma cantidad.
- En una realización, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma cuando se toma sola, y la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable cuando se toma sola, o cada una de tales cantidades cuando se toman solas no es efectiva para tratar al sujeto.
- 20 La memoria descriptiva también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso para reducir o prevenir uno o más efectos secundarios de administrar periódicamente una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma a un sujeto.
- En una realización, el uno o más efectos secundarios se seleccionan de depresión, tendencias suicidas, acatisia, inquietud, agitación, parkinsonismo, sedación, somnolencia y disfagia.
- 25 En una realización, el efecto secundario es parkinsonismo.
- En una realización, el sujeto está afectado por un trastorno del movimiento.
- En una realización, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra por vía oral.
- 30 En una realización, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra diariamente.
- En una realización, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra dos veces al día.
- En una realización, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra tres veces al día.
- 35 En una realización, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es de 0.05 mg/kg por día a 0.20 mg/kg por día.
- En una realización, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es 5-100 mg/día.
- 40 En una realización, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es 12.5 mg/día, 25 mg/día, 37.5 mg/día, 50 mg/día, 75 mg/día, o 100 mg/día.
- En una realización, la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra por vía oral.
- En una realización, la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra diariamente.
- 45 En una realización, la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra dos veces al día.
- En una realización, la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es de 1.5 µmol/kg por día a 20 µmol/kg por día.
- 50 En una realización, la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es 10-100 mg/día.

En una realización, la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es 10 mg/día, 20 mg/día, 22.5 mg/día, 45 mg/día o 90 mg/día.

En una realización, el trastorno del movimiento es la enfermedad de Huntington, el síndrome de Tourette o la disquinesia tardía.

- 5 En una realización, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es efectiva para aliviar un síntoma del trastorno del movimiento.

En una realización, el síntoma es corea.

- 10 En una realización, el sujeto recibe terapia con Tetrabenazina antes de iniciar la administración de Pridopidina o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administran simultáneamente.

En una realización, el sujeto es un paciente humano.

La presente invención también proporciona un paquete que comprende:

- 15 a) una primera composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- b) una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y
- 20 c) instrucciones de uso para la primera y la segunda composiciones farmacéuticas juntas para tratar un sujeto afectado por un trastorno del movimiento.

En una realización, el paquete es para uso para tratar un sujeto afectado por un trastorno del movimiento.

En una realización, el trastorno del movimiento es la enfermedad de Huntington, el síndrome de Tourette o la disquinesia tardía.

- 25 La memoria descriptiva también describe Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso como terapia complementaria o en combinación con Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en el tratamiento de un sujeto afectado por un trastorno del movimiento.

En una realización, el trastorno del movimiento es la enfermedad de Huntington, el síndrome de Tourette o la disquinesia tardía.

- 30 La memoria descriptiva también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es 5-100 mg.

En una realización, la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es 5 mg, 6.25 mg, 12.5 mg, 25 mg, 37.5 mg, 50 mg, 75 mg o 100 mg.

- 35 En una realización, la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es 10-100 mg.

En una realización, la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es 10 mg, 22.5 mg, 45 mg o 90 mg.

En una realización, la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento de un sujeto afectado con un trastorno del movimiento.

- 40 En una realización, el trastorno del movimiento es la enfermedad de Huntington, el síndrome de Tourette o la disquinesia tardía.

En una realización, la composición farmacéutica es para uso en el tratamiento, prevención o alivio de un sujeto afectado por obesidad, un trastorno asociado a la obesidad o un efecto secundario cardiovascular de la Pridopidina.

La memoria descriptiva también describe el uso de:

- 45 a) una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y

b) una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma

en la preparación de una combinación para tratar a un sujeto afectado por un trastorno del movimiento en el que la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administran simultáneamente o contemporáneamente.

5 En una realización, el trastorno del movimiento es la enfermedad de Huntington, el síndrome de Tourette o la disquinesia tardía.

La memoria descriptiva también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en el tratamiento de un sujeto afectado por un trastorno del movimiento, en combinación con una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, mediante la administración periódica al sujeto de la composición farmacéutica y la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

10

La memoria descriptiva también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de un sujeto afectado por un trastorno del movimiento, en combinación con una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, administrando periódicamente al sujeto la composición farmacéutica y la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

15

En una realización, el trastorno del movimiento es la enfermedad de Huntington, el síndrome de Tourette o la disquinesia tardía.

La memoria descriptiva también proporciona Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el tratamiento de un sujeto afectado por un trastorno del movimiento, en la que la Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y la Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.

20

En una realización, el trastorno del movimiento es la enfermedad de Huntington, el síndrome de Tourette o la disquinesia tardía.

25

La memoria descriptiva también proporciona un producto que contiene una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un sujeto afectado por un trastorno del movimiento.

30 En una realización, el trastorno del movimiento es la enfermedad de Huntington, el síndrome de Tourette o la disquinesia tardía.

La memoria descriptiva también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para tratar un sujeto afectado por obesidad, un trastorno asociado con obesidad o un efecto secundario cardiovascular de Pridopidina que comprende administrar al sujeto una combinación de una terapéuticamente, en la que las cantidades cuando se toman conjuntamente son efectivas para tratar al sujeto.

35

40

En una realización, el sujeto es un paciente humano.

La memoria descriptiva también describe una combinación de Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; para el tratamiento, prevención o alivio de la obesidad, o un trastorno asociado a la obesidad, y para el tratamiento, prevención o alivio de los efectos secundarios cardiovasculares de la Pridopidina, en un mamífero, incluido un ser humano.

45

En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una terapia de combinación en la que se administra una cantidad farmacéuticamente efectiva de Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para el tratamiento, prevención o alivio de un trastorno del movimiento.

50 En una realización preferida, el trastorno del movimiento hiperkinético es un trastorno del movimiento hiperkinético involuntario que se deriva de la enfermedad de Huntington, el síndrome de Gilles de la Tourette o disquinesia tardía, y en particular un trastorno del movimiento hiperkinético involuntario que se deriva de la enfermedad de Huntington.

Vista desde otro aspecto, la memoria descriptiva describe una combinación de Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,

para uso como medicamento.

En otro aspecto, la memoria descriptiva describe el uso de una combinación de

(i) Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y

(ii) Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;

- 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención o alivio de un trastorno del movimiento de un mamífero, incluido un ser humano.

En otro aspecto, la memoria descriptiva describe composiciones farmacéuticas que comprenden Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en una terapia de combinación junto con Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para el tratamiento, prevención o alivio de un trastorno del movimiento hiperkinético.

- 10 En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el tratamiento, prevención o alivio de un trastorno del movimiento hiperkinético en un cuerpo de animal vivo.

- 15 En otro aspecto, la memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

- 20 En un aspecto adicional, la memoria descriptiva describe un kit de partes que comprende por lo menos dos formas de dosificación unitaria separadas (A) y (B), en el que (A) comprende Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (B) comprende Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y opcionalmente (C), instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de la Pridopidina de (A) y la Tetrabenazina de (B), a un paciente que lo necesite.

- 25 En un aspecto adicional, la memoria descriptiva describe un artículo de fabricación, que comprende (A) una primera forma de dosificación farmacéutica que comprende Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (B) una segunda forma de dosificación farmacéutica que comprende Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; en el que el artículo contiene primera y segunda formas de dosificación farmacéutica.

- 30 En un aspecto adicional, la memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para tratar a un sujeto afectado por un trastorno del movimiento, en el que las cantidades cuando se toman conjuntamente son efectivas para tratar a un paciente humano.

En una realización, el trastorno del movimiento es un trastorno del movimiento hiperkinético involuntario que se deriva de la enfermedad de Huntington, el síndrome de Gilles de la Tourette o la disquinesia tardía.

- 40 En una realización, el trastorno del movimiento es un trastorno del movimiento hiperkinético involuntario que se deriva de la enfermedad de Huntington

- 45 En un aspecto adicional, la memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente efectiva de la misma, para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente efectiva de la misma, para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para tratar un mamífero, incluido un ser humano, afectado por obesidad, o un trastorno asociado con obesidad o los efectos secundarios cardiovasculares de Pridopidina, en el que las cantidades cuando se toman conjuntamente son efectivas para tratar un mamífero.

- 50 En una realización, la cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y la cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administran oralmente.

En una realización, la cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y la cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administran intravenosamente.

5 En una realización, la cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y la cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administran por penetración directa del fármaco a través del estrato córneo.

El medicamento que contiene Pridopidina se puede aplicar simultáneamente con Tetrabenazina, de una manera secuencial, o por administración separada. Preferentemente, la Pridopidina se administra al mismo tiempo que la Tetrabenazina.

10 Actualmente se cree que se puede usar Pridopidina (coadministrada con Tetrabenazina) en una cantidad terapéuticamente efectiva en el intervalo de alrededor de 0.01-1000 mg de API diariamente, más preferido en el intervalo de alrededor de 1-500 mg de API diariamente, incluso más preferido en el intervalo de alrededor de 10-200 mg de API diariamente.

15 Actualmente se cree que se puede usar Tetrabenazina (coadministrada con Pridopidina) en una cantidad terapéuticamente efectiva en el intervalo de alrededor de 0.01-1000 mg de API diariamente, más preferido en el intervalo de alrededor de 1-500 mg de API diariamente, incluso más preferido en el intervalo de alrededor de 10-200 mg de API diariamente.

20 La Pridopidina y la Tetrabenazina se pueden administrar conjuntamente por cualquier vía convencional. En una realización preferida, la Pridopidina y la Tetrabenazina se administran oralmente, intravenosamente, intravascularmente, intraperitonealmente, subcutáneamente, intramuscularmente, inhalativamente, tópicamente, por parche o por supositorio.

En una realización más preferida, la Pridopidina y la Tetrabenazina se administran oralmente (p.o.).

En otra realización más preferida, la Pridopidina y la Tetrabenazina se administran intravenosamente (i.v.).

En otra realización, la Pridopidina y la Tetrabenazina se administran mediante inyección subcutánea (s.c.).

25 Cualquier combinación de dos o más de las realizaciones descritas aquí se considera dentro del alcance de la presente invención.

Sales farmacéuticamente aceptables

30 Los compuestos activos para uso según la invención se pueden proporcionar en cualquier forma apropiada para la administración prevista. Las formas apropiadas incluyen sales farmacéuticamente (es decir, fisiológicamente) aceptables, y formas pre- o pro-fármaco del compuesto de la invención.

35 Los ejemplos de sales de adición farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, las sales de adición de ácido inorgánico y orgánico no tóxico tales como el hidrocloreto, el hidrobromuro, el nitrato, el perclorato, el fosfato, el sulfato, el formiato, el acetato, el aconato, el ascorbato, el bencenosulfonato, el benzoato, el cinamato, el citrato, el embonato, el enantato, el fumarato, el glutamato, el glicolato, el lactato, el maleato, el malonato, el mandelato, el metanosulfonato, el naftaleno-2-sulfonato, el ftalato, el salicilato, el sorbato, el estearato, el succinato, el tartrato, el tolueno-p-sulfonato y similares. Tales sales se pueden formar mediante procedimientos bien conocidos y descritos en la técnica.

Composiciones Farmacéuticas

40 Aunque los compuestos para uso según la invención se pueden administrar en forma del compuesto en bruto, se prefiere introducir los ingredientes activos, opcionalmente en forma de sales fisiológicamente aceptables, en una composición farmacéutica junto con uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos, tampones, diluyentes y/u otras ayudas farmacéuticas habituales.

45 En una realización preferida, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos activos o sales o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para las mismas, y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos conocidos y usados en la técnica. El(Los) vehículo(s) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatible(s) con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial(es) para el receptor de los mismos.

50 La composición farmacéutica de la invención se puede administrar por cualquier vía conveniente, que se adapte a la terapia deseada. Las vías de administración preferidas incluyen la administración oral, en particular en comprimido, en cápsula, en gragea, en polvo o en forma líquida, y la administración parenteral, en particular la inyección cutánea, subcutánea, intramuscular o intravenosa. La composición farmacéutica de la invención se puede fabricar por la persona experta mediante el uso de métodos estándar y técnicas convencionales apropiadas para la formulación deseada. Cuando se desee, se pueden emplear composiciones adaptadas para proporcionar una liberación

sostenida del ingrediente activo.

Se pueden encontrar más detalles sobre las técnicas de formulación y administración en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, PA).

5 La dosificación real de cada uno de los ingredientes activos depende de la naturaleza y la gravedad de la enfermedad que se está tratando, del modo exacto de administración, de la forma de administración y es a discreción del médico, y se puede variar por valoración de la dosificación a las circunstancias particulares de esta invención para producir el efecto terapéutico deseado. Sin embargo, las dosis siguientes para el compuesto y el compuesto anti-obesidad se consideran apropiadas.

10 La dosis del compuesto se determina como el API (ingrediente farmacéutico activo), es decir, se calcula como la base libre.

Una dosificación diaria en el intervalo de alrededor de 0.1-2 mg de API al día, preferentemente de alrededor de 0.25-1 mg de API al día, especialmente 0.25, 0.5 o 1.0 mg de API al día, es apropiada para tratamientos terapéuticos. La dosis diaria del compuesto se puede administrar en una o varias dosis, tal como dos, por día. En una realización, la dosificación diaria se administra en una dosis.

15 Se contempla actualmente que la dosificación diaria del compuesto anti-obesidad está en el intervalo de alrededor de 0.1-500 mg de ingrediente activo dependiendo del compuesto real. Los intervalos de dosificación más específicos pueden estar en el intervalo de alrededor de 0.1-2 mg, alrededor de 1-10 mg, alrededor de 10-50 mg, alrededor de 25-100 mg, alrededor de 50-200 mg y alrededor de 100-500 mg al día. La dosificación diaria del compuesto anti-obesidad se puede administrar en una o varias dosis, tal como dos, por día. En una realización, la dosificación diaria se administra en una dosis.

20 Como se usa aquí, "efectiva" como en una cantidad efectiva para conseguir un fin quiere decir la cantidad de un componente que es suficiente para producir una respuesta terapéutica indicada sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica) acorde con una relación beneficio/riesgo razonable cuando se usa en la forma de esta descripción. Por ejemplo, una cantidad efectiva para tratar un trastorno del movimiento. La cantidad efectiva específica variará con factores tales como la afección particular que se está tratando, la condición física del paciente, el tipo de mamífero a tratar, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay) y las formulaciones específicas empleadas y la estructura de los compuestos o sus derivados.

25 Como se usa aquí, "tratar" o "que trata" incluye, por ejemplo, inducir la inhibición, regresión o estasis del trastorno y/o enfermedad. Como se usa aquí, "inhibición" de la progresión de la enfermedad o complicación de la enfermedad en un sujeto quiere decir prevenir o reducir la progresión de la enfermedad y/o la complicación de la enfermedad en el sujeto.

30 Como se usa aquí, "combinación" significa un conjunto de reactivos para uso en terapia, ya sea por administración simultánea o contemporánea. La administración simultánea se refiere a la administración de una mezcla (ya sea una mezcla verdadera, una suspensión, una emulsión u otra combinación física) de la Pridopidina y la Tetrabenazina. En este caso, la combinación puede ser la mezcla o recipientes separados de la Pridopidina y la Tetrabenazina que se combinan justo antes de la administración. La administración contemporánea se refiere a la administración separada de la Pridopidina y la Tetrabenazina al mismo tiempo, o en tiempos lo suficientemente cercanos como para que se observe una actividad sinérgica o una actividad que sea aditiva o más que aditiva en relación con la actividad de la Pridopidina o la Tetrabenazina solas.

35 Como se usa aquí, "DOPAC" es ácido 3,4-dihidroxifenilacético.

Como se usa aquí, "LMA" es actividad locomotora.

Como se usa aquí, "TBZ" es Tetrabenazina.

Kits Farmacéuticos de partes

45 La memoria descriptiva también describe un kit de partes que comprende por lo menos dos formas de dosificación unitaria separadas (A) y (B), en la que

(A) comprende Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y

(B) comprende Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y opcionalmente

50 (C) instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de la Pridopidina de (A) y la Tetrabenazina de (B), a un paciente que lo necesite.

La Pridopidina para uso según la invención y la Tetrabenazina para uso según la invención se pueden proporcionar preferentemente en una forma que es apropiada para la administración junto con la otra. Se desea que esto incluya

casos en los que se puede administrar una u otra de las dos formulaciones (opcionalmente repetidamente) antes, después y/o al mismo tiempo que la administración del otro componente.

5 Además, la Pridopidina para uso según la invención y la Tetrabenazina para uso según la invención se pueden administrar en forma combinada, o separadamente o separadamente y secuencialmente, en la que la administración secuencial es cercana en el tiempo o remota en el tiempo. Esto puede incluir en particular que dos formulaciones se administran (opcionalmente repetidamente) lo suficientemente cerca en el tiempo para que haya un efecto beneficioso para el paciente, que es mayor en el transcurso del tratamiento de la afección relevante que si cualquiera de las dos formulaciones se administra (opcionalmente repetidamente) sola, en ausencia de la otra formulación, durante el mismo curso de tratamiento. La determinación de si una combinación proporciona un mayor efecto beneficioso con respecto y durante el tratamiento de una afección particular, dependerá de la afección a tratar o prevenir, pero se puede conseguir rutinariamente por la persona experta en la técnica.

10 Cuando se usan en este contexto, los términos "administrada simultáneamente" y "administrada al mismo tiempo que" incluyen que las dosis individuales de Pridopidina y Tetrabenazina se administran dentro de 48 horas, por ejemplo, 24 horas entre sí.

15 Asociar los dos componentes entre sí, incluye que los componentes (A) y (B) se pueden proporcionar como formulaciones separadas (es decir, independientemente una de la otra), que posteriormente se unen para su uso en combinación en la terapia de combinación; o empaquetados y presentados juntos como componentes separados de un "paquete de combinación" para su uso en conjunción uno con el otro en la terapia de combinación.

20 Según la invención, también se proporciona un artículo de fabricación que comprende (A) una primera forma de dosificación farmacéutica que comprende Pridopidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (B) una segunda forma de dosificación farmacéutica que comprende Tetrabenazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; en la que el artículo contiene la primera y segunda forma de dosificación farmacéutica.

Terapia

25 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de Pridopidina o una sal farmacéuticamente efectiva de la misma para tratamiento, prevención o alivio de un trastorno del movimiento hiperkinético en un cuerpo animal vivo, incluido un ser humano.

30 El trastorno del movimiento hiperkinético puede ser en particular un trastorno del movimiento involuntario que se deriva de la enfermedad de Huntington, el síndrome de Gilles de la Tourette o la disquinesia tardía.

En una realización preferida, el trastorno del movimiento hiperkinético es un trastorno del movimiento involuntario que se deriva de la enfermedad de Huntington.

35 Introducción a los ejemplos

La función motora está controlada por un circuito complejo que conecta la corteza cerebral con estructuras subcorticales que incluyen los ganglios basales y el tálamo. Una vía principal dentro de este circuito es la llamada "vía indirecta" que forma un circuito cerrado de retroalimentación que conecta la corteza, el cuerpo estriado y el tálamo vía una población de neuronas espinosas GABAérgicas estriadas medianas que expresan receptores de tipo D2 de dopamina. Esta vía funciona como un regulador negativo de movimientos, y es importante para la supresión de movimientos excesivos. La dopamina modula la vía indirecta mediante los receptores inhibitorios de dopamina D2 de tal manera que el incremento del tono de dopamina en estos receptores conduce a una actividad reducida de la vía indirecta y, por lo tanto, a una capacidad reducida para suprimir los movimientos. Por otra parte, un tono de dopamina disminuido conduce a actividad incrementada de la vía indirecta asociada a una supresión más fuerte de movimientos.

Otra vía cortico-estriado-talámica importante implicada en el control motor es la llamada "vía directa", que forma un circuito cerrado de retroalimentación positiva vía neuronas espinosas GABAérgicas estriadas, medianas que expresan receptores de tipo D1 de dopamina. La vía directa es un modulador positivo de la función motora, implicado en la selección y habilitación de movimientos voluntarios. La dopamina, que actúa en los receptores de tipo D1, estimula las neuronas estriales GABAérgicas en la vía directa, mejorando por ello los movimientos. Por el contrario, una reducción del tono de dopamina en estos receptores D1 conduce a una capacidad reducida para realizar movimientos voluntarios.

55 La reducción general en la transmisión de dopamina resultante del tratamiento con Tetrabenazina también reduce otras funciones dependientes de la dopamina. En particular, el tono de dopamina en la vía directa, con neuronas estriales que expresan receptores de dopamina D1, también se reduce, lo que conduce a un debilitamiento de la vía directa y, por lo tanto, a una capacidad reducida para realizar movimientos voluntarios. Además, es probable que

el agotamiento de la dopamina inducido por la Tetrabenazina perjudique la motivación y la recompensa dependientes de la dopamina, que se supone que subyace a los efectos adversos prodepresivos de la Tetrabenazina.

5 Dado que la Pridopidina es un antagonista puro de los receptores de dopamina D2, sin actividad agonista, se esperaba que una combinación terapéutica de Pridopidina y Tetrabenazina condujera a un tono reducido adicionalmente en los receptores de dopamina D2 y, por lo tanto, a una reducción adicional de la actividad locomotora general, comparado con el tratamiento solo con Tetrabenazina.

Ejemplos

10 La invención se ilustra adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos, que no se pretende que estén limitando de ningún modo el alcance de la invención como se reivindica.

15 Los siguientes ejemplos exploran la interacción entre Pridopidina y Tetrabenazina con respecto a la actividad locomotora. También se determinaron los niveles estriatales de dopamina y DOPAC. La Tetrabenazina reduce los niveles de dopamina en los tejidos como consecuencia directa de la inhibición de VMAT. Ambos compuestos incrementan los niveles de DOPAC estriatal de una manera dependiente de la dosis in vivo, lo que refleja un tono disminuido en el receptor de dopamina D2 (Ponten 2010; Reches, 1983). Además, el efecto sobre la expresión del gen temprano inmediato Arc (proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad / gen regulado por actividad 3.1) se midió en la corteza frontal y el cuerpo estriado. La expresión del gen Arc es un biomarcador que refleja la actividad sináptica (Steward, 2001; Kawashima 2009). También se realizaron experimentos de interacción con Tetrabenazina y el antagonista de dopamina D2 Haloperidol para comparar los efectos de la Pridopidina con los de un antagonista de receptor D2 de dopamina clásico.

1) Efecto de la Tetrabenazina en la actividad locomotora, DOPAC estriatal y Arc

Se administró Tetrabenazina sc a 0.37, 0.64 y 1.1 mg/kg. La LMA se registró durante 60 minutos después de la dosificación. A continuación se sacrificaron las ratas y se recogieron los cerebros. Los análisis de los tejidos cerebrales incluyeron DOPAC en el cuerpo estriado y ARNm de Arc en la corteza frontal y el cuerpo estriado.

25 La Tetrabenazina redujo la actividad locomotora. (Fig. 1). La dosis de Tetrabenazina inhibió de forma dependiente la actividad locomotora espontánea. Cuando se consideró la hora completa de registro, el grupo de dosis de Tetrabenazina de 1.1 mg/kg mostró una reducción significativa al 40% de la media del grupo de control de vehículo ($P<0.01$). Durante los 15 minutos iniciales se observaron reducciones significativas ($P<0.05$) para los grupos de dosis de Tetrabenazina tanto de 1.1 como de 0.37 mg/kg, mientras que para el período 15-60 minutos después de la administración se observaron efectos significativos ($P<0.05$) a 0.64 y 1.1 mg/kg. La reducción en la actividad locomotora refleja la disminución de la transmisión de dopamina causada por la inhibición de VMAT2.

30 La dosis de Tetrabenazina incrementa de manera dependiente el DOPAC estriatal, con efectos estadísticamente significativos en todas las dosis analizadas. El incremento de DOPAC es un marcador neuronal del tono reducido en los receptores de dopamina D2, debido a la disminución de la transmisión de dopamina en ratas tratadas con Tetrabenazina. Véase la Tabla 1 y la Fig. 1-2.

35 Arc en el cuerpo estriado y la corteza: la Tetrabenazina incrementó el Arc estriatal y redujo el Arc de la corteza frontal. La dosis de Tetrabenazina incrementó de manera dependiente el ARNm de Arc en el cuerpo estriado, llegando al 147% de la media del grupo de control de vehículo ($P<0.01$) con la dosis más alta ensayada (1.1 mg/kg). En la corteza frontal, se observó una reducción significativa del ARNm de Arc hasta el 66% de la media del grupo de control de vehículo con una dosis de Tetrabenazina de 1.1 mg/kg ($P<0.05$). Con la dosis de Tetrabenazina de 0.64 mg/kg, hubo una tendencia hacia una reducción en el ARNm de la corteza frontal (83% de la media del grupo de control, $p=0.14$). Véase la Fig. 3. El incremento de Arc en el cuerpo estriado probablemente se deba a un tono reducido en los receptores de dopamina D2. Es probable que la disminución de Arc en la corteza frontal esté relacionada con una disminución de la transmisión de dopamina en la corteza que conduce a un tono reducido en los receptores de dopamina D1.

2) Efecto de la Pridopidina sobre la actividad locomotora, DOPAC estriatal y Arc

40 Se administró Pridopidina sc a 11, 33 y 100 $\mu\text{mol/kg}$. La Pridopidina no mostró ningún efecto inhibitor sobre la actividad locomotora espontánea. Se observó un ligero incremento en la actividad locomotora a la dosis media, 33 $\mu\text{mol/kg}$, durante el período completo de registro de 60 minutos. Véase la Fig. 4. Cuando se examinó la hora completa de registro, se observó un incremento significativo en la actividad locomotora al 138% de la media del grupo de control de vehículo para el grupo de dosis de Pridopidina de 33 $\mu\text{mol/kg}$ ($P<0.05$). Durante los 15 minutos iniciales, se observó un incremento significativo ($P<0.05$) para el grupo de dosis de Pridopidina de 11 $\mu\text{mol/kg}$, mientras que durante el período 15-60 minutos después de la dosificación no se observaron efectos significativos.

55 La dosis de Pridopidina incrementa de manera dependiente el DOPAC estriatal, con efectos estadísticamente significativos en todas las dosis ensayadas. El incremento de DOPAC es un marcador neuronal de tono reducido en los receptores de dopamina D2, debido al antagonismo del receptor de dopamina D2 ejercido por la Pridopidina.

Véase la Fig. 5 y la Tabla 1.

5 La Pridopidina incrementó de manera dependiente de la dosis la expresión del gen Arc estriatal y cortical, alcanzando significación estadística a las dosis más altas ensayadas. La Pridopidina incrementó los niveles de ARNm de Arc en la corteza frontal de manera dependiente de la dosis, hasta 149% ($p < 0.01$) y 222% ($p < 0.001$) de la media del grupo de control de vehículo a dosis de 33 $\mu\text{mol/kg}$ y 100 $\mu\text{mol/kg}$, respectivamente (Fig. 6). La Pridopidina incrementó los niveles de ARNm de Arc en el cuerpo estriado de una manera dependiente de la dosis. En comparación con las medias del grupo de control relevante, los niveles llegaron a 168% y 253% ($p < 0.01$ para ambas dosis de Pridopidina 33 $\mu\text{mol/kg}$ y 100 $\mu\text{mol/kg}$, respectivamente). (Fig. 6). El incremento de Arc en el cuerpo estriado probablemente se deba al tono reducido en los receptores de dopamina D2. El incremento de Arc en la corteza frontal es probable que esté relacionado con el incremento de transmisión de dopamina en la corteza lo que conduce a un tono incrementado en los receptores de dopamina D1.

3) Efecto del Haloperidol sobre la actividad locomotora, DOPAC estriatal y Arc

15 Se administró Haloperidol sc a 0.12, 0.37 y 1.1 mg/kg (véase la Fig. 7). En un experimento adicional que evalúa los efectos a dosis más bajas, se administraron 0.04, 0.12, 0.37 y 1.1 mg (véase la Fig. 8). El Haloperidol mostró un efecto inhibitor dependiente de la dosis sobre la actividad locomotora espontánea. Se observaron efectos estadísticamente significativos a 0.12 mg/kg y dosis más altas, pero no a la dosis más baja ensayada, 0.04 mg/kg.

20 Más específicamente, cuando se consideró la hora completa de registro, los grupos de dosis de Haloperidol de 0.37 y 1.1 mg/kg mostraron reducciones significativas hasta alrededor del 35% de la media del grupo de control de vehículo ($P < 0.05$). Durante los 15 minutos iniciales, se observaron reducciones significativas ($P < 0.05$) para los grupos de dosis de Haloperidol tanto de 0.37 como de 1.1 mg/kg, mientras que para el período 15-60 minutos después de la dosificación se observó un efecto significativo ($P < 0.05$) para el grupo de dosis de 1.1 mg/kg solo.

La dosis de Haloperidol incrementa de manera dependiente el DOPAC estriatal, con efectos estadísticamente significativos a todas las dosis ensayadas. El incremento de DOPAC es un marcador neuronal de tono reducido en los receptores de dopamina D2, debido al antagonismo del receptor de dopamina D2. Véase la Tabla 1 y la Fig. 9)

25 La dosis de Haloperidol incrementó de manera dependiente el ARNm de Arc en el cuerpo estriado, llegando al 262% ($P < 0.01$), 331% ($P < 0.001$), 409% ($P < 0.01$), respectivamente, de la media del grupo de control de vehículo a las dosis de 0.12 mg/kg, 0.37 mg/kg y 1.1 mg/kg. El incremento de Arc en el cuerpo estriado probablemente se deba al tono reducido en los receptores de dopamina D2. No hubo un efecto significativo del Haloperidol en la expresión del gen Arc cortical. Véase la Fig. 10)

Tabla 1. Efectos sobre DOPAC estriatal en ratas no tratadas con fármaco y tratadas con Tetrabenazina

| Compuesto de ensayo | Dosis Grupo | Dosis-respuesta en ratas no tratadas | Dosis-respuesta en ratas no tratadas | Interacción con Tetrabenazina | Interacción con Tetrabenazina |
|----------------------|-------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | DOPAC cuerpo estriado | DA cuerpo estriado | DOPAC cuerpo estriado | DA cuerpo estriado |
| Tetrabenazina | | | | | |
| | | 100 ± 6 | 100 ± 6 | – | – |
| | 0.37 mg/kg | 144 ± 8** | 48 ± 2*** | – | – |
| | 0.64 mg/kg | 208 ± 14*** | 33 ± 3*** | – | – |
| | 1.1 mg/kg | 263 ± 19*** | 20 ± 2*** | – | – |
| Pridopidina | | | | | |
| | C | 100 ± 5 | 100 ± 3 | 53 ± 1 ^{††} | 299 ± 13 ^{†††} |
| | TC | – | – | 100 ± 11 | 100 ± 10 |
| | 11 µmol/kg | 117 ± 5* | 104 ± 3 | – | – |
| | 33 µmol/kg | 178 ± 7*** | 101 ± 3 | 123 ± 8 | 91 ± 11 |
| | 100 µmol/kg | 236 ± 17*** | 73 ± 4** | 155 ± 4 ^{††} | 98 ± 8 |
| Haloperidol | | | | | |
| | C | 100 ± 22 | 100 ± 5 | 65 ± 3 ^{†††} | 202 ± 9 ^{†††} |
| | TC | – | – | 100 ± 3 | 100 ± 8 |
| | 0.04 mg/kg | 171 ± 35 | 95 ± 5 | 187 ± 6 ^{†††} | 79 ± 3 [†] |
| | 0.12 mg/kg | 276 ± 8*** | 78 ± 3** | 218 ± 12 ^{†††} | 87 ± 10 |
| | 0.37 mg/kg | 254 ± 17** | 79 ± 5* | – | – |
| | 1.1 mg/kg | 292 ± 10*** | 81 ± 2* | – | – |

Los datos se muestran como niveles de DOPAC media ± SEM, expresados como porcentajes de la media del grupo de control.

C, grupo de control de vehículo; DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético; TC, grupo de control de Tetrabenazina

5 *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001 vs. grupo de control de vehículo; †p <0.05; ††p <0.01; †††p <0.001 vs. grupo de control de Tetrabenazina.

10 En resumen, aunque los tres compuestos antidopaminérgicos produjeron un incremento de DOPAC estriatal y una mayor expresión del gen Arc estriatal, ambos efectos lo más probablemente relacionados con la disminución del tono en los receptores de dopamina D2, la Pridopidina fue única por el hecho de que no inhibió la actividad locomotora. Otra característica que diferencia la Pridopidina de Haloperidol o Tetrabenazina es que incrementa la expresión del gen Arc cortical.

Experimentos de combinación

15 Para ensayar el efecto del antagonista de la dopamina D2 cuando se administra a animales parcialmente empobrecidos en dopamina, el Haloperidol y la Pridopidina se combinaron con Tetrabenazina a una dosis que produjo efectos submáximos pero significativos sobre la actividad locomotora y dopac estriatal.

4) Efecto de la Pridopidina sobre la reducción de la actividad locomotora inducida por Tetrabenazina, incremento de la dopamina estriatal y Arc

20 En el experimento de interacción con Pridopidina y Tetrabenazina, se administró Pridopidina a 33 y 100 µmol/kg, combinada con Tetrabenazina a 0.64 mg/kg. Véase la Fig. 11. Los registros locomotores demostraron que la Pridopidina revirtió la inhibición conductual inducida por la Tetrabenazina. Sin embargo, los efectos sobre el DOPAC estriatal eran aditivos, es decir, la coadministración de Pridopidina incrementó adicionalmente el DOPAC estriatal.

25 Para la inhibición locomotora, hubo una disminución significativa en el grupo de control de Tetrabenazina frente a los controles tratados con vehículo durante la hora completa de registro (P<0.001), así como tanto para el período de 0-15 min (P<0.01) como para el período de 15-60 min (P<0.01). Considerando la hora completa de registro, la Pridopidina revirtió la inhibición locomotora inducida por Tetrabenazina en los grupos de dosis de 33 y 100 µmol/kg, llegando al 135% (P<0.05) y 137% (P<0.01), respectivamente, de la media de control de Tetrabenazina. Durante los

períodos de 0-15 minutos, así como durante los períodos de 15-60 minutos, este efecto de reversión alcanzó importancia para el grupo de dosis de 100 µmol/kg de Pridopidina. Esto implica que el tono en los receptores D2 estriatales se reduce adicionalmente cuando se añade Pridopidina a animales empobrecidos en monoamina. Véase la Fig. 11)

- 5 En el experimento de interacción en el que se combinó 0.64 mg/kg de Tetrabenazina con 33 µmol/kg o 100 µmol/kg de Pridopidina, se observó que la Tetrabenazina indujo un incremento significativo de los niveles de DOPAC estriatal en comparación con el grupo de control tratado con vehículo ($p < 0.01$; Tabla 1). La Pridopidina incrementó adicionalmente los niveles de DOPAC en el cuerpo estriado, alcanzando el 155% de la media del grupo de control de Tetrabenazina a la dosis de 100 µmol/kg ($p < 0.01$). Véase la Tabla 1 y la Fig. 12)
- 10 Similarmente, la expresión de Arc estriatal se incrementó adicionalmente al añadir Pridopidina. En contraste, la disminución de Arc inducida por la Tetrabenazina fue contrarrestada por la Pridopidina.

La Pridopidina revirtió la disminución de Arc de la corteza frontal inducida por la Tetrabenazina como se muestra en la Fig. 13. Más específicamente, la Tetrabenazina no tuvo un efecto significativo sobre el ARNm de Arc estriatal a la dosis de 0.64 mg/kg usada en el experimento de interacción. La Pridopidina, cuando se coadministra con Tetrabenazina, incrementó el Arc estriatal de forma dependiente de la dosis, alcanzando el 144% ($P < 0.05$) y 207% ($P < 0.01$), respectivamente, de la media del grupo de control de Tetrabenazina a las dosis de 33 µmol/kg y 100 µmol/kg de Pridopidina.

15

La Tetrabenazina indujo una disminución significativa ($P < 0.05$) en el ARNm de Arc de la corteza frontal, que está de acuerdo con la tendencia hacia una disminución del ARNm de Arc de la corteza frontal a la dosis de 0.64 mg/kg observada en el experimento de respuesta a la dosis con Tetrabenazina (Fig. 3). La dosis de Pridopidina revirtió de manera dependiente la disminución del ARNm de Arc de la corteza frontal inducida por Tetrabenazina. A 33 µmol/kg y 100 µmol/kg de Pridopidina, el ARNm de Arc se incrementó a 125% ($P < 0.05$) y 193% ($P < 0.05$), respectivamente, de la media del grupo de control de Tetrabenazina

20

5) Efecto del Haloperidol sobre la reducción de la actividad locomotora inducida por Tetrabenazina, el incremento de la dopamina estriatal y Arc

25

En el experimento de interacción con Haloperidol y Tetrabenazina, se administró Haloperidol a 0.04 y 0.12 mg/kg, combinado con Tetrabenazina a 0.64 mg/kg.

Los registros locomotores mostraron que el Haloperidol redujo adicionalmente la actividad locomotora en animales tratados con Tetrabenazina. Más específicamente, el registro locomotor durante la hora completa demostró que el Haloperidol redujo significativamente ($P < 0.01$) la actividad locomotora en ratas tratadas con Tetrabenazina a la dosis tanto de 0.04 como de 0.12 mg/kg, hasta 51% y 41% de la media del grupo de control de Tetrabenazina, respectivamente. Durante los primeros 15 minutos de registro, este efecto reductor fue significativo en las dosis tanto de 0.04 mg/kg ($P < 0.01$) como de 0.12 mg/kg ($P < 0.05$), mientras que para el período de 15-60 minutos la reducción fue significativa para la dosis de 0.12 mg/kg solamente ($P < 0.05$). Véase la Fig. 14)

30

Los efectos sobre el DOPAC estriatal fueron aditivos, es decir, la administración conjunta de Haloperidol con Tetrabenazina causó incrementos adicionales en el DOPAC estriatal. En el experimento de interacción en el que la Tetrabenazina 0.64 mg/kg se combinó con Haloperidol 0.04 mg/kg o 0.12 mg/kg, la Tetrabenazina indujo un incremento significativo en los niveles de DOPAC estriatal en comparación con el grupo de control tratado con vehículo ($p < 0.001$; Tabla 1). El Haloperidol incrementó adicionalmente los niveles de DOPAC en el cuerpo estriado, alcanzando el 187% y 218% de la media del grupo de control de Tetrabenazina a las dosis de 0.04 mg/kg y 0.12 mg/kg, respectivamente ($p < 0.001$ para ambas dosis). Véase la Tabla 1 y la Fig. 15.

35

40

No hubo un efecto significativo del Haloperidol sobre la expresión del gen Arc cortical en ratas co-tratadas con Tetrabenazina. El Haloperidol incrementa adicionalmente el Arc estriatal en animales tratados con Tetrabenazina (Fig. 16). La Tetrabenazina no tuvo un efecto significativo sobre el ARNm del Arc estriatal a la dosis de 0.64 mg/kg usada en el experimento de interacción. El Haloperidol, cuando se coadministra con Tetrabenazina, incrementó el Arc estriatal de forma dependiente de la dosis, alcanzando el 272% ($P < 0.001$) y el 400% ($P < 0.001$), respectivamente, de la media del grupo de control de Tetrabenazina a las dosis de 0.04 mg/kg y 0.12 mg/kg de Haloperidol.

45

La Tetrabenazina tendió a disminuir el ARNm de Arc de la corteza frontal ($P = 0.08$), lo cual está de acuerdo con la tendencia hacia una disminución del ARNm de Arc de la corteza frontal a la dosis de 0.64 mg/kg observada en el experimento de respuesta a la dosis con Tetrabenazina (Fig. 3), y la disminución significativa observada en el experimento de interacción con Pridopidina y Tetrabenazina (Figura 13). No hubo un efecto significativo del Haloperidol sobre el ARNm de Arc de la corteza frontal en animales tratados con Tetrabenazina.

50

Métodos de ensayo

55 Los siguientes ensayos se usan para la evaluación de los compuestos para uso según la invención.

Animales

Se usaron ratas macho Sprague-Dawley de B&K Scanbur (Sollentuna, Suecia) (IBBS58), Charles River (Köln, Alemania) (KR104, BS31) o Taconic (Ejby, Dinamarca) (BS85, BS81, KR219, TA284). Las ratas pesaban 160-180 g en el momento de la llegada. Las ratas pesaban 220-260 g en el momento de los estudios de neuroquímica locomotora y tisular. Los animales fueron alojados cinco animales por jaula con luces encendidas entre las 06:00 y las 18:00. Todos los experimentos se llevaron a cabo de conformidad con la legislación sueca de protección animal y con la aprobación del Comité de Ética Animal local en Gotemburgo.

Dosificación

IBBS58: los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl) y ACR16 ensayado a tres dosis (11; 33 y 100 µmol/kg).

BS31: Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (5.5% v/peso de glucosa) y Haloperidol ensayado a tres dosis (0.12; 0.37 y 1.1 µmol/kg).

KR104: Los animales se distribuyeron en cinco grupos de tratamiento diferentes, n = 4. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (5.5% v/peso de glucosa) y Haloperidol ensayado a cuatro dosis (0.04; 0.12; 0.37 y 1.1 µmol/kg).

KR219: Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en Vehículo (5.5% v/peso de glucosa) y Tetrabenazina ensayada a tres dosis (0.37; 0.64 y 1.1 µmol/kg).

BS81: Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en el Vehículo 1:1 (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl + 5.5% de glucosa con algunas gotas de HAc) el segundo grupo consistía en una dosis única de Tetrabenazina (0.64 mg/kg) y el tercer y cuarto grupo consistían en NS30016 ensayado a dos dosis (33 y 100 µmol/kg junto con Tetrabenazina en una dosis (0.64 mg/kg).

TA284: Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 10. Los grupos de tratamiento consistían en el Vehículo 1:1 (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl + 5.5% de glucosa con unas pocas gotas de HAc) el segundo grupo consistía en una dosis única de Tetrabenazina (0.64 mg/kg) y el tercer y cuarto grupo consistía en NS30016 ensayado a dos dosis (33 y 100 µmol/kg junto con Tetrabenazina a una dosis (0.64 mg/kg). No se recogió tejido cerebral de este experimento.

BS85: Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de tratamiento diferentes, n = 5. Los grupos de tratamiento consistían en el Vehículo 1:1 (disolución salina; 0.9% v/peso de NaCl + 5.5% de glucosa con algunas gotas de HAc) el segundo grupo consistía en una dosis única de Tetrabenazina (0.64 mg/kg) y el tercer y cuarto grupo consistía en Haloperidol ensayado en dos dosis (0.04 y 0.12 mg/kg junto con Tetrabenazina a una dosis (0.64 mg/kg).

Todos los compuestos se inyectaron sc cuatro minutos antes del inicio del registro de la actividad locomotora a un volumen de 5 ml/kg.

Ensayo in vivo: conducta

La actividad conductual se mide usando ocho monitores de actividad Digiscan (RXYZM (16) TAO, Omnitech Electronics, Columbus, Ohio, EE.UU.), conectados a un analizador Omnitech Digiscan y a un ordenador Apple Macintosh equipado con una placa de interfase digital (NB DIO-24, National Instruments, EE.UU.). Cada monitor de actividad consiste en una estructura metálica cuadrada equipada con sensores de haz de luz. Durante las medidas de la actividad conductual, se coloca una rata en una jaula acrílica transparente con suelo negro mate (W × L × H, 41 × 41 × 30 cm) que a su vez se coloca en el monitor de actividad. Cada monitor de actividad está equipado con tres filas de sensores de rayos de luz infrarroja, cada fila consiste en 16 sensores. Se colocan dos filas a lo largo del frente y el costado del suelo de la jaula, en un ángulo de 90 grados, y la tercera fila se coloca 10 cm por encima del suelo para medir la actividad vertical. Los sensores de haz de luz están separados 2.5 cm. Cada monitor de actividad está instalado en una caja de atenuación de luz y sonido idéntica (W × L × H — 55 × 55 × 45) que contiene una luz doméstica débil y un ventilador.

El software del ordenador está escrito usando programación orientada a objetos (LabVIEW™, National Instruments, Austin, Texas, EE.UU.).

Los datos conductuales de cada monitor de actividad, que representan la posición (centro de gravedad horizontal y actividad vertical) del animal en cada momento, se registran a una frecuencia de muestreo de 25 Hz y se recogen usando una aplicación de LABView™ escrita a medida. Los datos de cada sesión de grabación se almacenan y analizan con respecto a la distancia recorrida. Cada sesión de registro conductual dura 60 minutos, comenzando aproximadamente 4 minutos después de la inyección del compuesto de ensayo. Los resultados se presentan como cuentas/60 minutos, cuentas/45 minutos o cuentas/15 minutos, en unidades de longitud arbitrarias. Las comparaciones estadísticas se llevan a cabo usando el test t de Student frente el grupo de control.

Ensayo in vivo: neuroquímica

Inmediatamente después de las sesiones de actividad conductual, las ratas se decapitan y sus cerebros se sacan rápidamente y se ponen en una placa de Petri enfriada con hielo.

5 Los cerebros se diseccionaron en cuerpo estriado, región límbica (que contiene el núcleo accumbens, tanto el núcleo como la envoltura, amígdala, la mayor parte del tubérculo olfatorio y pálido ventral), corteza frontal e hipocampo. Las muestras de tejido se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80°C hasta que se
 10 homogeneizó con ácido perclórico (PCA) (0.1M), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (5.37 mM), glutatión (GSH) (0.65 mM) y alfa-metil-dopamina (0.25 µM) como estándar interno. Se usó un sonicador digital (Branson Digital Sonifier 250-D) para homogeneizar el tejido del cuerpo estriado y la región límbica. El tejido de la corteza se
 15 homogeneizó usando un homogeneizador Ultra Turrax T25. Todas las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos a + 4°C. El tejido de la corteza se filtró en papel de filtro Munktell de 5.5 cm de calidad 1F. Los eluidos tisulares se analizaron con respecto a las concentraciones tisulares (ng/g de tejido) de las sustancias
 20 transmisoras de monoamina (norepinefrina (NA), dopamina (DA), 5-hidroxitriptamina (5-HT)), así como sus metabolitos de amina (normetanefrina (NM), 3-metoxitiramina (3-MT)) y metabolitos ácidos (3,4-dihidroxifenilalanina (DOPAC), ácido 5-hidrocindolacético (5-HIAA), ácido homovanílico (HVA)) mediante separaciones por HPLC y
 detección electroquímica (HPLC/EC). Los estándares madre (DA, NA, 5-HT, 3-MT, DOPAC, HVA, HIAA, 500 µg/ml) y el estándar interno (AMDA 500 µg/ml) se preparan una vez cada tres meses. 5-HT y 5HIAA se disuelven en agua
 milliQ. DA, NA, DOPAC, NM, 3-MT y HVA se disuelven en HCl 0.01 M. 5-HT, 5-HIAA, NM y HVA se mantienen en el refrigerador; DA, DOPAC, NA y 3-MT se mantienen en el congelador. La disolución estándar para análisis que
 contienen estándares diluidos en disolución homogeneizante hasta una concentración de 0.05 µg/ml se prepara
 diariamente.

25 El método analítico se basa en dos separaciones cromatográficas dedicadas a aminas o ácidos. Dos sistemas cromatográficos comparten un autoinyector común con una válvula de 10 puertos y dos bucles de muestra para inyección simultánea en los dos sistemas. Ambos sistemas están equipados con una columna de fase inversa (Luna C18 (2), dp 3 µm, 50 × 2 mm i.d., Phenomenex) y la detección electroquímica se realiza a dos potenciales en
 30 electrodos de carbono vidrioso (MF-1000, Bioanalytical Systems, Inc.). El efluente de la columna se pasa vía una conexión en T a la celda de detección o a una salida de residuos. Esto se consigue mediante dos válvulas de solenoide, que bloquean la salida de residuos o del detector. Al evitar que el frente cromatográfico llegue al detector, se consiguen mejores condiciones de detección. La fase móvil acuosa (0.4 ml/min) para el sistema ácido contiene
 ácido cítrico 14 mM, citrato de sodio 10 mM, MeOH 15% (v/v) y EDTA 0.1 mM. Los potenciales de detección relativos a la referencia de Ag/AgCl son 0.45 y 0.60V. La fase móvil de apareamiento iónico acuosa (0.5 ml/min) para el sistema de amina contiene ácido cítrico 5 mM, citrato sódico 10 mM, MeOH 9% (v/v), MeCN 10.5% v/v), ácido
 decanosulfónico 0.45 mM, y EDTA 0.1 mM. Los potenciales de detección relativos a la referencia de Ag/AgCl son 0.45 y 0.65V.

35 PCR

Los siguientes métodos se usaron para los datos mostrados en la Fig. 3, la Fig. 13, y la Fig. 16:

40 El ARN total se prepara por el método del isotiocianato de guanidina (Chomczynski, 1987). Los pellets de ARN se disuelven en agua MQ y se almacenan a -80°C. La concentración de la muestra se determina espectrofotométricamente mediante un NanoDrop ND-1000. Un número indicador de calidad y un número de integridad de ARNr se miden con un Experion (Bio-Rad) en muestras aleatorias.

Se realiza una transcripción inversa de dos etapas usando un kit SuperScript III (Invitrogen). Se transcribe inversamente 1 µg de ARN total con 5 µl de 2 × mezcla de reacción RT, 1 µl de mezcla de enzima RT, se ajustó el volumen a 10 µl con agua tratada con DEPC. Se añade 1 U de E. coli RNase H. El ADNc se diluye 40 veces y se
 almacena a -20°C.

45 Tres secuencias (un gen de interés y dos genes de referencia) se amplifican juntas en una reacción de PCR triplex. Para medidas de PCR en tiempo real: 5 µl del ADNc de la reacción se amplifica en una mezcla de reacción de 20 µl que contiene 10 µl de tampón Quanta, 3.5 µl de MQ, 0.15 µM de cada cebador y 0.1 µM de cada sonda. La PCR en tiempo real se mide en CFX96 (Biorad) usando la siguiente configuración para todos los genes: 3 minutos de
 50 preincubación a 95 grados C seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 grados C durante 15 s, hibridación y alargamiento a 60 grados C durante 1 minuto.

Los genes de referencia son HPRT y ciclofilina.

Las secuencias de cebador y sonda son las siguientes para la medida de arc:

Gen regulado por actividad (Arc) (Número de acceso U19866)

Sentido: 5'-GGA GTT CAA GAA GGA GTT TC-3'

55 Antisentido: 5'-CCA CAT ACA GTG TCT GGT A-3'

Sonda: CCG CTT ACG CCA GAG GAA CT

Colorante: 5'FAM

Apagador: 3'BHQ1

Tamaño del producto: 149

5 Hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT) (Número de acceso AF001282)

Sentido: 5'-AGG GAT TTG AAT CAT GTT TG-3'

Antisentido: 5'-CTG CTA GTT CTT TAC TGG C-3'

Sonda: TGT AGA TTC AAC TTG CCG CTG TC

Colorante: 5'HEX

10 Apagador: 3'BHQ1

Tamaño del producto: 121

Ciclofilina A (número de acceso M19533)

Sentido: 5'-CTG GAC CAA ACA CAA ATG-3'

Antisentido: 5'-ATG CCT TCT TTC ACC TTC-3'

15 Sonda: TTG CCA TCC AGC CAC TCA GT

Colorante: 5'Texas rojo

Apagador: 3'BHQ2

Tamaño del producto: 100

20 Los productos de PCR correctos se confirman mediante electroforesis en gel de agarosa (2%). Los productos de PCR se purifican con un kit de purificación de PCR de Qiagen (Valencia, CA, EE.UU.). Todos los genes se secuencian en MWG, Alemania. Las cantidades de genes de interés se normalizan con los dos genes de referencia HPRT y ciclofilina A.

Para los datos mostrados en la Fig. 6, la transcripción inversa y la PCR se realizaron de la siguiente manera:

25 La transcripción inversa se realiza usando un kit ThermoScript (Invitrogen). 1 µg de ARN total se transcribe de forma inversa con 25 µmol de oligo (dT), 62.5 ng de hexámeros aleatorios, 7.5 U de ThermoScript RT, 10 U de RNaseOut, 2 µl de 5 × tampón de síntesis de cDNA, dNTP 1 mM, DTT 0.05 M, ajuste del volumen a 10 µl con agua tratada con DEPC. A continuación, el ADNc se diluye 40 veces y se almacena a -20°C.

30 Para medidas de PCR singleplex en tiempo real: 0.7 µl del ADNc de la reacción se amplifica en una mezcla de reacción de 25 µl que contiene 1 × tampón pcr, dNTP 0.2 mM, MgCl₂ 3.7 mM, verde SYBR 0.15 mM, 0.4 µM de cebador y 1 U de Taq polimerasa. La PCR en tiempo real se mide en Icyler (Biorad) usando la siguiente configuración para todos los genes: pre-incubación de 60 s a 95°C seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 20 s, hibridación a 56°C durante 20 s, alargamiento a 72°C durante 30 s.

Análisis de ARNm de Arc: respuesta a la dosis y estudios de interacción para Tetrabenazina, Pridopidina y Haloperidol

35 El ARN total se preparó mediante el método del isotiocianato de guanidina (Schaefer 1984). Los pellets de ARN se disolvieron en agua ultrapura y se almacenaron a -80°C. La concentración de ARN se determinó espectrofotométricamente usando un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). Se determinó un número indicador de calidad y un número de integridad de ARN ribosómico para muestras aleatorias usando un sistema de electroforesis Experion (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EE.UU.). La transcripción
40 inversa se realizó usando un kit SuperScript III o un kit ThermoScript (ambos de Life Technologies Europe BV, Estocolmo, Suecia). Para los estudios de interacción y respuesta a la dosis de Tetrabenazina, se transcribió inversamente 1 µg de ARN con 5 µl de 2 × mezcla de reacción RT y 1 µl de mezcla de enzima RT (kit SuperScript III); para estudios con Pridopidina y Haloperidol, se transcribió inversamente 1 µg de ARN usando un kit
45 ThermoScript con 25 pmol de oligo (dT), 62.5 ng de hexámeros aleatorios, 7.5 U de transcriptasa inversa ThermoScript, 10 U de RNaseOut, 2 µl de 5 × tampón de síntesis de ADNc, dNTPs 1 mM y ditioneitol 0.05 M. En todos los estudios, el volumen de ADNc se ajustó a 10 µl con agua tratada con dietilpirocarbonato. Se añadió RNasa H de Escherichia coli (1 U), a continuación el ADNc se diluyó 40 veces y se almacenó a -20°C.

El ADNc de Arc y dos genes de referencia, hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HPRT) y ciclofilina A, se amplificaron por PCR en tiempo real en una reacción triplex (estudios de Tetrabenazina) o en tres reacciones singleplex (estudios con Pridopidina y Haloperidol). Para la PCR triplex en tiempo real, se amplificaron 5 µl de ADNc en una mezcla de reacción de 20 µl que contenía 10 µl de tampón Quanta (Quanta BioSciences Inc., Gaithersburg, Maryland, EE.UU.), 3.5 µl de agua ultrapura, 0.15 µM de cada cebador y 0.1 µM de cada sonda (las secuencias de cebador y sonda usadas se detallan en la Tabla 3). Los productos de la PCR triplex en tiempo real se detectaron en un sistema CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EE.UU.) usando la siguiente configuración para todos los genes: 3 minutos de preincubación a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, e hibridación y alargamiento a 60°C durante 1 minuto. Para medidas de PCR en tiempo real singleplex, se amplificaron 0.7 µl de ADNc en una mezcla de reacción de 25 µl que contenía 1 × tampón de PCR, dNTP 0.2 mM, MgCl₂ 3.7 mM, verde SYBR 0.15 mM, 0.4 µM de cebador (Tabla 2) y 1 U de Taq polimerasa. Se usó un sistema de detección Icyler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EE.UU.), con la siguiente configuración para todos los genes: 60 segundos de preincubación a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, hibridación a 56°C durante 20 segundos, alargamiento a 72°C durante 30 segundos. Los productos de PCR de tamaño correcto se confirmaron por electroforesis en gel de agarosa (2%); los productos se purificaron con un kit de purificación de PCR de Qiagen (Valencia, California, EE.UU.). Todos los genes fueron secuenciados en MWG Biotech (Ebersberg, Alemania). La cantidad de ARNm de Arc se normalizó a la de los dos genes de referencia mediante una curva estándar construida para cada gen usando seis diluciones en serie de cuatro veces de productos de PCR purificados.

20 Cebadores:

Hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT) (Número de acceso AF001282)

Sentido: 5'-GGC CAG ACT TGT TGG ATT TG-3'

Antisentido: 5'-CCG CTG TCT TTT AGG CTT TG-3'

Ciclofilina A (número de acceso M19533)

25 Sentido: 5'-GTC TCT TTT CGC CGC TTG CT-3'

Antisentido: 5'-TCT GCT GTC TTT GGA ACT TTG TCT G-3'

Gen regulado por actividad (Arc) (Número de acceso U19866)

Sentido: 5'-GTC CCA GAT CCA GAA CCA CA-3'

Antisentido: 5'-CCT CCT CAG CGT CCA CAT AC-3'

30 Las cantidades iniciales de ADN se cuantifican mediante una curva estándar construida para cada gen usando 6 diluciones en serie de 4 veces de productos de PCR purificados.

Para los datos mostrados en la Fig. 10, se aplicaron los mismos métodos que para los datos de la Fig. 6, excepto que la PCR se realizó en un termociclador MyIQ (Biorad).

Discusión de ejemplos:

35 Se demostró que la Pridopidina revirtió la inhibición conductual inducida por la Tetrabenazina. Este efecto no fue compartido por el Haloperidol, que disminuyó la actividad locomotora en los animales tratados con Tetrabenazina. Los experimentos de interacción mostraron además que tanto la Pridopidina como el Haloperidol conservaron sus efectos neuroquímicos característicos, es decir, incrementos de DOPAC estriatal, cuando se administraron conjuntamente con Tetrabenazina. Similarmente, los incrementos que acompañan a los niveles de ARNm de Arc estriatal inducidos por Pridopidina y Haloperidol se mantuvieron en los experimentos de interacción con Tetrabenazina.

Además de la depresión locomotora y el incremento de los niveles de DOPAC estriatal, la Tetrabenazina produjo una disminución dependiente de la dosis de los niveles de dopamina estriatal, que no se vio afectada por la administración conjunta de Pridopidina o Haloperidol. Además, la Tetrabenazina produjo un incremento dependiente de la dosis en los niveles de ARNm de Arc de la corteza frontal. Este efecto fue contrarrestado de una manera dependiente de la dosis por Pridopidina, pero no por Haloperidol.

La Pridopidina contrarrestó la depresión conductual inducida por la Tetrabenazina. De acuerdo con datos anteriores, tanto la Tetrabenazina como el Haloperidol eran claramente inhibitorios de la actividad locomotora espontánea (Satou 2001, Schaefer 1984), mientras que la Pridopidina no mostró tales efectos. Esta falta de efectos inhibitorios sobre la actividad locomotora espontánea en ratas es parte del perfil farmacológico característico de Pridopidina (Ponten 2010).

El efecto farmacológico de la Pridopidina en los receptores de dopamina D2 también estaba presente cuando se coadministró con Tetrabenazina. El análisis neuroquímico demostró que los tres compuestos ensayados produjeron un incremento dependiente de la dosis en DOPAC estriatal, llegando a alrededor del 250-300% de los niveles de control en las dosis máximas aplicadas, en línea con los resultados anteriores. Un incremento de DOPAC estriatal es una característica común de los antagonistas de la dopamina D2, así como de los compuestos en general que producen un tono reducido en los receptores centrales de dopamina D2, incluidos los agonistas parciales con baja actividad intrínseca y fármacos que agotan la monoamina (Jordan, 2004; Roffler-Tarlov 1971). El incremento observado en DOPAC estriatal representa así un efecto farmacológico central de cada uno de los compuestos ensayados. En los experimentos de interacción, tanto el Haloperidol como la Pridopidina produjeron un incremento adicional de DOPAC estriatal, cuando se administraron conjuntamente con Tetrabenazina. Esto sugiere fuertemente que el efecto primario de Pridopidina y Haloperidol todavía estaba presente en ratas parcialmente empobrecidas en monoamina. Además, a pesar de que la Pridopidina revirtió el efecto supresor locomotor de la Tetrabenazina cuando se administraron conjuntamente, la disminución de los niveles de dopamina en los tejidos inducida como un efecto característico de la Tetrabenazina no se vio afectada por la Pridopidina, lo que sugiere que no abolió los efectos farmacológicos de la Tetrabenazina como tal.

En general, los efectos neuroquímicos típicos de los tres compuestos en DOPAC, pero también los niveles de dopamina estuvieron presentes a lo largo de los estudios, lo que indica que los efectos centrales de cada compuesto en la transmisión dopaminérgica se mantuvieron.

El incremento del ARNm de Arc en la corteza por el cotratamiento con Pridopidina puede ayudar a explicar la reversión de la depresión locomotora inducida por Tetrabenazina. Como biomarcador adicional de relevancia, especialmente para la diferenciación de Pridopidina y Haloperidol, se midió ARNm de Arc en la corteza frontal y el cuerpo estriado. Arc es un gen temprano asociado con la activación sináptica y la señalización del receptor NMDA, y se ha informado previamente que se incrementa en el cuerpo estriado en respuesta a varios antagonistas de dopamina D2, así como a estabilizadores dopaminérgicos. Sin embargo, no hay informes previos sobre los efectos de la Tetrabenazina en la expresión del gen Arc. Como se demuestra en los ejemplos, la Tetrabenazina indujo un incremento significativo en Arc estriatal. Aunque algo menor en magnitud que los efectos de Pridopidina y Haloperidol, este efecto puede estar relacionado con la reducción de la transmisión de dopamina estriatal también en animales tratados con Tetrabenazina. Como fue el caso para DOPAC, tanto la Tetrabenazina como la Pridopidina produjeron efectos similares sobre el Arc estriatal en ratas no tratadas como en ratas tratadas con Tetrabenazina.

En la corteza frontal, la Tetrabenazina redujo la dosis de expresión del gen Arc de forma dependiente, con efectos significativos a y por encima de la dosis usada para los experimentos de interacción. Los estudios de respuesta a la dosis de Pridopidina y Haloperidol demostraron un incremento dependiente de la dosis en la expresión del gen Arc de la corteza frontal por Pridopidina, pero sin efectos del Haloperidol. La capacidad de la Pridopidina para incrementar la expresión del gen Arc de la corteza frontal también era evidente en las ratas tratadas con Tetrabenazina. De este modo, este efecto farmacológico, que distingue la Pridopidina del Haloperidol y otros antagonistas clásicos de la dopamina D2, se mantuvo con el agotamiento parcial de monoamina. Es concebible que represente algún grado de activación sináptica cortical que podría contribuir a la capacidad de la Pridopidina para contrarrestar la inhibición conductual en ratas tratadas con Tetrabenazina. Como apoyo de esta interpretación, se ha mostrado que la Pridopidina incrementa la activación de células piramidales espontáneamente activas en la corteza frontal.

Aunque los ejemplos indican claramente que los efectos de la Pridopidina se retienen cuando la Pridopidina se administra conjuntamente con la Tetrabenazina, la combinación de Pridopidina y Tetrabenazina no dio lugar a ningún signo de efectos adversos. En contraste, la combinación de Haloperidol y Tetrabenazina produjo una depresión conductual pronunciada, lo que sugeriría un riesgo de efectos secundarios motores antidopaminérgicos excesivos con tal combinación en seres humanos, en línea con las recomendaciones actuales sobre precaución con respecto al tratamiento conjunto de pacientes con enfermedad de Huntington con Tetrabenazina y fármacos neurolépticos.

Resumen de los niveles de dopamina en el cuerpo estriado

Los efectos de los diferentes tratamientos sobre los niveles de dopamina en el tejido estriatal se dan en la Tabla 1. La Tetrabenazina indujo una reducción dependiente de la dosis de la dopamina estriatal. A la dosis usada en los experimentos de interacción, 0.64 mg/kg, la Tetrabenazina redujo significativamente la dopamina estriatal, llegando aproximadamente al 50% de la media del grupo de control de vehículo, en todos los estudios realizados. La Pridopidina y el Haloperidol produjeron disminuciones menores en la dopamina estriatal, a las más altas dosis ensayadas. En los experimentos de interacción, el efecto de la Tetrabenazina sobre la dopamina estriatal no se vio afectado esencialmente por el cotratamiento con Pridopidina o Haloperidol.

En resumen, la Pridopidina revirtió la inhibición conductual inducida por el compuesto que agota la monoamina Tetrabenazina, reteniendo los efectos neuroquímicos centrales de la Pridopidina relacionados con el antagonismo del receptor de dopamina D2. De este modo, los efectos depresores locomotores de la Tetrabenazina son aliviados por la Pridopidina, a pesar de que el tono en el receptor D2 de dopamina estriatal se reduce aún más cuando se administra Pridopidina además de Tetrabenazina. La Pridopidina también revirtió la disminución en la expresión del

gen Arc de la corteza frontal inducida por la Tetrabenazina. Tentativamente, esto refleja una activación de la actividad neuronal cortical que podría contribuir a los efectos estimulantes locomotores de la Pridopidina en ratas hipoactivas con deficiencia parcial de monamina.

Tabla 2. Resumen de los estudios de dosis-respuesta e interacción

| Estudio | Animales por grupo | | | | | Medida(s) | | | |
|---------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|----------------------------|---|--|-----------------------|--|
| | Pridopidina | Tetrabenazina | Haloperidol | Grupo 1 | Grupo 2 | | Grupo 3 | Grupo 4 | Grupo 5 |
| 1 | Estudio dosis-respuesta | | | 5 ^a Vehículo ^d | Pridopidina 11 µmol/kg | Pridopidina 33 µmol/kg | Pridopidina 100 µmol/kg | - | Actividad locomotora; DOPAC; ARNm de Arc |
| 2 | | Estudio dosis-respuesta | | 5 ^b Vehículo ^e | Tetrabenazina 0.37 µmol/kg | Tetrabenazina 0.64 µmol/kg | Tetrabenazina 1.1 µmol/kg | - | Actividad locomotora; DOPAC; ARNm de Arc |
| 3 | | | Estudio dosis-respuesta | 4 ^c Vehículo ^e | Haloperidol 0.04 mg/kg | Haloperidol 0.12 mg/kg | Haloperidol 0.37 mg/kg | Haloperidol 1.1 mg/kg | Actividad locomotora; DOPAC |
| 4 | | | Estudio dosis-respuesta | 5 ^c Vehículo ^e | Haloperidol 0.12 mg/kg | Haloperidol 0.37 mg/kg | Haloperidol 1.1 mg/kg | - | ARNm de Arc |
| 5 | Estudio de interacción del fármaco | | | 5 ^b Vehículo ^f | Tetrabenazina 0.64 µmol/kg | Tetrabenazina 0.64 µmol/kg + Pridopidina 33 µmol/kg | Tetrabenazina 0.64 µmol/kg + Pridopidina 100 µmol/kg | - | Actividad locomotora; DOPAC; ARNm de Arc |
| 6 | Estudio de interacción del fármaco | | | 10 ^b Vehículo ^f | Tetrabenazina 0.64 µmol/kg | Tetrabenazina 0.64 µmol/kg + Pridopidina 33 µmol/kg | Tetrabenazina 0.64 µmol/kg + Pridopidina 100 µmol/kg | - | Actividad locomotora |
| 7 | | Estudio de interacción del fármaco | | 5 ^b Vehículo ^f | Tetrabenazina 0.64 µmol/kg | Tetrabenazina 0.64 µmol/kg + haloperidol 0.04 mg/kg | Tetrabenazina 0.64 µmol/kg + haloperidol 0.12 mg/kg | - | Actividad locomotora; DOPAC; ARNm de Arc |

^a Animales de Scanbur; ^b animales de Taconic; ^c animales de Charles River; ^d NaCl 0.9% (peso/v); ^e glucosa 5.5% (peso/v); ^f mezcla 1:1 de NaCl 0.9% (peso/v) y glucosa 5.5% (peso/v) ajustada a pH 4.5 con ácido acético glacial

Tabla 3. Secuencias de cebador y sonda para medir la expresión de Arc y dos genes de referencia

| | <u>Gen regulado por actividad (Ar)</u> | <u>Hipoxantinafosforribo siltransferasa (HPRT)</u> | <u>Ciclofilina A</u> |
|----------------------------|--|--|--------------------------|
| Número de acceso a GenBank | U19866 | AF001282 | M19533 |
| Cebadores (5'–3') | | | |
| Sentido | GGAGTTCAAG AAGGAGTTTC | AGGGATTTGA ATCATGTTTG | CTGGACCAA ACACAAATG |
| Antisentido | CCACATACAG TGTCTGGTA | CTGCTAGTTC TTTACTGGC | ATGCCTTCTT TCACCTTC |
| Sonda | CCGCTTACGCC AGAGGAACT | TGTAGATTCAACTT GCCGCTGTC | TTGCCATCCAGC CACTCAGT |
| Colorante | 5'-FAM | 5'-HEX | 5'-Texas red |
| Apagador | 3'-BHQ1 | 3'-BHQ1 | 3'-BHQ2 |
| Tamaño del producto (pb) | 149 | 121 | 100 |

Referencias

Andersen H L, Kilpatrick I C. Prevention by (+/-)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin of both catalepsy and the rises in rat striatal dopamine metabolism caused by haloperidol. *Br J Pharmacol* 1996; 118(2):421-7.

5 Brod et al. (2000) *Annals of Neurology*, 47:127-131.

Burgunder J M, Guttman M, Perlman S, Goodman N, van Kammen D P, Goodman L. An International Survey-based Algorithm for the Pharmacologic Treatment of Chorea in Huntington's Disease. *PLoS Curr* 2011; 3:RRN1260.

Chomczynski, P. & Sacchi, N. *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987 Dyhring T, Nielsen E O, Sonesson C, Pettersson F, Karlsson J, Svensson P, et al. The dopaminergic stabilizers Pridopidine (ACR16) and (-)-OSU6162 display dopamine D(2) receptor antagonism and fast receptor dissociation properties. *Eur J Pharmacol* 2010; 628(1-3):19-26.

10 Gronier B, Waters N, Ponten H, Klamer D, Waters S, Tedroff J. Pridopidine increases glutamatergic neuron firing in the frontal cortex. In: *International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders 2012*; 2012; Dublin, Ireland; 2012.

Guidance for Industry. *In vivo drug metabolism/drug interaction studies—study design, data analysis, and recommendations for dosing and labeling*, U.S. Dept. Health and Human Svcs., FDA, Ctr. for Drug Eval. and Res., Ctr. For Biologics Eval. and Res., Clin./Pharm., November 1999 <<http://www.fda.gov/cber/gdlns/metabol.pdf>>.

15 Jordan S, Koprivica V, Dunn R, Tottori K, Kikuchi T, Altar C A. In vivo effects of aripiprazole on cortical and striatal dopaminergic and serotonergic function. *Eur J Pharmacol* 2004; 483(1):45-53.

Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, et al. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(1):316-21.

Kleinschmidt-DeMasters et al. (2005) *New England Journal of Medicine*, 353:369-379.

Langer-Gould et al. (2005) *New England Journal of Medicine*, 353:369-379.

25 Natesan S, Svensson K A, Reckless G E, Nobrega J N, Barlow K B, Johansson A M, et al. The dopamine stabilizers (S)-(-)-(3-methanesulfonyl-phenyl)-1-propyl-piperidine [(-)-OSU6162] and 4-(3-methanesulfonylphenyl)-1-propyl-piperidine (ACR16) show high in vivo D2 receptor occupancy, antipsychotic-like efficacy, and low potential for motor side effects in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318(2):810-8.

- Nilsson M, Carlsson A, Markinhuhta K R, Sonesson C, Pettersson F, Gullme M, et al. The dopaminergic stabiliser ACR16 counteracts the behavioural primitivization induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 in mice: implications for cognition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28(4):677-85.
- Paleacu D. Tetrabenazine in the treatment of Huntington's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2007; 3(5):545-51.
- 5 Pettersson F, Ponten H, Waters N, Waters S, Sonesson C. Synthesis and evaluation of a set of 4-phenylpiperidines and 4-phenylpiperazines as D2 receptor ligands and the discovery of the dopaminergic stabilizer 4-[3-(methylsulfonyl)phenyl]-1-propylpiperidine (huntingexil, Pridopidine, ACR16). *J Med Chem* 2010; 53(6):2510-20.
- Ponten H, Sonniksen K, Abrahamsson T, Waters N, Gustafsson B, Hanse E, et al. Behavioral and neurochemical repercussions of hippocampal network activity blockade during the neonatal period. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 10 155(1):81-6.
- Ponten H, Kullingsjo J, Lagerkvist S, Martin P, Pettersson F, Sonesson C, et al. In vivo pharmacology of the dopaminergic stabilizer Pridopidine. *Eur J Pharmacol* 2010; 644(1-3):88-95.
- Reches A, Burke R E, Kuhn C M, Hassan M N, Jackson V R, Fahn S. Tetrabenazine, an amine-depleting drug, also blocks dopamine receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 225(3):515-21.
- 15 Roffler-Tarlov S, Sharman D F, Tegerdine P. 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid in the mouse striatum: a reflection of intra- and extra-neuronal metabolism of dopamine? *Br J Pharmacol* 1971; 42(3):343-51.
- Satou T, Anderson A J, Itoh T, Tamai Y, Hayashi Y, Hashimoto S. Repetitive administration of Tetrabenazine induces irreversible changes in locomotion and morphology of the substantia nigra in ras. *Exp Toxicol Pathol* 2001; 53(4):303- 20 8.
- Schaefer G J, Michael R P. Drug interactions on spontaneous locomotor activity in rats. Neuroleptics and amphetamine-induced hyperactivity. *Neuropharmacology* 1984; 23(8):909-14.
- Steward O, Worley P F. Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* 2001; 30(1):227-40.
- 25 Vollmer et al. (2008) "Glatiramer acetate after induction therapy with mitoxantrone in relapsing multiple sclerosis" *Multiple Sclerosis*, 00:1-8.
- FDA Label for XENAZINE (Tetrabenazine) 07/06/2011

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso como una terapia complementaria o en combinación con una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para tratar un sujeto afectado por la enfermedad de Huntington, el síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.
2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, para uso en el tratamiento de un sujeto afectado por la enfermedad de Huntington, el síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.
4. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 3, en la que la composición farmacéutica se va a administrar a un sujeto periódicamente tal que se administran 5-100 mg de Tetrabenazina al sujeto por día.
- 15 5. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-4, en la que la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma cuando se toman conjuntamente son más efectivas para tratar al sujeto que cuando cada agente se administra solo con la misma cantidad.
- 20 6. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-5, en la que la cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma cuando se toma sola, o la cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma cuando se toma sola, o cada una de tales cantidades cuando se toman solas no es efectiva para tratar al sujeto.
- 25 7. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso para reducir o prevenir uno o más efectos secundarios de la administración periódica de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable en un sujeto, en la que el uno o más efectos secundarios se seleccionan de depresión, tendencias suicidas, acatisia, inquietud, agitación, parkinsonismo, sedación, somnolencia, y disfagia.
8. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 7, en la que el sujeto está afectado por un trastorno del movimiento, preferentemente enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.
- 30 9. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-6 y 8, en la que la composición farmacéutica es efectiva para aliviar un síntoma del trastorno del movimiento, enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.
10. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 9, en la que el síntoma es corea.
- 35 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en combinación con una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable para tratar un sujeto afectado por obesidad, un trastorno asociado con obesidad, o un efecto secundario cardiovascular de Pridopidina.
12. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, y 3-11, en la que la composición farmacéutica se va a administrar periódicamente tal que se administra al sujeto al día de 1.5 a 20 μmol de Pridopidina/kg de peso corporal del sujeto.
- 40 13. Una composición farmacéutica que comprende Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en administración simultánea, separada o secuencial con Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en el tratamiento de un sujeto afectado por la enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.
- 45 14. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 13, en la que la composición farmacéutica se va a administrar a un sujeto periódicamente tal que se administra 5-100 mg de Tetrabenazina al sujeto por día.
- 50 15. Un producto que contiene una cantidad de Tetrabenazina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y una cantidad de Pridopidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso simultáneo, separado o secuencial para tratar un sujeto afectado por la enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, o disquinesia tardía.

Fig. 1

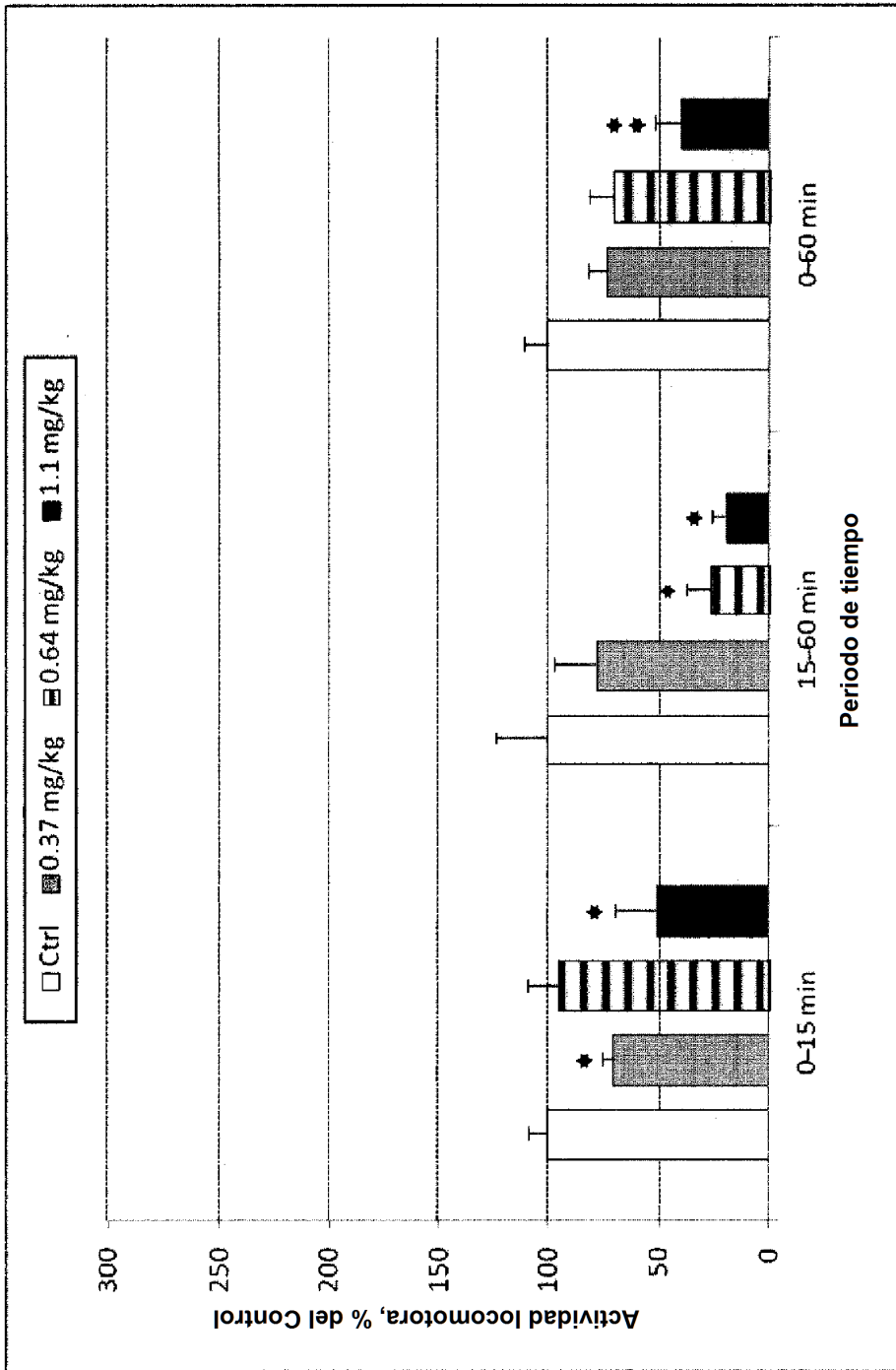


Fig. 2

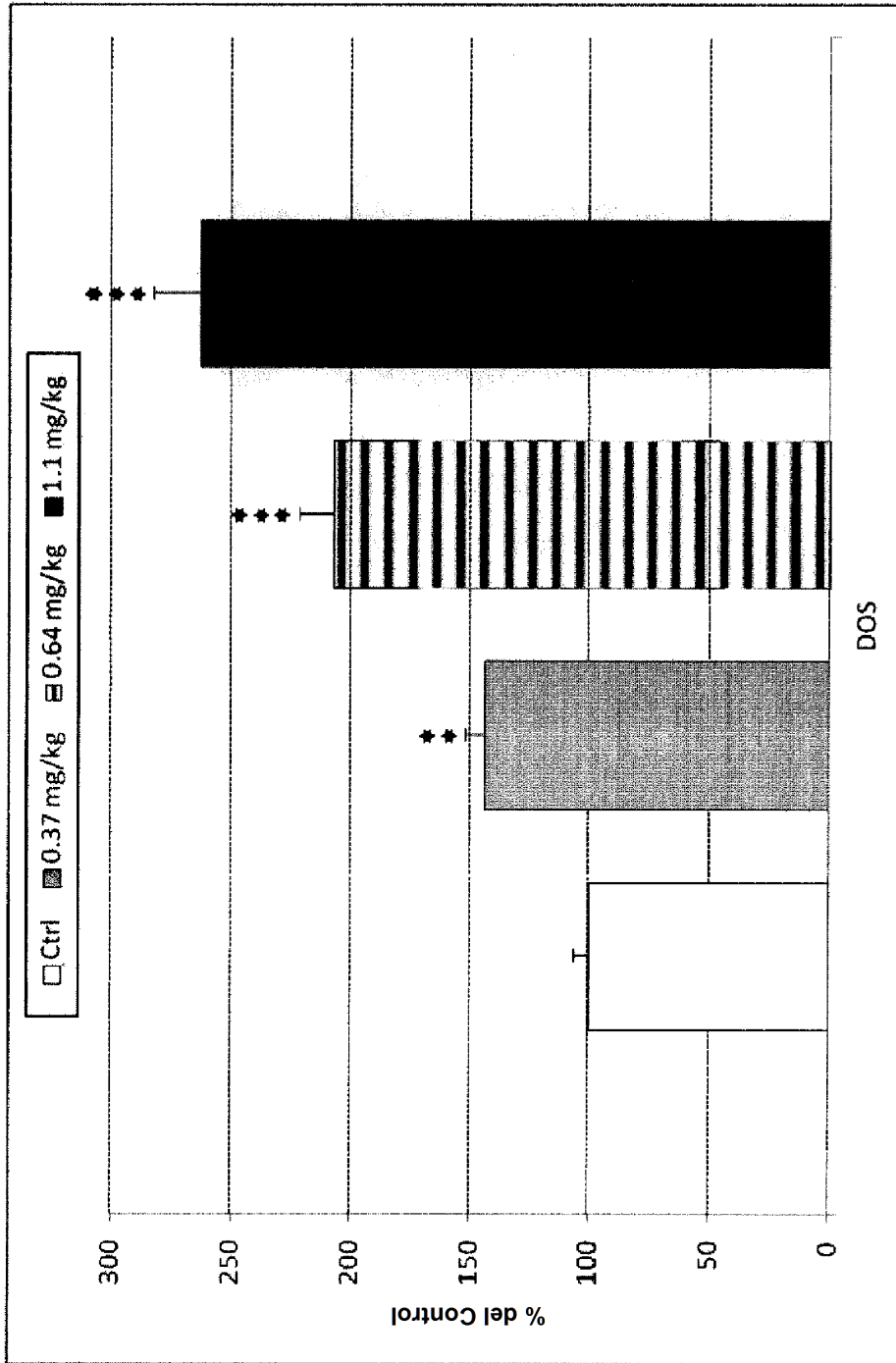


Fig. 3

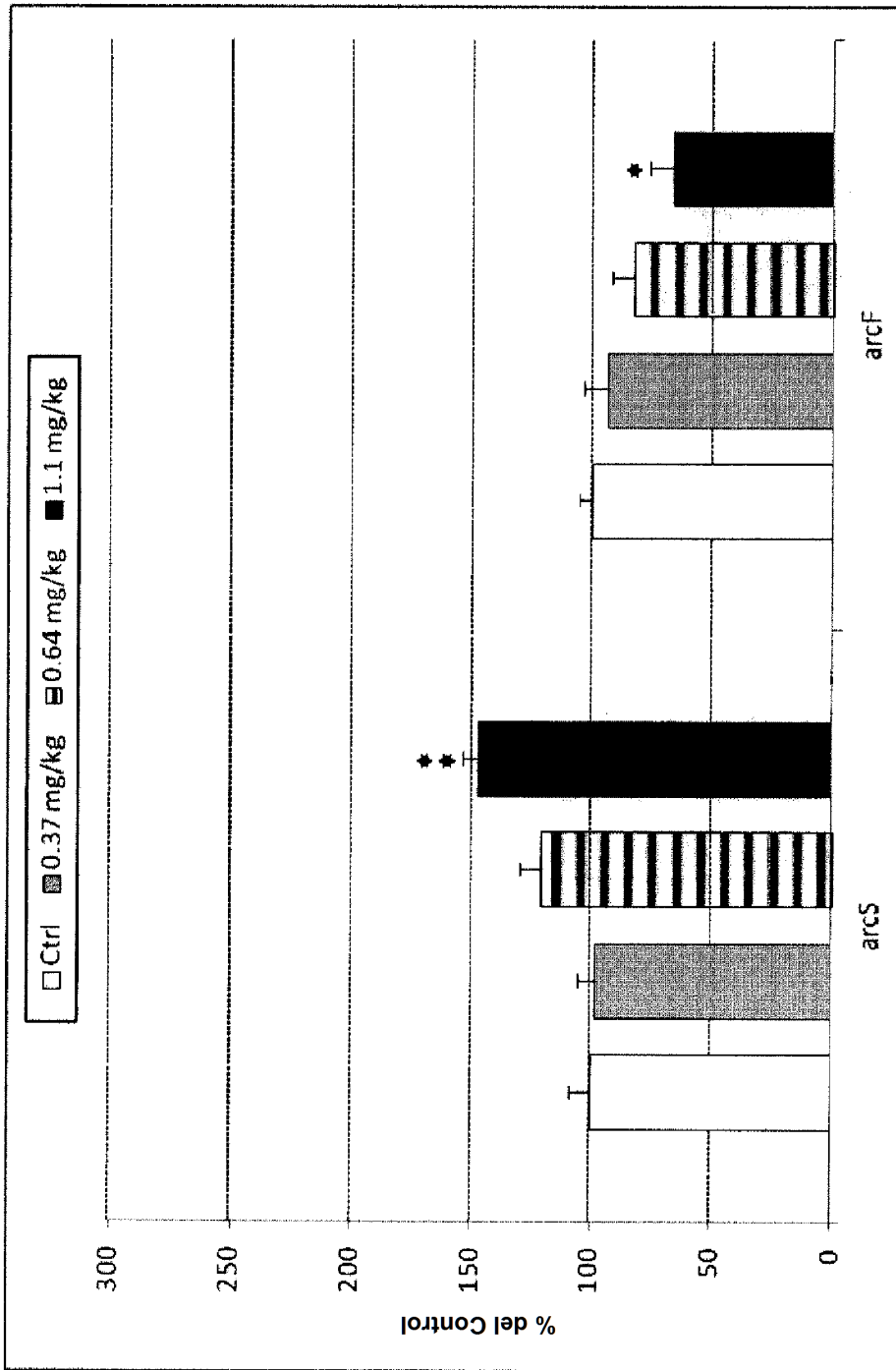


Fig. 4

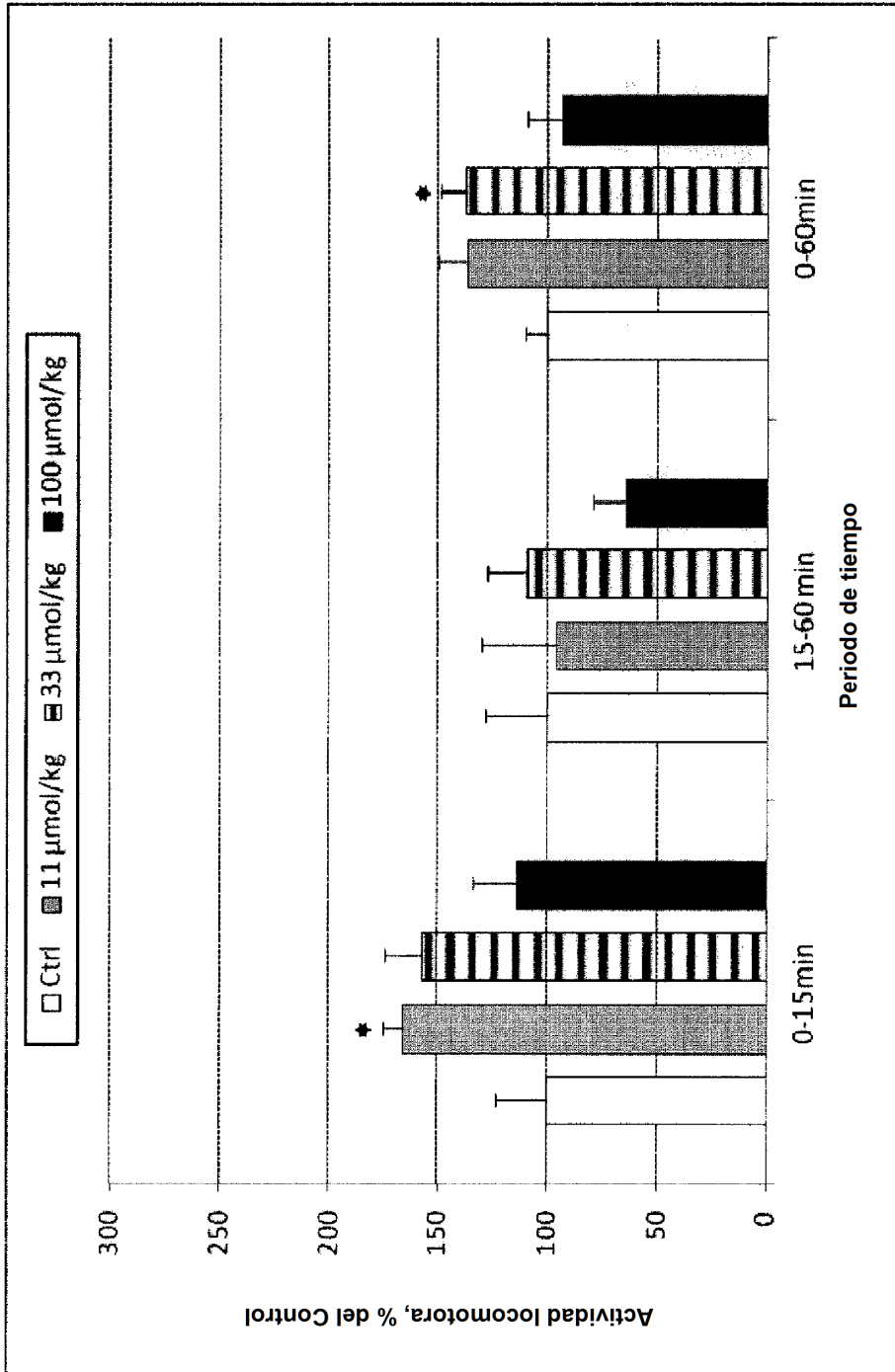


Fig. 5

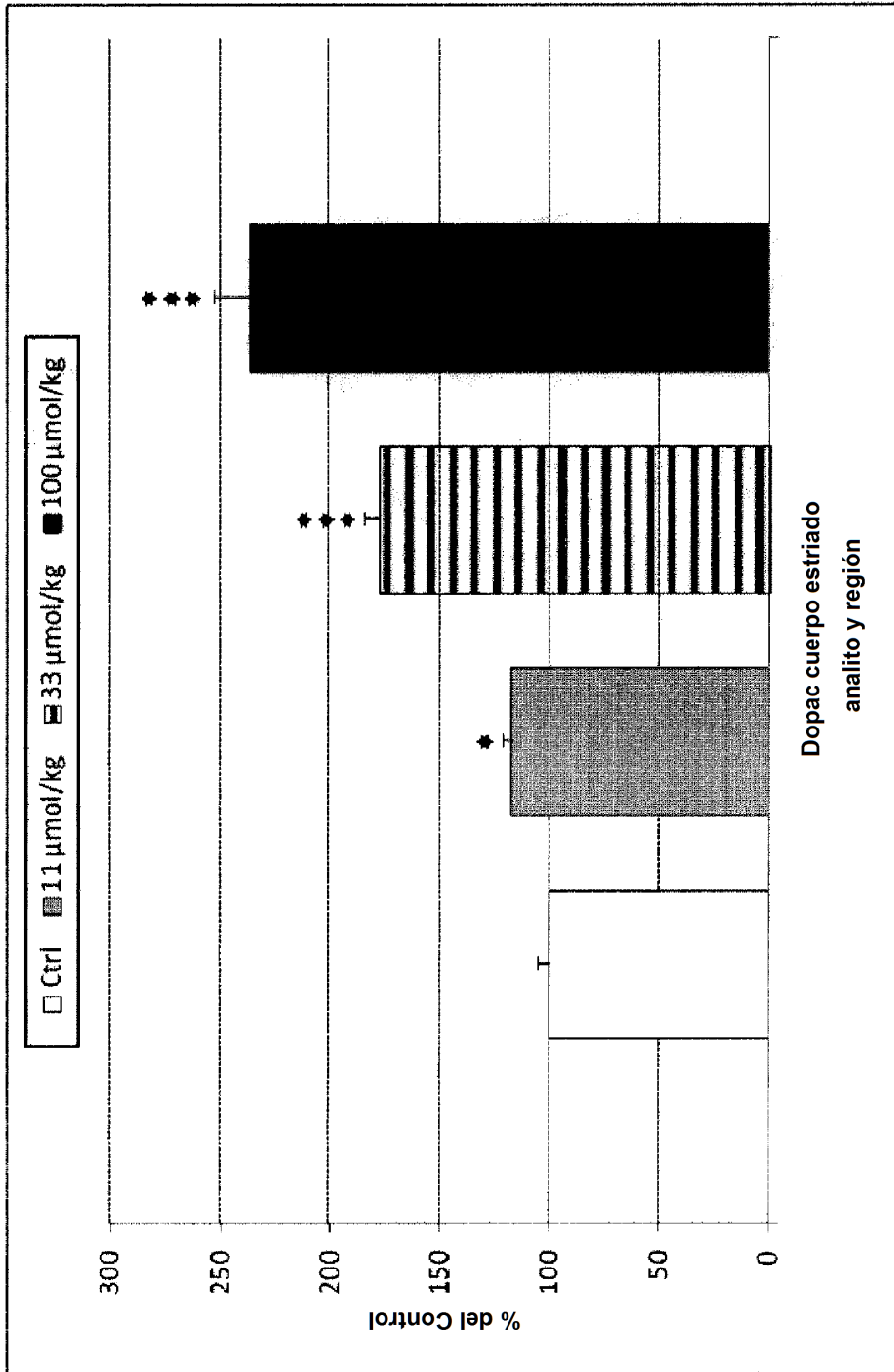


Fig. 6

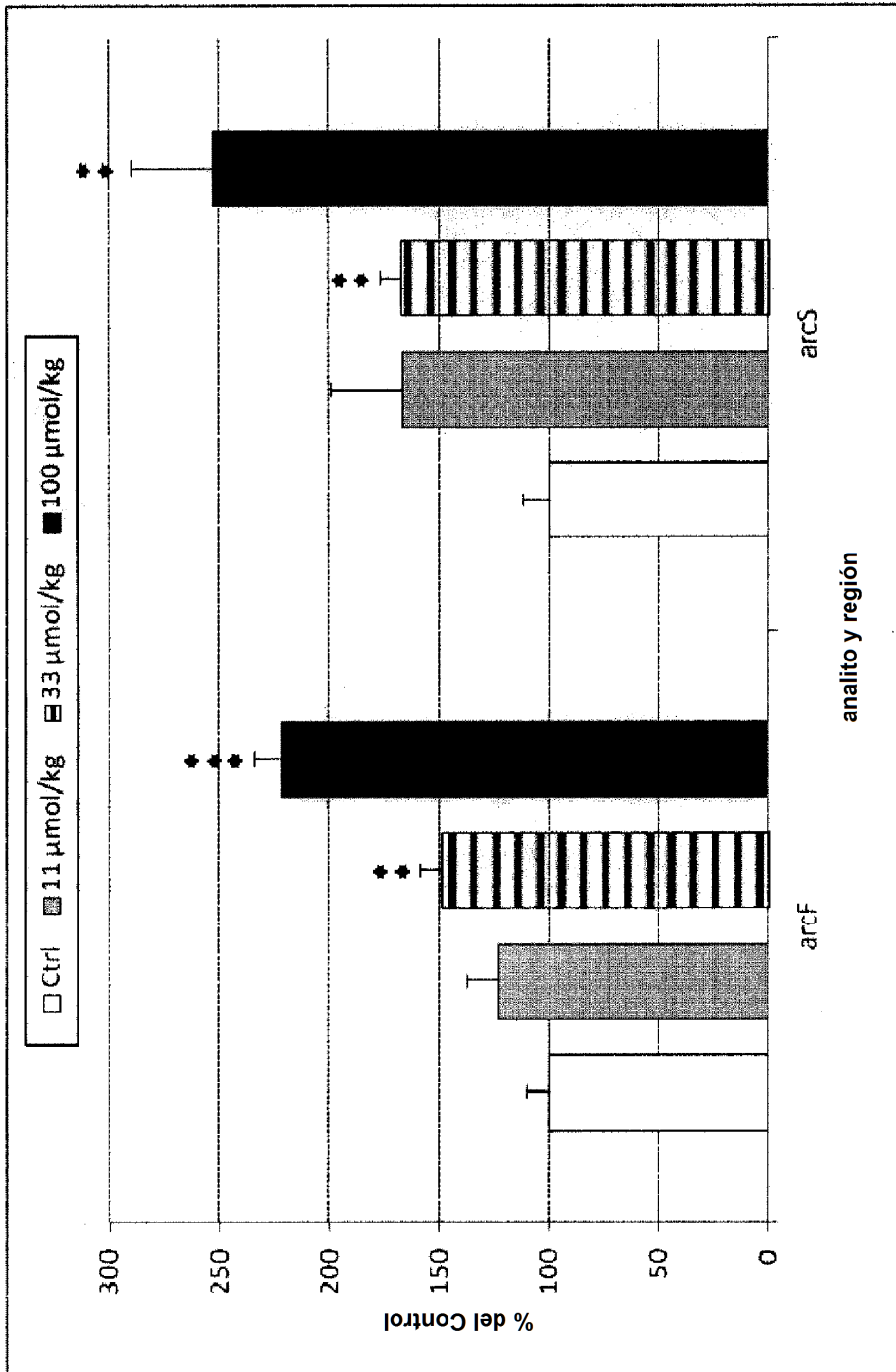


Fig. 7

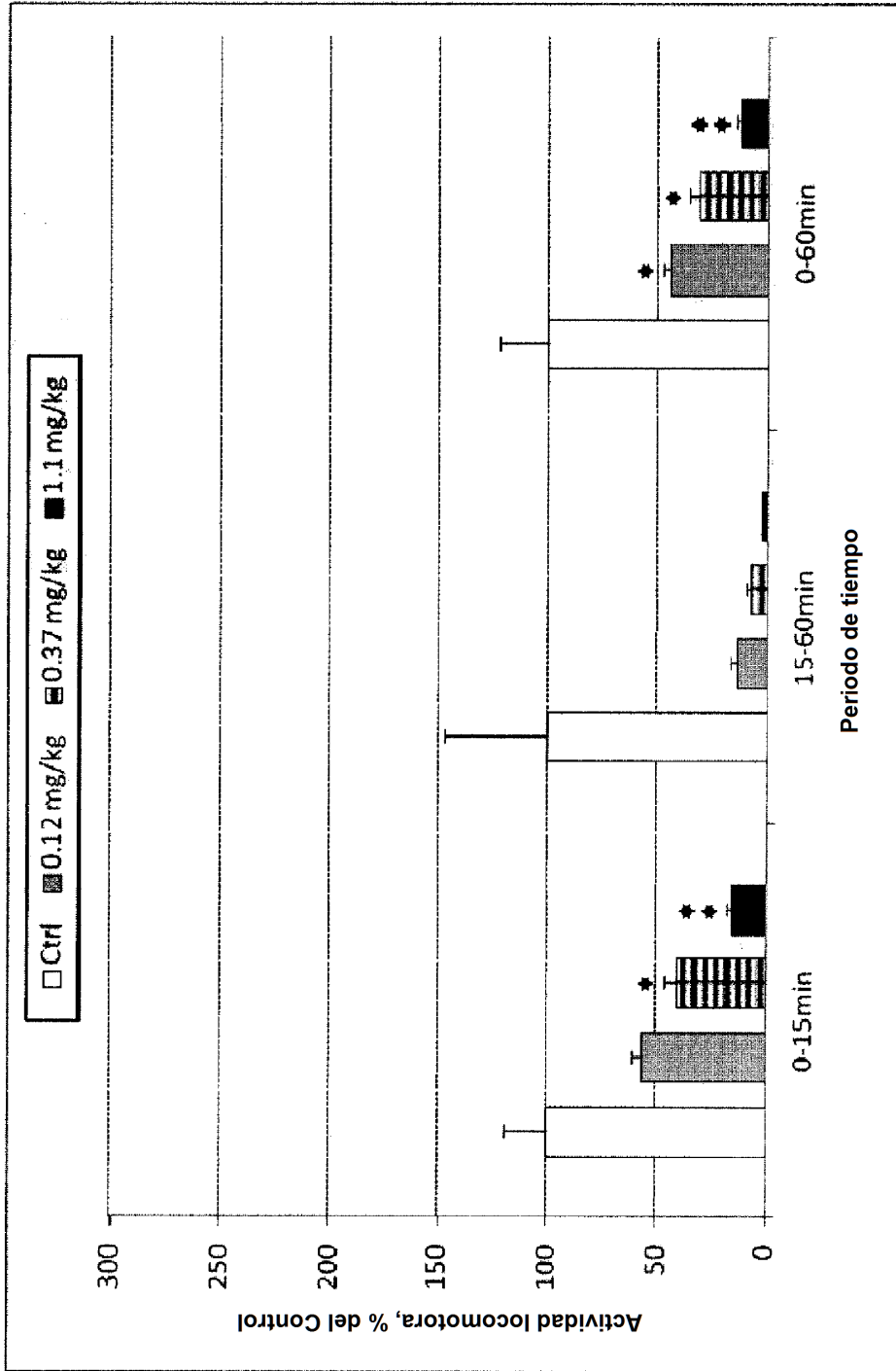


Fig. 8

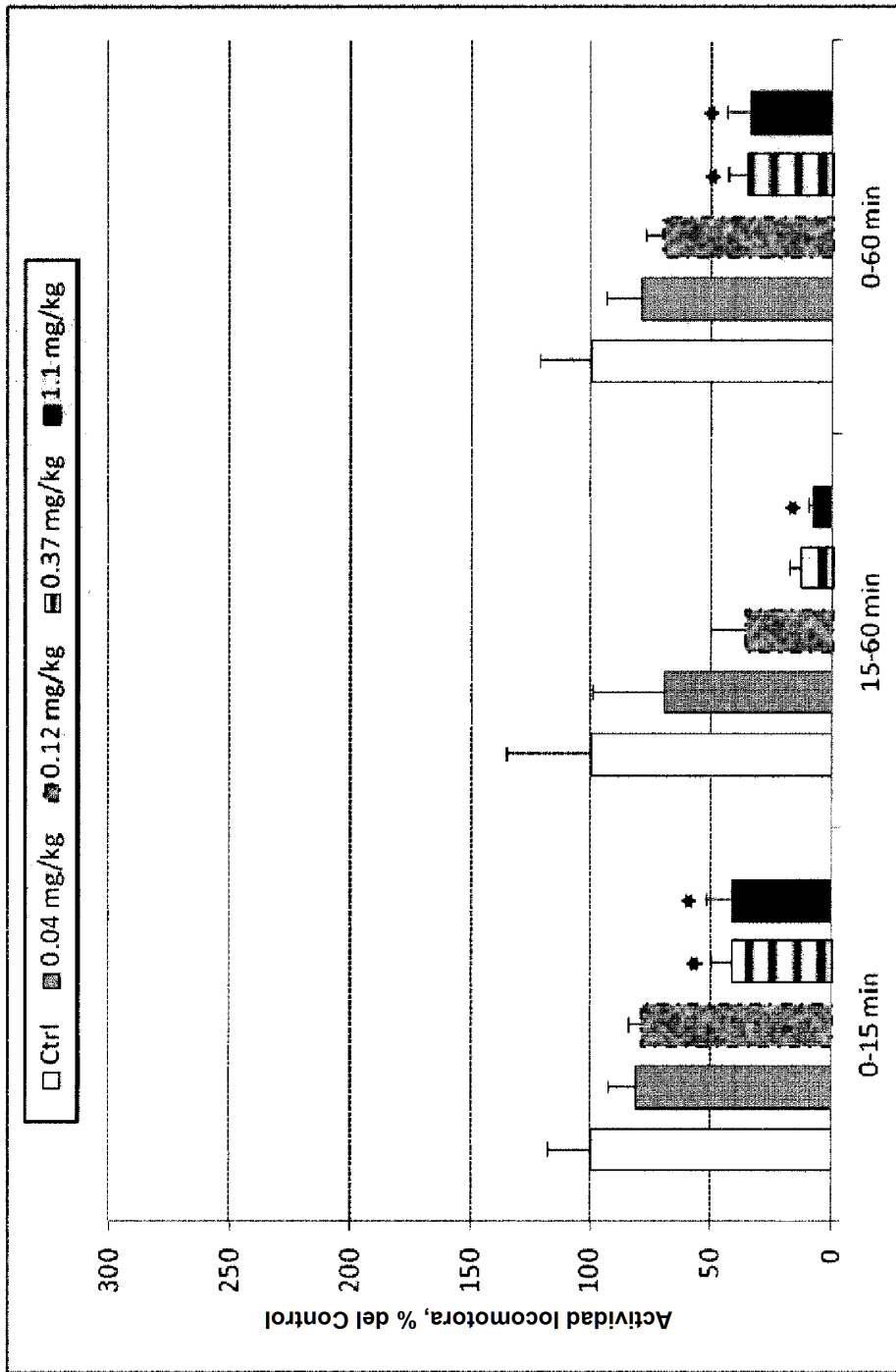


Fig. 9

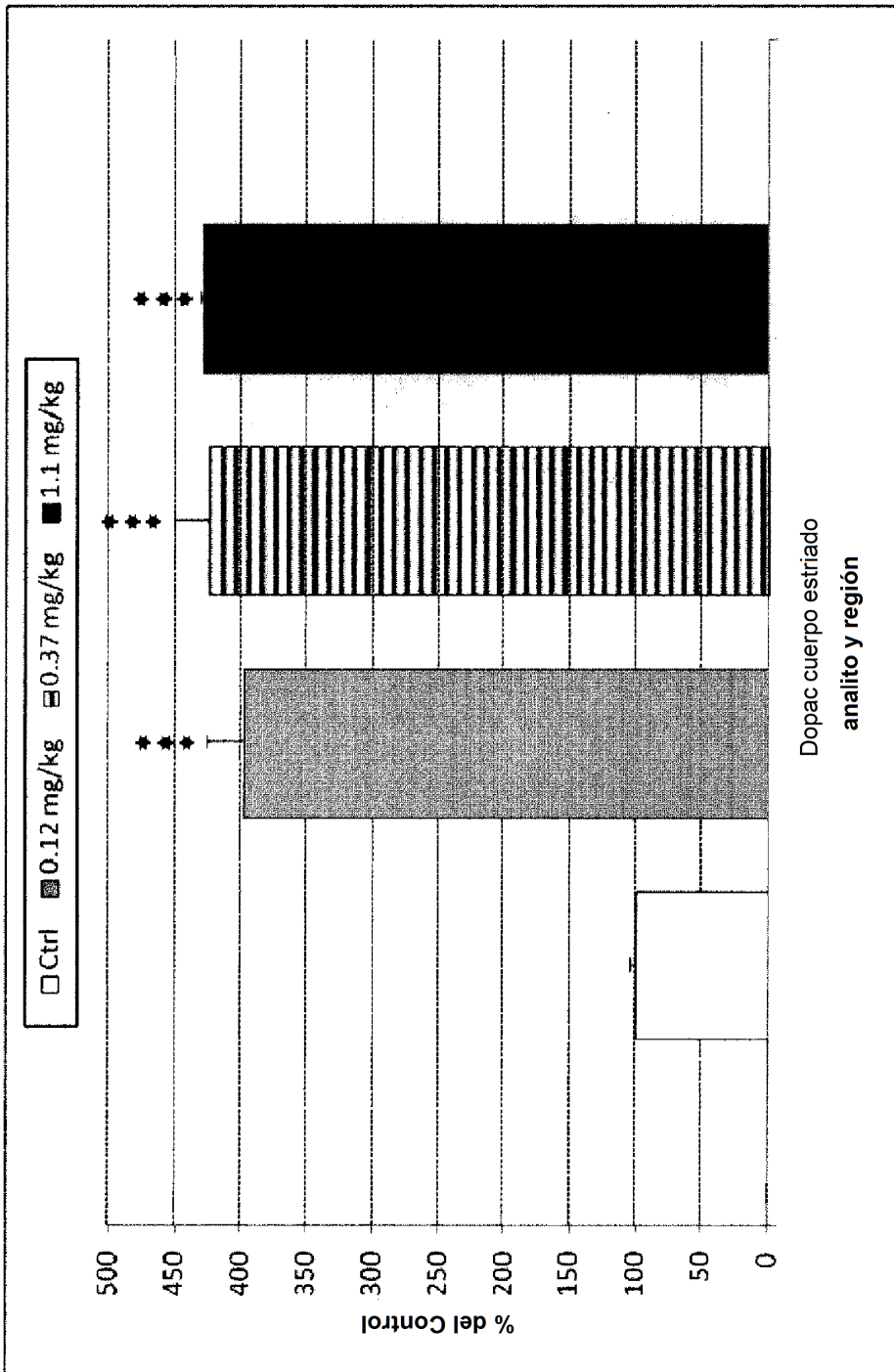


Fig. 10

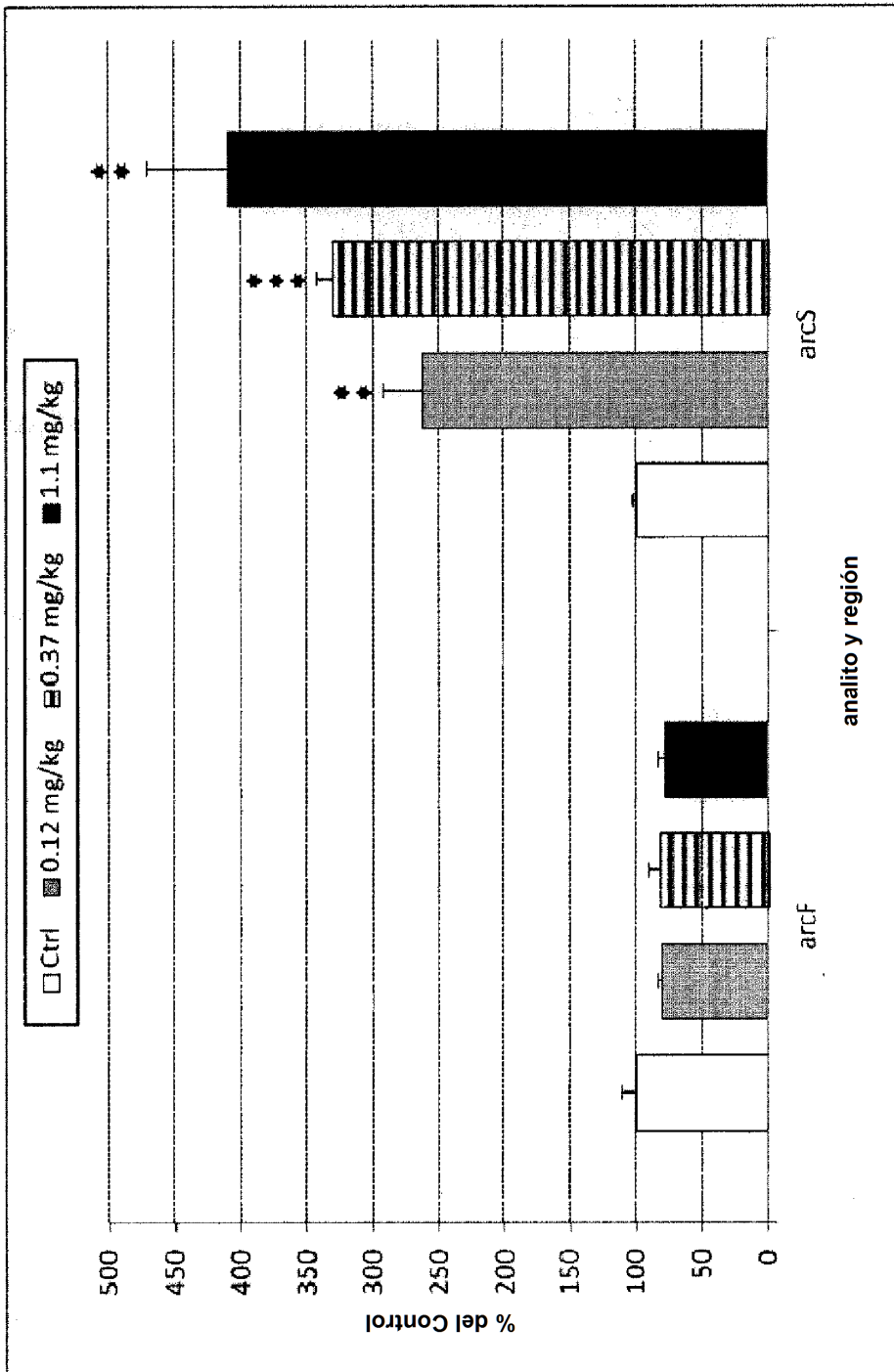


Fig. 11

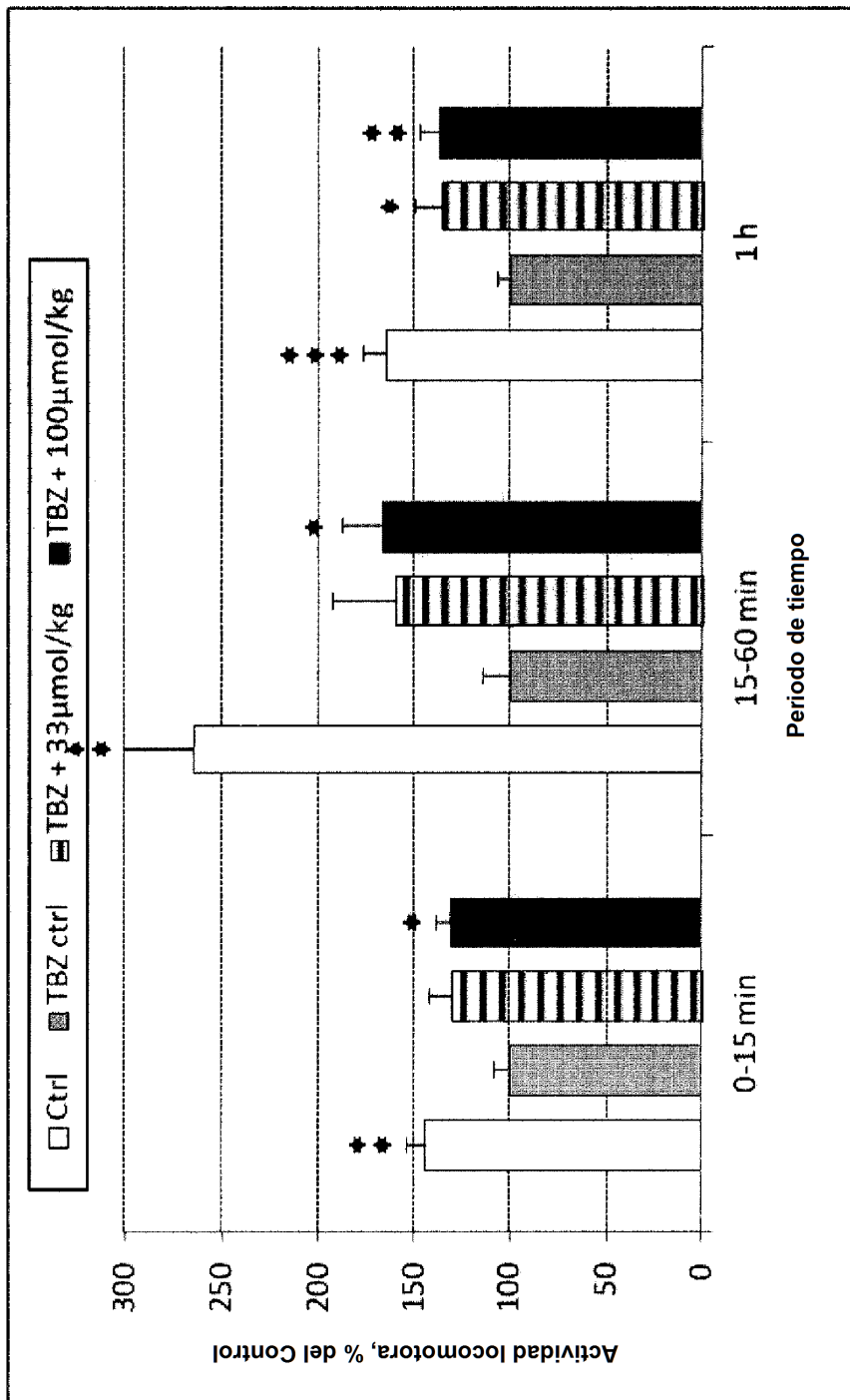


Fig. 12

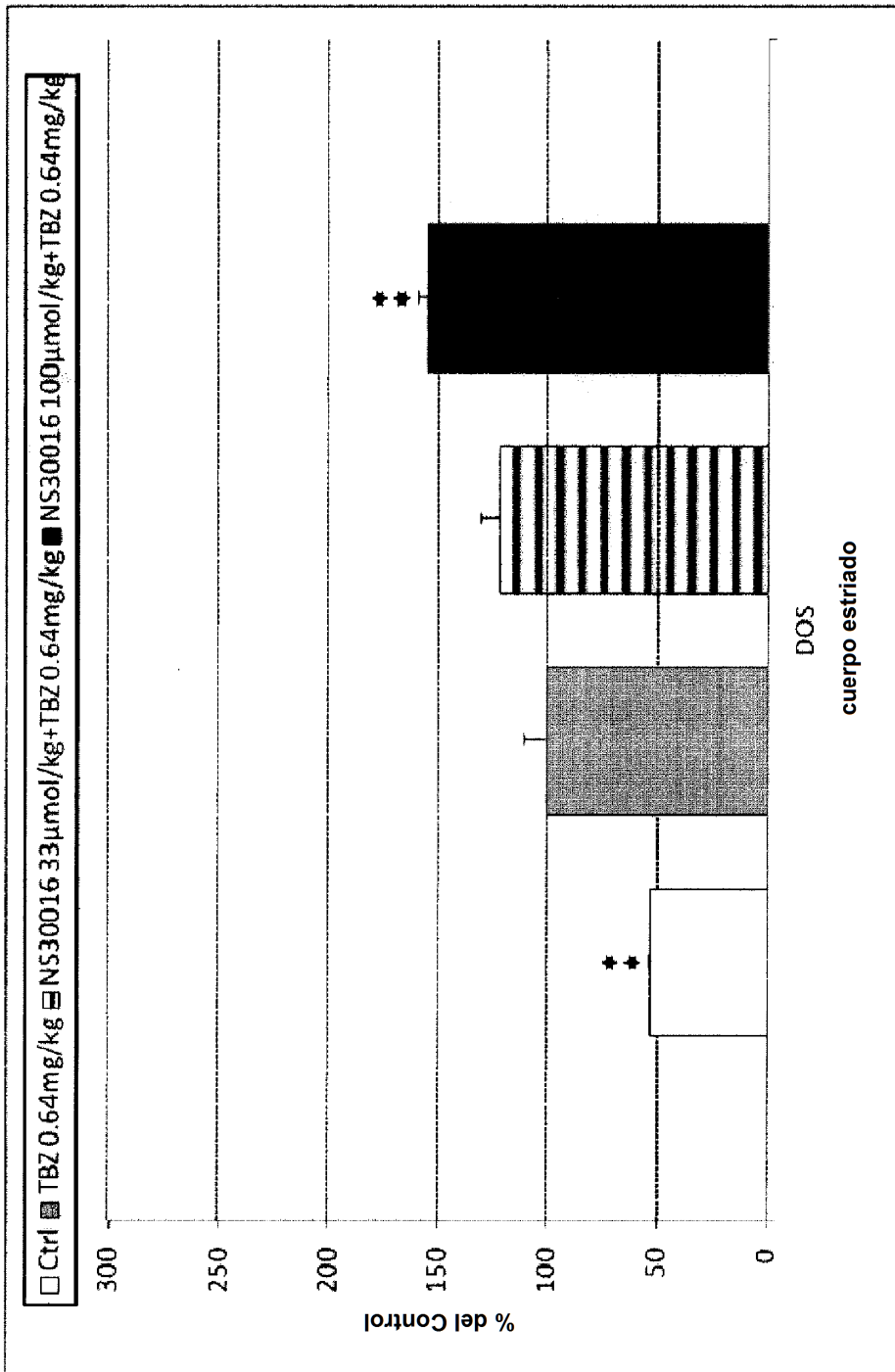


Fig. 13

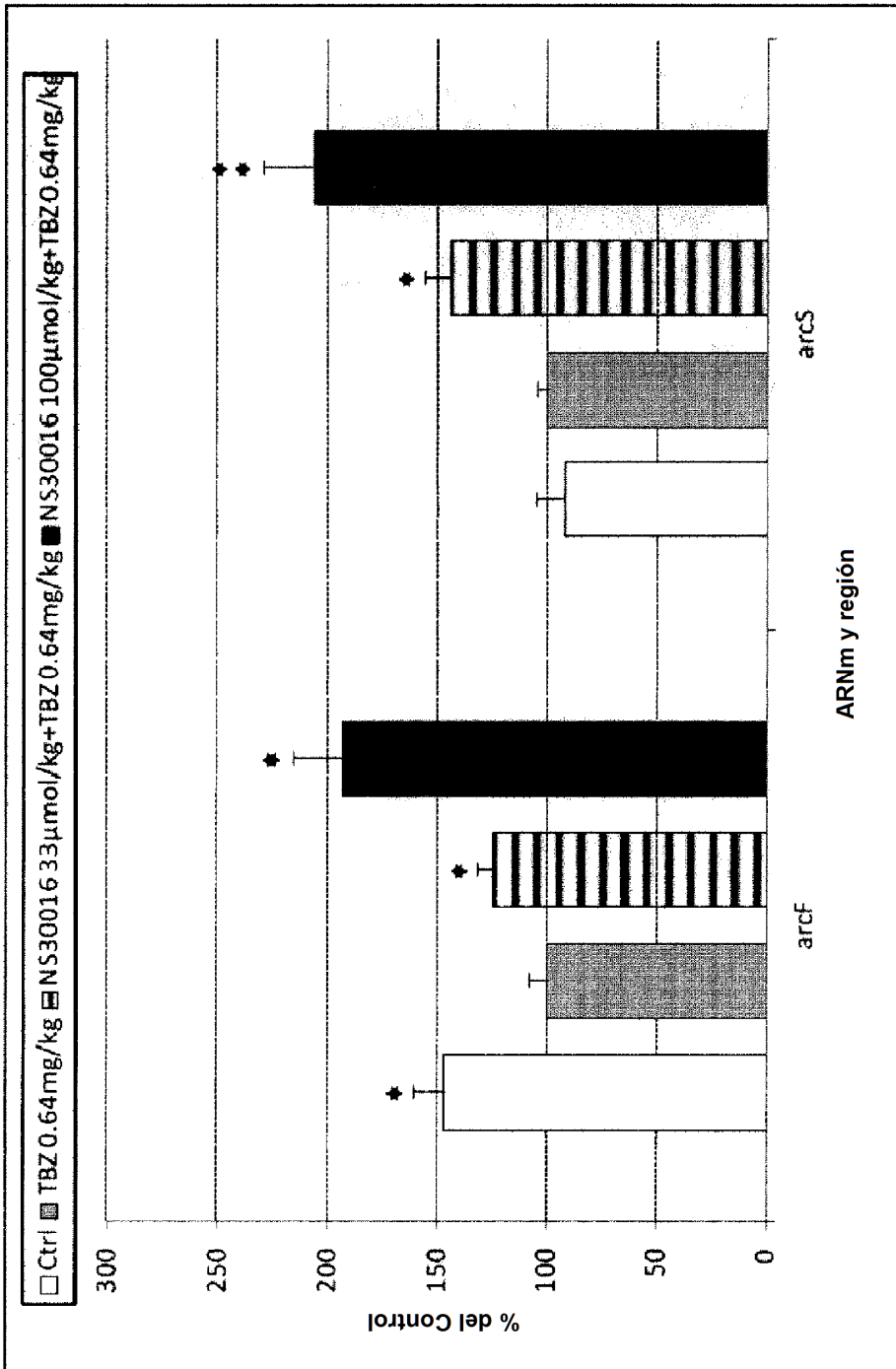


Fig. 14

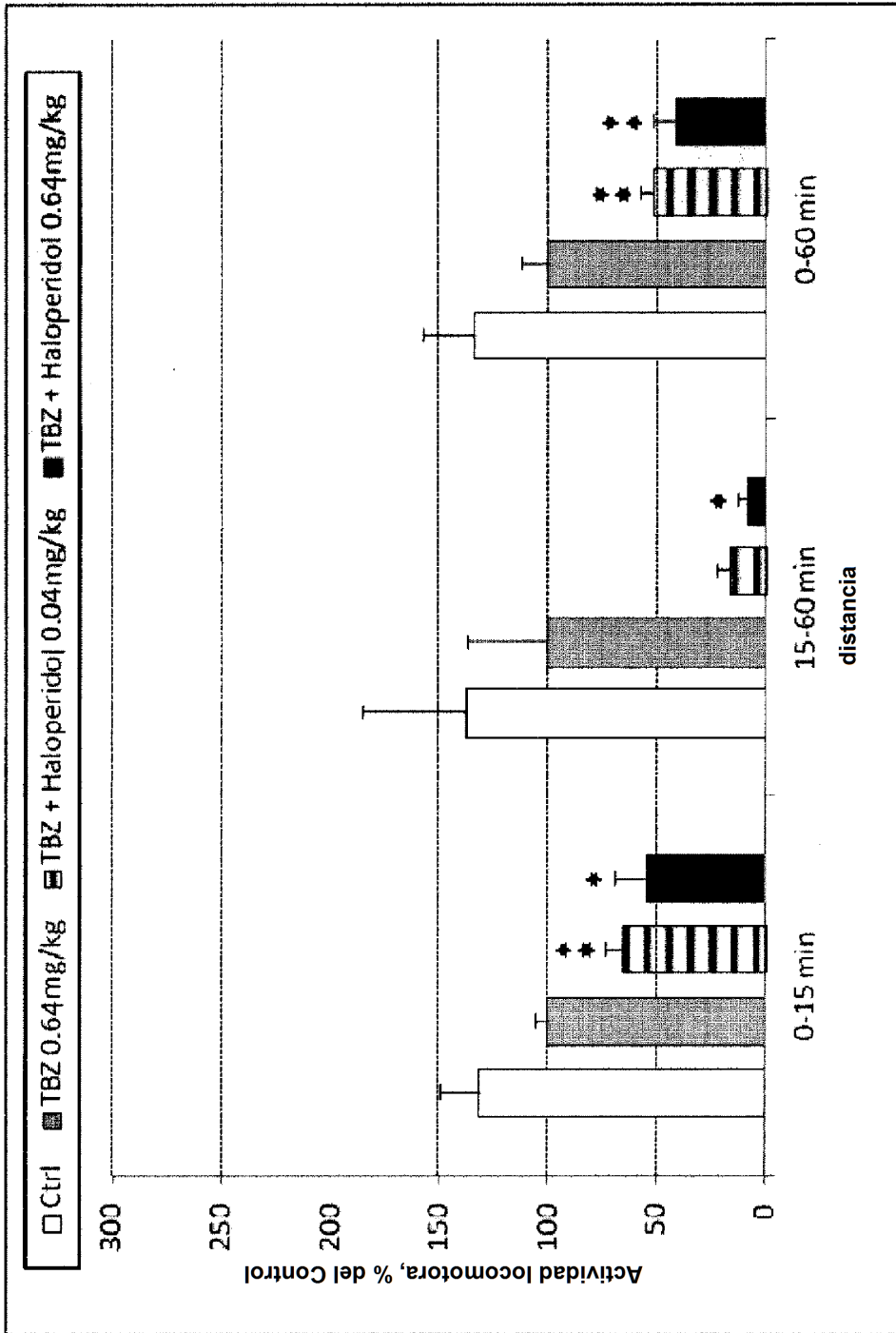


Fig. 15

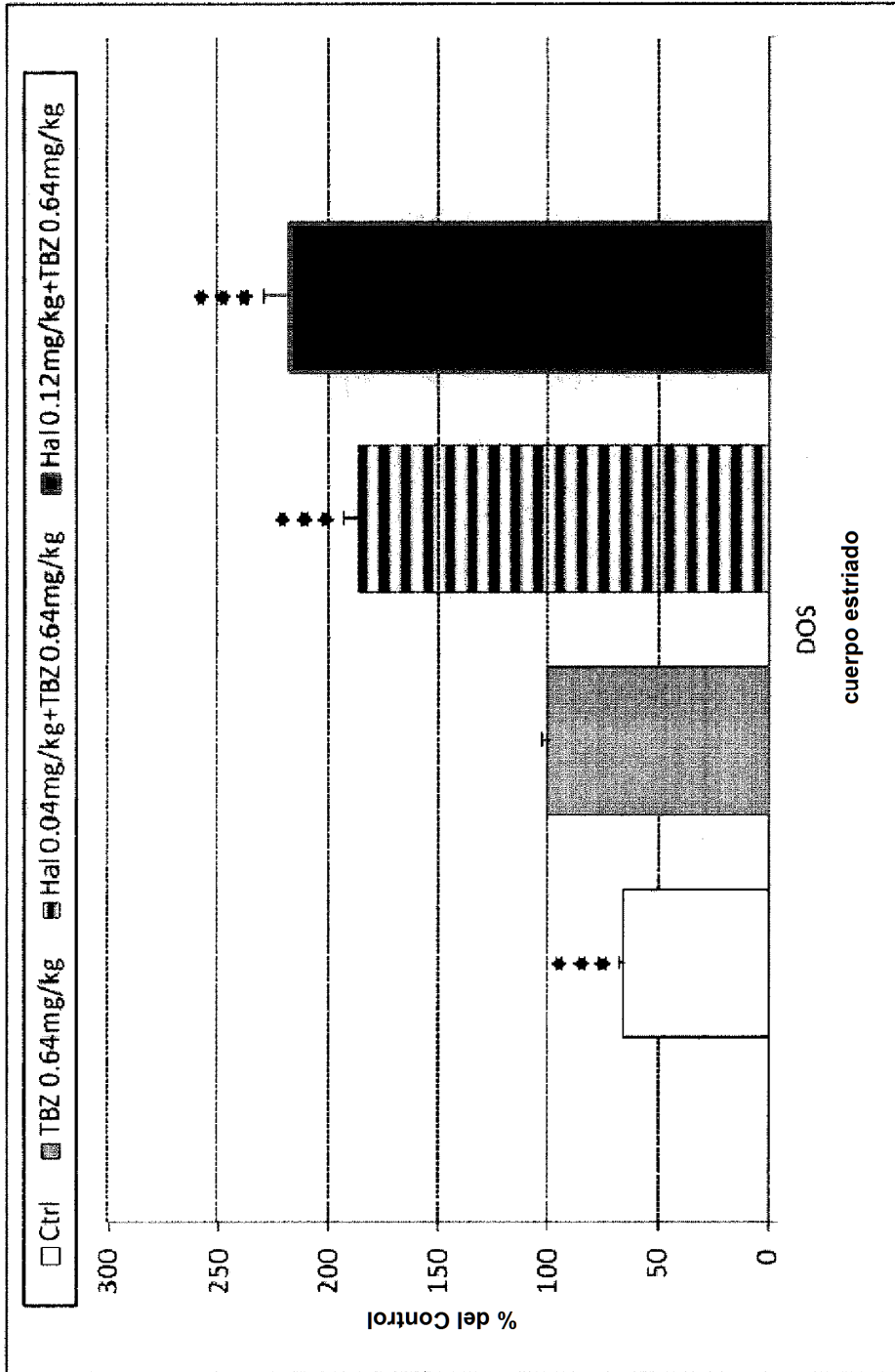


Fig. 16

