



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 696**

51 Int. Cl.:
A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/66 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95939858 .7**
86 Fecha de presentación : **07.11.1995**
87 Número de publicación de la solicitud: **0804183**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.1997**

54 Título: **Uso de creatina o análogos de creatina para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.**

30 Prioridad: **08.11.1994 US 336388**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **Avicena Group, Inc.**
Building 200, Suite 2200, One Kendall Square
Cambridge, Massachusetts 02139, US
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION

72 Inventor/es: **Kaddurah-Daouk, Rima;**
Daouk, Ghaleb y
Beal, M., Flint

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 268 696 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

Uso de creatina o análogos de creatina para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

5

Antecedentes del invento

La creatina es un compuesto que está presente en la naturaleza y se halla en el cerebro de mamíferos y otros tejidos excitables, tales como el músculo esquelético, la retina y el corazón. Su forma fosforilada, el fosfato de creatina, también se halla en los mismos órganos y es el producto de la reacción de la creatina cinasa al utilizar creatina como sustrato. La creatina y el fosfato de creatina pueden sintetizarse de forma relativamente sencilla y de ellos se cree que no son tóxicos para los mamíferos. Kaddurah-Daouk *et al.* (Documentos WO 92/08456, publicado el 29 de Mayo de 1.992; WO 90/09192, publicado el 23 de Agosto de 1.990; U.S. 5.321.030 y U.S. 5.324.731) describen métodos para inhibir el crecimiento, la transformación y/o la metástasis de células de mamífero usando compuestos relacionados. Los ejemplos de compuestos descritos por Kaddurah-Daouk *et al.* incluyen ciclocreatina, ácido b-guanidino-propiónico, homociclocreatina, 1-carboximetil-2-iminohexahidropirimidina, acetato de guanidina y carbocreatina. Estos mismos inventores han demostrado también la eficacia de tales compuestos para combatir infecciones víricas (Documento U.S. 5.321.030). Elebaly, en la Patente de EE.UU. n° 5.091.404, describe el uso de ciclocreatina para restablecer la funcionalidad en el tejido muscular. Cohn, en la Publicación PCT n° WO94/16687, describía un método para inhibir el crecimiento de varios tumores usando creatina y compuestos relacionados.

20

El sistema nervioso es un conjunto de células que no descansa y que recibe continuamente información, la analiza y la percibe, y toma decisiones. Las principales células del sistema nervioso son las neuronas y las células neurogliales. Las neuronas son las unidades básicas de comunicación del sistema nervioso y poseen dendritas, axones y sinapsis necesarias para este papel. Las células neurogliales consisten en astrocitos, oligodendrocitos, células endoteliales y células microgliales. Colectivamente, están implicadas en la protección y el mantenimiento de las neuronas. Las funciones de los astrocitos no son del todo conocidas pero probablemente incluyen la provisión de un soporte bioquímico y físico y la ayuda en el aislamiento de las superficies receptoras de las neuronas. Además de sus actividades en el cerebro normal, también reaccionan a una agresión al sistema nervioso central (CNS; del inglés, central nervous system) mediante la formación de cicatrices gliales. La principal función de los oligodendrocitos es la producción y el mantenimiento de la mielina del CNS. Contribuyen con segmentos de vaina de mielina a múltiples axones.

25

Las células endoteliales reaccionan a la agresión principalmente mediante una pérdida celular. En respuesta a una agresión o la destrucción del cerebro, las células microgliales se activan y adquieren la forma de macrófagos. Estas células pueden también proliferar y adoptar una forma de tipo bastón, células que podría rodear un diminuto foco de necrosis o una neurona muerta para formar un nódulo glial. La degradación microglial de las neuronas muertas se denomina neuronofagia.

35

El sistema energético de creatina cinasa/fosfato de creatina es sólo un componente de un complejo sistema generador de energía hallado en células del sistema nervioso, tales como, por ejemplo, neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Los componentes del sistema energético de la creatina incluyen la enzima creatina cinasa, los sustratos creatina y fosfato de creatina, y el transportador de creatina. La reacción catalizada por la creatina cinasa es: $MgADP + PCr^- + H^+ \rightleftharpoons MgATP^- + Cr$. Algunas de las funciones asociadas con este sistema incluyen la regeneración eficaz de energía en células con exigencias de energía fluctuantes y elevadas, el transporte de energía a diferentes partes de la célula, la actividad transferidora de fosforilos, la regulación del transporte iónico y la implicación en vías de transducción de señales.

40

Se ha mostrado que el sistema de creatina cinasa/fosfocreatina es activo en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann [Manos *et al.*, *J. Neurochem.* 56: 2.101-2.107 (1.991); Molloy *et al.*, *J. Neurochem.* 59: 1.925-1.932 (1.992)]. Se ha mostrado que la actividad de la enzima está suprarregulada durante la regeneración e infrarregulada en estados degenerativos [véanse, por ejemplo, *Annals Neurology* 35 (3): 331-340 (1.994); DeLeon *et al.*, *J. Neurosci. Res.* 29: 437-448 (1.991); Orlovskaja *et al.*, *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk.* 8: 34-39 (1.992); Burbaeva *et al.*, *Shurnal Neuropathologii Psikiatrii Imeni S-S-Korsakova* 90 (7): 85-87 (1.990)]. Se ha hallado recientemente que la creatina cinasa mitocondrial es el componente principal de las inclusiones patológicas vistas en miopatías mitocondriales [Stadhouders *et al.*, *PNAS* 91, páginas 5.080-5.093 (1.994)].

50

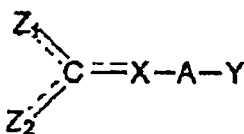
Sumario del invento

El presente invento se refiere al tratamiento de enfermedades del sistema nervioso en un individuo aquejado de dicha enfermedad, mediante la administración a éste de una cantidad de un compuesto o unos compuestos que modulan uno o más de los componentes estructurales o funcionales del sistema de creatina cinasa/fosfocreatina, suficiente para prevenir, reducir o mejorar los síntomas de la enfermedad. Los compuestos que son eficaces para este fin incluyen creatina, fosfato de creatina, y compuestos análogos de creatina o fosfato de creatina.

65

ES 2 268 696 T3

De esta manera, el presente invento proporciona el uso de un compuesto de creatina de fórmula general:



10 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, fórmula en que:

a) Y es seleccionado del grupo que consiste en: $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NHOH}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{NHSO}_2\text{J}$ y $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})$ (OJ), en que J es seleccionado del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo C_1-C_6 de cadena lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alquenilo C_2-C_6 , alquenilo C_3-C_6 ramificado, y arilo;

15 b) A es seleccionado del grupo que consiste en: C, CH, alquilo C_1-C_5 , alquenilo C_2-C_5 , alquinilo C_2-C_5 , y cadenas alcoilo C_1-C_5 , teniendo cada uno 0-2 sustituyentes que son independientemente seleccionados del grupo que consiste en:

20 1) K, en que K es seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1-C_6 lineal, alquenilo C_2-C_6 lineal, alcoilo C_1-C_6 lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alquenilo C_3-C_6 ramificado y alcoilo C_4-C_6 ramificado, teniendo K 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

25 2) un grupo arilo seleccionado del grupo que consiste en: un carbociclo de 1-2 anillos y un heterociclo de 1-2 anillos, grupo arilo que contiene 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{L}$ y $-\text{COCH}_2\text{L}$ en que L es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi; y

30 3) $-\text{NH}-\text{M}$, en que M es seleccionado del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_2-C_4 , alcoilo C_1-C_4 , alquilo C_3-C_4 ramificado, alquenilo C_3-C_4 ramificado y alcoilo C_4 ramificado;

c) X es seleccionado del grupo que consiste en NR_1 , CHR_1 , CR_1 , O y S, en que R_1 es seleccionado del grupo que consiste en:

35 1) hidrógeno;

40 2) K, en que K es seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1-C_6 lineal, alquenilo C_2-C_6 lineal, alcoilo C_1-C_6 lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alquenilo C_3-C_6 ramificado y alcoilo C_4-C_6 ramificado, teniendo K 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

45 3) un grupo arilo seleccionado del grupo que consiste en: un carbociclo de 1-2 anillos y un heterociclo de 1-2 anillos, grupo arilo que contiene 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{L}$ y $-\text{COCH}_2\text{L}$ en que L es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

4) un ácido α -amino-w-metil-w-adenosilcarboxílico C_5-C_9 , unido a través del carbono w-metilico;

50 5) un ácido α -amino-w-aza-w-metil-w-adenosilcarboxílico C_5-C_9 , unido a través del carbono w-metilico; y

6) un ácido α -amino-w-tia-w-metil-w-adenosilcarboxílico C_5-C_9 , unido a través del carbono w-metilico;

55 d) Z_1 y Z_2 son independientemente escogidos del grupo que consiste en: $=\text{O}$, $-\text{NHR}_2$, $-\text{CH}_2\text{R}_2$, y $-\text{NR}_2\text{OH}$; en que Z_1 y Z_2 no pueden ser $=\text{O}$ a la vez y en que R_2 es seleccionado del grupo que consiste en:

1) hidrógeno;

60 2) K, en que K es seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1-C_6 lineal, alquenilo C_2-C_6 lineal, alcoilo C_1-C_6 lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alquenilo C_3-C_6 ramificado y alcoilo C_4-C_6 ramificado, teniendo K 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

65 3) un grupo arilo seleccionado del grupo que consiste en: un carbociclo de 1-2 anillos y un heterociclo de 1-2 anillos, grupo arilo que contiene 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{L}$ y $-\text{COCH}_2\text{L}$ en que L es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

ES 2 268 696 T3

- 4) un ácido α -amino-carboxílico C_4 - C_8 , unido a través del carbono w;
- 5) B, en que B es seleccionado del grupo que consiste en: $-CO_2H$, $-NHOH$, $-SO_3H$, $-NO_2$, $OP(=O)(OH)(OJ)$ y $-P(=O)(OH)(OJ)$, en que J es seleccionado del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo C_1 - C_6 lineal, alquilo C_3 - C_6 ramificado, alqueno C_2 - C_6 , alqueno C_3 - C_6 ramificado, y arilo, en que B está opcionalmente conectado con el nitrógeno a través de un conector seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1 - C_2 , alqueno C_2 , y alcoilo C_1 - C_2 ;
- 6) -D-E, en que D es seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1 - C_3 lineal, alquilo C_3 ramificado, alqueno C_2 - C_3 lineal, alqueno C_3 ramificado, alcoilo C_1 - C_3 lineal, arilo y aroilo; y E es seleccionado del grupo que consiste en: $-(PO_3)_nNMP$, en que n es 0-2 y NMP es un ribonucleótido-monofosfato conectado a través del 5'-fosfato, el 3'-fosfato o el anillo aromático de la base; $-[P(=O)(OCH_3)(O)]_m-Q$, en que m es 0-3 y Q es un ribonucleosido conectado a través de la ribosa o el anillo aromático de la base; $-[P(=O)(OH)(CH_2)]_m-Q$, en que m es 0-3 y Q es un ribonucleosido conectado a través de la ribosa o el anillo aromático de la base; y un grupo arilo que contiene 0-3 sustituyentes elegidos independientemente del grupo que consiste en: Cl, Br, epoxi, acetoxi, $-OG$, $-C(=O)G$ y $-CO_2G$, en que G es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1 - C_6 lineal, alqueno C_2 - C_6 lineal, alcoilo C_1 - C_6 lineal, alquilo C_3 - C_6 ramificado, alqueno C_3 - C_6 ramificado y alcoilo C_4 - C_6 ramificado; en que E puede estar unido a D por cualquier punto, y, si D es alquilo o alqueno, D puede estar conectado en cualquier extremo o en ambos extremos mediante un enlace amida; y
- 7) -E, en que E es seleccionado del grupo que consiste en: $-(PO_3)_nNMP$, en que n es 0-2 y NMP es un ribonucleótido-monofosfato conectado a través del 5'-fosfato, el 3'-fosfato o el anillo aromático de la base; $-[P(=O)(OCH_3)(O)]_m-Q$, en que m es 0-3 y Q es un ribonucleosido conectado a través de la ribosa o el anillo aromático de la base; $-[P(=O)(OH)(CH_2)]_m-Q$, en que m es 0-3 y Q es un ribonucleosido conectado a través de la ribosa o el anillo aromático de la base; y un grupo arilo que contiene 0-3 sustituyentes elegidos independientemente del grupo que consiste en: Cl, Br, epoxi, acetoxi, $-OG$, $-C(=O)G$ y $-CO_2G$, en que G es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1 - C_6 lineal, alqueno C_2 - C_6 lineal, alcoilo C_1 - C_6 lineal, alquilo C_3 - C_6 ramificado, alqueno C_3 - C_6 ramificado y alcoilo C_4 - C_6 ramificado; y, si E es arilo, E puede estar conectado por un enlace amida;

e) si R_1 y al menos un grupo R_2 están presentes, R_1 puede estar conectado a un grupo R_2 mediante un enlace sencillo o doble para formar un ciclo de 5 a 7 miembros;

f) si dos grupos R_2 están presentes, pueden estar conectados mediante un enlace sencillo o doble para formar un ciclo de 4 a 7 miembros; y

g) si R_1 está presente y Z_1 o Z_2 es seleccionado del grupo que consiste en $-NHR_2$, $-CH_2R_2$ y $-NR_2OH$, R_1 puede estar entonces conectado al carbono o el nitrógeno de Z_1 o Z_2 mediante un enlace sencillo o doble para formar un ciclo de 4 a 7 miembros;

en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de, o para la prevención de la aparición de, o para el tratamiento de los síntomas asociados con, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica.

Las composiciones que contienen compuestos de creatina en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y cantidades eficaces de otros agentes que actúan sobre el sistema nervioso, pueden ser también utilizadas para tratar profiláctica y/o terapéuticamente a un sujeto con una enfermedad del sistema nervioso. El presente invento se refiere además a métodos de uso de compuestos de creatina en combinación con otros agentes que actúan sobre el sistema nervioso, para tratar enfermedades del sistema nervioso.

En el presente invento también pueden utilizarse fármacos envasados para tratar a sujetos que tienen una enfermedad del sistema nervioso o a un sujeto que está predispuesto a dichas enfermedades. Los fármacos envasados incluyen un recipiente que contiene el compuesto de creatina, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, junto con instrucciones para administrar el mismo con el fin de prevenir, mejorar, detener o eliminar una enfermedad del sistema nervioso.

Otras enfermedades ejemplares susceptibles de tratamiento con compuestos de creatina de acuerdo con el presente invento incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de la neurona motora, neuropatías diabéticas y tóxicas, lesión nerviosa traumática, esclerosis múltiple, encefalomiелitis aguda diseminada, leucoencefalitis hemorrágica necrotizante aguda, enfermedades de desmielinización, enfermedades mitocondriales, infecciones fúngicas y bacterianas, trastornos migrañosos, accidente cerebrovascular, envejecimiento, demencia, y trastornos mentales tales como depresión y esquizofrenia.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico que ilustra el efecto de compuestos de creatina sobre los volúmenes de lesiones en ratones, usando el modelo del malonato.

La Figura 2 es un gráfico que ilustra el efecto de compuestos de creatina sobre los niveles de dopamina, HVA y DOPAC en ratones, usando el modelo animal del MPTP.

Descripción detallada

5

El uso de acuerdo con el presente invento implica generalmente el tratamiento de un individuo aquejado de una enfermedad del sistema nervioso, de acuerdo con la Reivindicación 1, con una cantidad de un compuesto o compuestos que modulan uno o más de los componentes estructurales o funcionales del sistema de creatina cinasa/fosfocreatina, suficiente para prevenir, reducir o mejorar los síntomas de la enfermedad. Los componentes del sistema que pueden ser modulados incluyen la enzima creatina cinasa, los sustratos creatina y fosfato de creatina, y el transportador de creatina. Como se usa aquí, el término “modular” significa cambiar, afectar a, o interferir en, el funcionamiento normal del componente en el sistema enzimático de creatina cinasa/fosfocreatina.

15

Los compuestos que son particularmente eficaces para este fin incluyen creatina, fosfato de creatina y compuestos análogos de los mismos que se describen con detalle más adelante. La expresión “compuestos de creatina” se utilizará aquí para incluir creatina, fosfato de creatina, y compuestos que son estructuralmente similares a la creatina o al fosfato de creatina, y compuestos análogos de creatina y fosfato de creatina. La expresión “compuestos de creatina” también incluye compuestos que “remedan” la actividad de la creatina, el fosfato de creatina o los compuestos análogos de creatina, es decir, compuestos que inhiben o modulan el sistema de la creatina cinasa. Con el término “compuestos miméticos” se pretende incluir compuestos que pueden no ser estructuralmente similares a la creatina pero que remedan la actividad terapéutica de la creatina, el fosfato de creatina o compuestos estructuralmente similares. La expresión “inhibidores del sistema de la creatina cinasa” se refiere a compuestos que inhiben la actividad de la enzima creatina cinasa, moléculas que inhiben el transportador de creatina o moléculas que inhiben la unión de la enzima a otras proteínas estructurales o enzimas o lípidos. La expresión “moduladores del sistema de la creatina cinasa” se refiere a compuestos que modulan la actividad de la enzima, o la actividad del transportador de creatina o la capacidad de otras proteínas o enzimas o lípidos para interactuar con el sistema. Con la expresión “compuesto análogo de creatina” se pretende incluir compuestos que son estructuralmente similares a la creatina o al fosfato de creatina, compuestos que son reconocidos en la técnica como compuestos análogos de creatina o de fosfato de creatina, y/o compuestos que comparten una función igual o similar a la de la creatina o el fosfato de creatina.

30

Con la expresión “tratamiento de enfermedades del sistema nervioso” se pretende incluir la prevención de la enfermedad, la mejora y/o la detención de una enfermedad preexistente, y la eliminación de una enfermedad preexistente. Los compuestos análogos de creatina aquí descritos ejercen efectos tanto curativos como profilácticos sobre el desarrollo y el progreso de las enfermedades.

35

Con la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se pretende incluir la cantidad de compuesto de creatina suficiente para prevenir el inicio de enfermedades del sistema nervioso o reducir significativamente el progreso de dichas enfermedades en el sujeto que se trata. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ser determinada sobre una base individual y se basará, al menos en parte, en la consideración de la gravedad de los síntomas que se tratan y de la actividad del compuesto análogo específico seleccionado, en el caso de que se use un compuesto análogo. Además, las cantidades eficaces del compuesto de creatina pueden variar dependiendo de la edad, el sexo y el peso del sujeto que se trata. De esta manera, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de creatina puede ser determinada por un experto en la técnica empleando factores como los anteriormente descritos y usando no más que la experimentación rutinaria en la gestión clínica.

45

Con la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” se pretende incluir sustancias que pueden ser coadministradas con el compuesto de creatina y que permiten que el ingrediente activo lleve a cabo su prevista función de prevención, mejora, detención o eliminación de una(s) enfermedad(es) del sistema nervioso. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen disolventes, medios de dispersión, agentes adyuvantes, agentes retardadores y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. En este invento puede utilizarse cualesquier medios y agentes convencionales compatibles con el compuesto de creatina.

50

Con la expresión “sal farmacéuticamente aceptable” se pretende incluir sales farmacéuticamente aceptables reconocidas en la técnica. Típicamente, estas sales pueden ser hidrolizadas bajo condiciones fisiológicas. Los ejemplos de dichas sales incluyen sodio, potasio y hemisulfato. Con la expresión se pretende incluir además grupos hidrocarbonados inferiores que pueden ser hidrolizados bajo condiciones fisiológicas, es decir, grupos que esterifican el resto carboxílico, por ejemplo, metilo, etilo y propilo.

55

Con el término “sujeto” se pretende incluir organismos vivos susceptibles de padecer enfermedades del sistema nervioso, tales como, por ejemplo, mamíferos. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, perros, gatos, caballos, vacas, cabras, ratas y ratones. Con el término “sujeto” se pretende incluir además especies transgénicas.

60

Enfermedades degenerativas

65

No hay una buena etiología ni patofisiología conocidas de estas enfermedades ni una razón apremiante que haga suponer que todas tienen una etiología similar. Las enfermedades situadas bajo esta categoría tienen similitudes generales. Son enfermedades de neuronas que tienden a tener como resultado un deterioro selectivo, afectando a uno o más sistemas funcionales de neuronas mientras dejan intactos a otros.

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson se debe a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra del cerebro. Se manifiesta mediante movimientos voluntarios lentificados, rigidez, rostro inexpressivo y postura encorvada. Se dispone de varios fármacos para aumentar la función dopaminérgica, tales como levodopa, carbidopa, bromocriptina y pergolida, o disminuir la función colinérgica, tales como benzotropina y amantadina. La selegilina es un nuevo tratamiento destinado a proteger las neuronas dopaminérgicas restantes.

Enfermedad degenerativa que afecta a neuronas motoras

En esta categoría se incluyen enfermedades tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS; del inglés, amyotrophic lateral sclerosis) y la atrofia muscular espinal. Se caracterizan por la degeneración de neuronas motoras en el CNS, lo que conduce a una debilidad progresiva, atrofia muscular y muerte causada por insuficiencia respiratoria. Los tratamientos son sólo sintomáticos; no hay tratamientos disponibles para entretener o detener la enfermedad.

Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (HD; del inglés, Huntington disease) es un trastorno dominante autosómico de inicio a edad mediana, clínicamente caracterizado por trastorno del movimiento, cambios de personalidad y demencia, lo que conduce a menudo a la muerte en 15-20 años. Los cambios neuropatológicos en el cerebro se centran en los ganglios basales. Es típica la pérdida de una clase de neuronas de proyección, denominadas "células espinosas" a causa de sus prominentes prolongaciones dendríticas espinosas. Esta clase de células contiene ácido gamma-aminobutírico (GABA; del inglés, gamma-aminobutyric acid), sustancia P y péptidos opioides. Estudios de ligamiento han permitido localizar el gen de la HD en la banda más distal del brazo corto del cromosoma 4. No se dispone de tratamientos que hayan mostrado retrasar el progreso de la enfermedad. Estudios experimentales que muestran una similitud entre las neuronas que son sensibles a agonistas de N-metil-D-aspartato (NMDA) y aquellas que desaparecen en la HD han conducido a la alentadora especulación de que los antagonistas de NMDA podrían resultar beneficiosos. Algunos estudios recientes sugieren que un defecto en el metabolismo energético del cerebro podría producirse en la HD y potenciar la vulnerabilidad neuronal al estrés excitotóxico.

Compuestos de creatina útiles para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la ALS

Los compuestos de creatina útiles en el presente invento incluyen compuestos que modulan uno o más de los componentes estructurales o funcionales del sistema de creatina cinasa/fosfocreatina. Los compuestos que son eficaces para este fin incluyen creatina, fosfato de creatina y compuestos análogos de los mismos, compuestos que remedan su actividad, y sales de estos compuestos como las anteriormente definidas. A continuación se describen compuestos de creatina ejemplares.

La creatina [también conocida como N-(aminoiminometil)-N-metilglicocola, metilglicosamina o ácido N-metilguanidoacético] es una sustancia bien conocida [véase *The Merck Index*, Decimoprimer Edición, N° 2.570 (1.989)].

La creatina es química o enzimáticamente fosforilada por la creatina cinasa para generar fosfato de creatina, que también es bien conocido (véase *The Merck Index*, N° 7.315). Tanto la creatina como el fosfato de creatina (fosfocreatina) pueden ser extraídos de tejido animal o ser químicamente sintetizados. Ambos son comercialmente asequibles.

La ciclocreatina es un compuesto análogo de creatina cíclico y esencialmente plano. Aunque la ciclocreatina es estructuralmente similar a la creatina, los dos compuestos son distinguibles tanto cinética como termodinámicamente. La ciclocreatina es eficazmente fosforilada por la creatina cinasa en la reacción directa tanto *in vitro* como *in vivo* [G. L. Rowley, *J. Am. Chem. Soc.* 93: 5.542-5.551 (1.971); A. C. McLaughlin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 247: 4.382-4.388 (1.972)].

El compuesto fosforilado fosfociclocreatina es estructuralmente similar a la fosfocreatina; sin embargo, el enlace fósforo-nitrógeno (P-N) del fosfato de ciclocreatina es más estable que el de la fosfocreatina [P. LoPresti y M. Cohn, *Biochem. Biophys. Acta* 998: 317-320 (1.989); T. M. Annesley y J. B. Walker, *J. Biol. Chem.* 253: 8.120-8.125 (1.978); T. M. Annesley y J. B. Walker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74: 185-190 (1.977)].

Los compuestos análogos de creatina y otros agentes que actúan interfiriendo en la actividad de enzimas biosintéticas de creatina o en el transportador de creatina son útiles en el presente método para tratar enfermedades del sistema nervioso. En el sistema nervioso, hay muchos posibles sitios intracelulares, así como extracelulares, para la acción de compuestos que inhiben, aumentan o, en cualquier caso, modifican la generación de energía a través de la creatina cinasa cerebral y/o otras enzimas que están asociadas con ella. De este modo, los efectos de dichos compuestos pueden ser directos o indirectos, actuando mediante mecanismos que incluyen, pero no se limitan a, la influencia en la incorporación o biosíntesis de creatina, la función de la lanzadera de fosfato de creatina, la inhibición de la actividad enzimática o la actividad de enzimas asociadas, y la alteración de los niveles de los sustratos o productos de una reacción para alterar la velocidad de la reacción.

ES 2 268 696 T3

A continuación se describen sustancias de las que se sabe o se cree que modifican la producción de energía a través del sistema de creatina cinasa/fosfocreatina y que pueden ser utilizadas en el presente método. En las Tablas 1 y 2 se muestran compuestos ejemplares. Será posible modificar la sustancias descritas más adelante para producir compuestos análogos que tengan unas características mejoradas, tal como una mayor especificidad por la enzima, una estabilidad mejorada, una incorporación mejorada a células o una mejor actividad ligante.

TABLA 1

Compuestos análogos de creatina

10

15

20

25

30

35

40

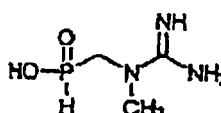
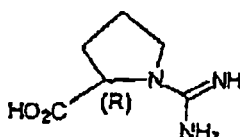
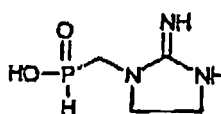
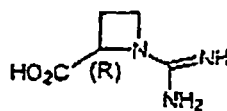
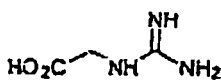
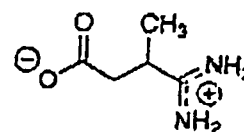
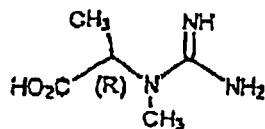
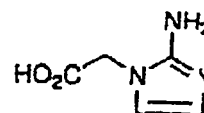
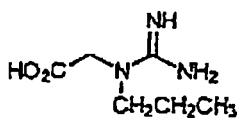
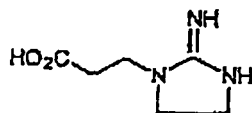
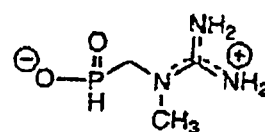
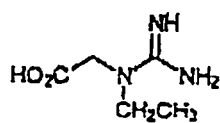
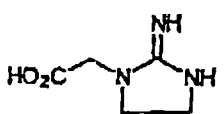
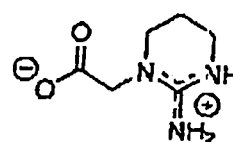
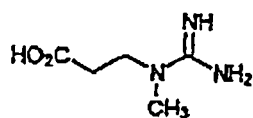
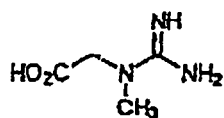
45

50

55

60

65

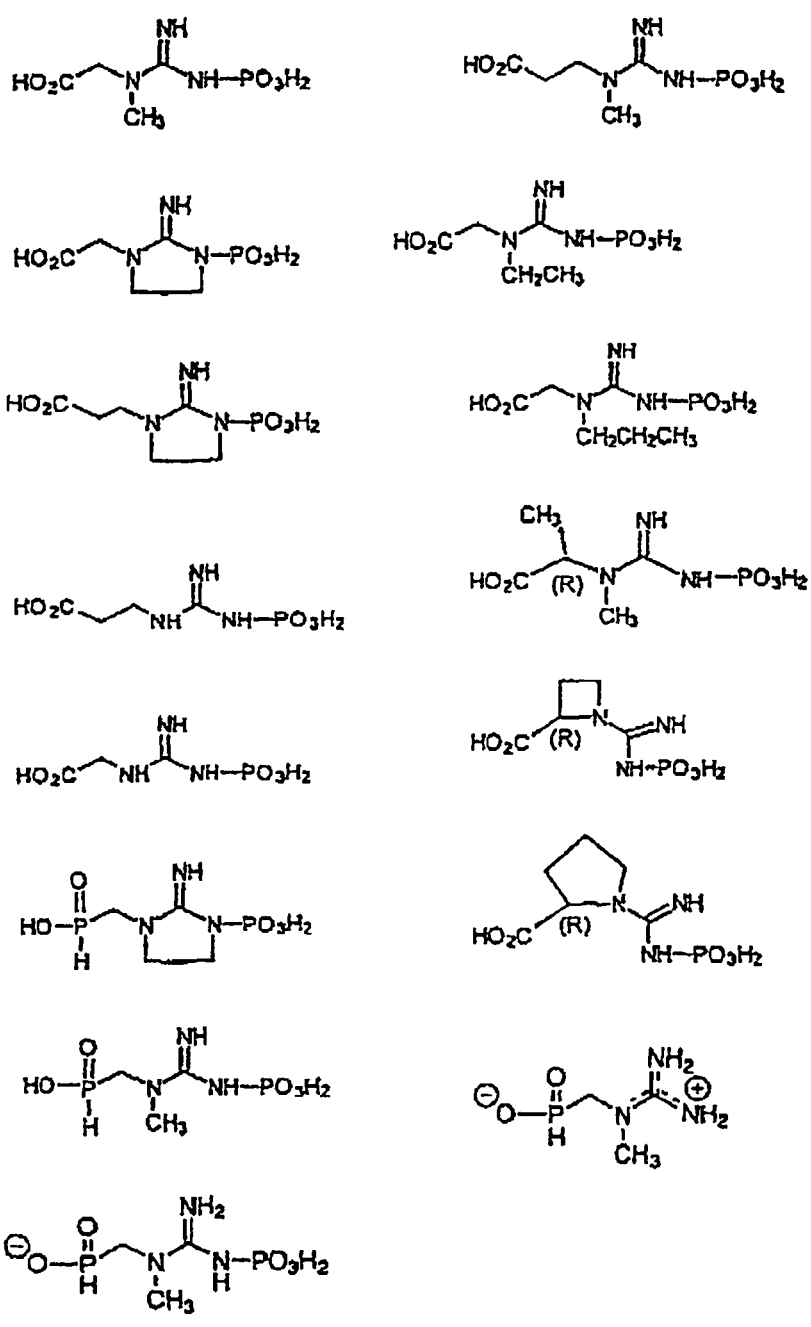


ES 2 268 696 T3

TABLA 2

Compuestos análogos de fosfato de creatina

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55



Los compuestos que modifican directa o indirectamente la estructura o la función del sistema de creatina cinasa/fosfato de creatina son útiles para prevenir y/o tratar enfermedades del sistema nervioso caracterizadas por una suprarregulación o infrarregulación del sistema enzimático.

En enfermedades en que el sistema de creatina cinasa/fosfato de creatina está infrarregulado, por ejemplo, con una activación incontrolada de neuronas, las moléculas útiles para el tratamiento de estas enfermedades incluyen aquéllas que suprarregulan la actividad o que pueden mantener la producción de energía (ATP) durante un periodo de tiempo más prolongado. Los ejemplos incluyen fosfato de creatina y moléculas relacionadas que forman fosfágenos estables que mantienen la producción de ATP durante un periodo prolongado de tiempo.

En enfermedades en que el sistema de creatina cinasa/fosfato de creatina está suprarregulado, las moléculas que son útiles incluyen aquéllas que infrarregulan la actividad y/o inhiben la producción de energía (ATP).

ES 2 268 696 T3

Las moléculas que regulan el transportador de creatina, o la asociación de creatina cinasa con otras moléculas proteicas o lipídicas en la membrana o la concentración de los sustratos creatina y fosfato de creatina son también útiles para prevenir y/o tratar enfermedades del sistema nervioso.

5 Los compuestos que son útiles en el presente invento pueden ser inhibidores, sustratos o compuestos análogos de sustratos, de la creatina cinasa, los cuales, cuando estuvieran presentes, podrían modificar la generación de energía o la transferencia de fosforilos de alta energía a través del sistema de creatina cinasa/fosfocreatina. Además, los
10 moduladores de las enzimas que actúan conjuntamente con la creatina cinasa pueden ser ahora diseñados y usados, individualmente, en combinación o junto con otros fármacos, para lograr un control más ajustado del efecto sobre la creatina cinasa del cerebro.

Se puede acceder a las vías de la biosíntesis y el metabolismo de la creatina y el fosfato de creatina seleccionando y diseñando compuestos que puedan modificar la producción de energía o la transferencia de fosforilos de alta energía a través del sistema de la creatina cinasa. Los compuestos dirigidos a fases específicas pueden depender de analogías
15 estructurales con la creatina o sus precursores. Pueden diseñarse nuevos compuestos análogos de creatina que difieran de la creatina por sustitución, prolongación de cadena y/o ciclación. Pueden enlazarse covalentemente los sustratos de enzimas multisustratos o pueden diseñarse compuestos análogos que remedan porciones de los diferentes sustratos. Pueden también diseñarse compuestos análogos fosforilados no hidrolizables para remedar el fosfato de creatina sin mantener la producción de ATP.

20 Diversos compuestos análogos de creatina y fosfato de creatina han sido previamente descritos en la bibliografía o pueden ser fácilmente sintetizados. Son ejemplos los mostrados en la Tabla 1 y la Tabla 2. Algunos de ellos son sustratos lentos para creatina cinasa.

25 En la Tabla 1 y la Tabla 2 se ilustran las estructuras de la creatina, ciclocreatina (1-carboximetil-2-iminoimidazolidina), N-fosfocreatina (N-fosforilcreatina), fosfato de ciclocreatina (3-fosforil-1-carboximetil-2-iminoimidazolidina) y otros compuestos. Además, se cree que el 1-carboximetil-2-aminoimidazol, la 1-carboximetil-2-iminometilimidazolidina, la 1-carboxietil-2-iminoimidazolidina, la N-etil-N-amidinoglicocola y el ácido b-guanidinopropiónico son eficaces.

30 La ciclocreatina (1-carboximetil-2-iminoimidazolidina) es un ejemplo de una clase de compuestos análogos de sustratos de la creatina cinasa que pueden ser fosforilados por la creatina cinasa y de los que se cree que son activos.

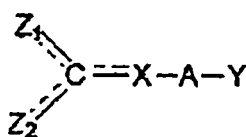
35 Una clase de compuestos dirigidos a la creatina cinasa son compuestos análogos bisustratos que comprenden un resto de tipo adenosina unido a un resto de tipo creatina (es decir, creatina o un compuesto análogo de creatina) a través de un puente modificable. Se espera que dichos compuestos se unan con una afinidad mayor que la suma de la interacción ligante de cada sustrato individual (por ejemplo, creatina y ATP). El puente modificable que une el resto de tipo adenosina, por el carbono 5', con el resto de tipo creatina puede ser un grupo carbonilo, un grupo alquilo (un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que tiene uno o más átomos de carbono) o un grupo alquilo sustituido (un grupo alquilo que lleva una o más funciones, que incluyen, pero no se limitan a, insaturación, sustituyentes heteroatómicos, derivados de ácidos carboxílicos e inorgánicos, y restos electrófilos).

Otra clase de posibles compuestos para tratar trastornos del sistema nervioso está destinada a inhibir (reversible o irreversiblemente) la creatina cinasa. Los compuestos análogos de creatina de esta clase pueden unirse irreversiblemente al sitio activo de la enzima. Dos de tales reactivos de afinidad de los que se ha mostrado previamente que inactivan completa e irreversiblemente la creatina cinasa son la epoxicreatina [M. A. Marietta y G. L. Kenyon, *J. Biol. Chem.* 254: 1.879-1.886 (1.979)] y la isoepoxicreatina [A. C. K. Nguyen, Tesis Doctoral en Química Farmacéutica (Universidad de California, San Francisco, EE.UU.), 1.983, páginas 112-205]. Hay varios planteamientos para potenciar la especificidad y, por lo tanto, la eficacia de los inhibidores irreversibles de la creatina cinasa, específicos del sitio activo, por incorporación de un resto electrófilo. La concentración eficaz de un compuesto necesaria para la inhibición puede ser reducida aumentando los contactos ligantes favorables y disminuyendo los contactos ligantes desfavorables en el compuesto análogo de creatina.

55 Pueden también diseñarse compuestos análogos de N-fosfocreatina que lleven restos intransferibles que remedan el grupo N-fosforilo. Estos no pueden mantener la producción de ATP.

Los compuestos de creatina de este invento son aquellos abarcados por la fórmula general I:

60



65

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, fórmula en que:

ES 2 268 696 T3

a) Y es seleccionado del grupo que consiste en: $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NHOH}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{NHSO}_2\text{J}$ y $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{OJ})$, en que J es seleccionado del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo C_1-C_6 de cadena lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_3-C_6 ramificado, y arilo;

5 b) A es seleccionado del grupo que consiste en: C, CH, alquilo C_1-C_5 , alqueno C_2-C_5 , alqueno C_2-C_5 , y cadenas alquilo C_1-C_5 , teniendo cada uno 0-2 sustituyentes que son independientemente seleccionados del grupo que consiste en:

10 1) K, en que K es seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1-C_6 lineal, alqueno C_2-C_6 lineal, alquilo C_1-C_6 lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alqueno C_3-C_6 ramificado y alquilo C_4-C_6 ramificado, teniendo K 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

15 2) un grupo arilo seleccionado del grupo que consiste en: un carbociclo de 1-2 anillos y un heterociclo de 1-2 anillos, grupo arilo que contiene 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{L}$ y $-\text{COCH}_2\text{L}$ en que L es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi; y

20 3) $-\text{NH}-\text{M}$, en que M es seleccionado del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo C_1-C_4 , alqueno C_2-C_4 , alquilo C_1-C_4 , alquilo C_3-C_4 ramificado, alqueno C_3-C_4 ramificado y alquilo C_4 ramificado;

c) X es seleccionado del grupo que consiste en NR_1 , CHR_1 , CR_1 , O y S, en que R_1 es seleccionado del grupo que consiste en:

25 1) hidrógeno;

30 2) K, en que K es seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1-C_6 lineal, alqueno C_2-C_6 lineal, alquilo C_1-C_6 lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alqueno C_3-C_6 ramificado y alquilo C_4-C_6 ramificado, teniendo K 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

35 3) un grupo arilo seleccionado del grupo que consiste en: un carbociclo de 1-2 anillos y un heterociclo de 1-2 anillos, grupo arilo que contiene 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{L}$ y $-\text{COCH}_2\text{L}$ en que L es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

4) un ácido α -amino- ω -metil- ω -adenosilcarboxílico C_5-C_9 , unido a través del carbono ω -metílico;

40 5) un ácido α -amino- ω -aza- ω -metil- ω -adenosilcarboxílico C_5-C_9 , unido a través del carbono ω -metílico; y

6) un ácido α -amino- ω -tia- ω -metil- ω -adenosilcarboxílico C_5-C_9 , unido a través del carbono ω -metílico;

d) Z_1 y Z_2 son independientemente elegidos del grupo que consiste en: $=\text{O}$, $-\text{NHR}_2$, $-\text{CH}_2\text{R}_2$, y $-\text{NR}_2\text{OH}$; en que Z_1 y Z_2 no pueden ser $=\text{O}$ a la vez y en que R_2 es seleccionado del grupo que consiste en:

45 1) hidrógeno;

50 2) K, en que K es seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1-C_6 lineal, alqueno C_2-C_6 lineal, alquilo C_1-C_6 lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alqueno C_3-C_6 ramificado y alquilo C_4-C_6 ramificado, teniendo K 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

55 3) un grupo arilo seleccionado del grupo que consiste en: un carbociclo de 1-2 anillos y un heterociclo de 1-2 anillos, grupo arilo que contiene 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{L}$ y $-\text{COCH}_2\text{L}$ en que L es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

4) un ácido α -amino-carboxílico C_4-C_8 , unido a través del carbono ω ;

60 5) B, en que B es seleccionado del grupo que consiste en: $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NHOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NO}_2$, $\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})(\text{OJ})$ y $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{OJ})$, en que J es seleccionado del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo C_1-C_6 lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alqueno C_2-C_6 , alqueno C_3-C_6 ramificado, y arilo, en que B está opcionalmente conectado con el nitrógeno a través de un conector seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1-C_2 , alqueno C_2 , y alquilo C_1-C_2 ;

65 6) $-\text{D}-\text{E}$, en que D es seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1-C_3 lineal, alquilo C_3 ramificado, alqueno C_2-C_3 lineal, alqueno C_3 ramificado, alquilo C_1-C_3 lineal, arilo y aroilo; y E es seleccionado del grupo que consiste en: $-(\text{PO}_3)_n-\text{NMP}$, en que n es 0-2 y NMP es un ribonucleótido-monofosfato co-

ES 2 268 696 T3

nectado a través del 5'-fosfato, el 3'-fosfato o el anillo aromático de la base; $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_3)(\text{O})_m-\text{Q}$, en que m es 0-3 y Q es un ribonucleosido conectado a través de la ribosa o el anillo aromático de la base; $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{CH}_2)_m-\text{Q}$, en que m es 0-3 y Q es un ribonucleosido conectado a través de la ribosa o el anillo aromático de la base; y un grupo arilo que contiene 0-3 sustituyentes elegidos independientemente del grupo que consiste en: Cl, Br, epoxi, acetoxi, -OG, $-\text{C}(=\text{O})\text{G}$ y $-\text{CO}_2\text{G}$, en que G es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1-C_6 lineal, alquenilo C_2-C_6 lineal, alcoilo C_1-C_6 lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alquenilo C_3-C_6 ramificado y alcoilo C_4-C_6 ramificado; en que E puede estar unido a D por cualquier punto, y, si D es alquilo o alquenilo, D puede estar conectado en cualquier extremo o en ambos extremos mediante un enlace amida; y

7) -E, en que E es seleccionado del grupo que consiste en: $-(\text{PO}_3)_n\text{NMP}$, en que n es 0-2 y NMP es un ribonucleótido-monofosfato conectado a través del 5'-fosfato, el 3'-fosfato o el anillo aromático de la base; $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_3)(\text{O})_m-\text{Q}$, en que m es 0-3 y Q es un ribonucleosido conectado a través de la ribosa o el anillo aromático de la base; $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{CH}_2)_m-\text{Q}$, en que m es 0-3 y Q es un ribonucleosido conectado a través de la ribosa o el anillo aromático de la base; y un grupo arilo que contiene 0-3 sustituyentes elegidos independientemente del grupo que consiste en: Cl, Br, epoxi, acetoxi, -OG, $-\text{C}(=\text{O})\text{G}$ y $-\text{CO}_2\text{G}$, en que G es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1-C_6 lineal, alquenilo C_2-C_6 lineal, alcoilo C_1-C_6 lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alquenilo C_3-C_6 ramificado y alcoilo C_4-C_6 ramificado; y, si E es arilo, E puede estar conectado por un enlace amida;

e) si R_1 y al menos un grupo R_2 están presentes, R_1 puede estar conectado a un grupo R_2 mediante un enlace sencillo o doble para formar un ciclo de 5 a 7 miembros;

f) si dos grupos R_2 están presentes, pueden estar conectados mediante un enlace sencillo o doble para formar un ciclo de 4 a 7 miembros; y

g) si R_1 está presente y Z_1 o Z_2 es seleccionado del grupo que consiste en $-\text{NHR}_2$, $-\text{CH}_2\text{R}_2$ y $-\text{NR}_2\text{OH}$, R_1 puede estar entonces conectado al carbono o el nitrógeno de Z_1 o Z_2 mediante un enlace sencillo o doble para formar un ciclo de 4 a 7 miembros.

La creatina, el fosfato de creatina y muchos compuestos análogos de creatina e inhibidores competitivos son comercialmente asequibles. Además, pueden sintetizarse compuestos análogos de creatina usando técnicas convencionales. Por ejemplo, puede usarse creatina como material de partida para sintetizar al menos algunos de los compuestos análogos abarcados por la fórmula I. Pueden usarse reactivos de síntesis apropiados, por ejemplo, agentes alquilantes, alquenilantes o alquinilantes para fijar los respectivos grupos a sitios diana. Alternativamente, pueden usarse reactivos que permiten la inserción de grupos espaciadores, para alterar la estructura de la creatina. Los sitios que no son el sitio diana son protegidos usando grupos protectores convencionales mientras se dirigen los reactivos sintéticos a los sitios deseados.

Si el compuesto análogo de creatina contiene una estructura anular, puede ser entonces sintetizado de una manera análoga a la descrita para la ciclocreatina [T. Wang, *J. Org. Chem.* 39: 3.591-3.594 (1.974)]. Los otros diferentes grupos sustituyentes pueden ser introducidos antes o después de que se forme el anillo.

Muchos compuestos análogos de creatina han sido previamente sintetizados y descritos [Rowley *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 93: 5.542-5.551 (1.971); McLaughlin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 247: 4.382-4.388 (1.972); A. C. K. Nguyen, "Synthesis and enzyme studies using creatine analogs", Tesis, Departamento de Química Farmacéutica, Universidad de California, San Francisco, EE.UU. (1.983); Lowe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 225: 3.944-3.951 (1.980); Roberts *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260: 13.502-13.508 (1.985); Roberts *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 220: 563-571 (1.983); y Griffiths *et al.*, *J. Biol. Chem.* 251: 2.049-2.054 (1.976)]. Además de las referencias anteriormente mencionadas, Kaddurah-Daouk *et al.* (Documentos WO92/08456, WO90/09192, U.S. 5.324.731 y U.S. 5.321.030) también proporcionan citas para la síntesis de una pluralidad de compuestos análogos de creatina.

Los compuestos de creatina que actualmente están disponibles o han sido sintetizados incluyen, por ejemplo, creatina, ácido b-guanidinopropiónico, ácido guanidinoacético, sal disódica del fosfato de creatina, ciclocreatina, homociclocreatina, creatina fosfínica, homocreatina, etilcreatina, sal dilítica del fosfato de ciclocreatina y sal disódica del fosfato del ácido guanidinoacético, entre otros.

Los compuestos de fosfato de creatina pueden ser también sintetizados química o enzimáticamente. La síntesis química es bien conocida [T. M. Annesley y J. B. Walker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74: 185-190 (1.977); F. Cramer, E. Scheiffele y A. Vollmar, *Chem. Ber.* 95: 1.670-1.682 (1.962)].

Las sales de los productos pueden ser intercambiadas por otras sales usando protocolos estándares. En la síntesis enzimática se utiliza la enzima creatina cinasa, que es comercialmente asequible, para fosforilar los compuestos de creatina. La creatina cinasa requiere ATP para la fosforilación; por lo tanto, es necesario que sea continuamente repuesto para conducir la reacción hacia adelante. Es necesario acoplar la reacción de la creatina cinasa con otra reacción que genere ATP para conducirla hacia adelante. La pureza de los compuestos resultantes puede ser confirmada usando técnicas analíticas conocidas, incluyendo espectroscopía por resonancia magnética nuclear (NMR; del inglés,

nuclear magnetic resonance) de ^1H y de ^{13}C , cromatografía en capa fina, cromatografía de alta eficacia en fase líquida (HPLC; del inglés, high performance liquid chromatography) y análisis elemental.

Utilidad

5 En el presente invento, los compuestos de creatina pueden ser administrados a un individuo (por ejemplo, un mamífero), solos o en combinación con otro compuesto, para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso. Como agentes para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso, los compuestos de creatina pueden interferir en las funciones de la creatina cinasa/fofoscreatina para, de esta manera, prevenir, mejorar, detener o eliminar los efectos
10 directos y/o indirectos de la enfermedad que contribuyen a síntomas tales como paroplejía o deterioro de la memoria. Otros compuestos que pueden ser administrados junto con los compuestos de creatina incluyen neurotransmisores, agonistas o antagonistas de neurotransmisores, esteroides, corticoides (tales como prednisona y metilprednisona), agentes inmunomoduladores (tal como el beta-interferón), agentes inmunosupresores (tales como ciclofosfamida y azatioprina), compuestos análogos de nucleótidos, opioides endógenos y otros fármacos clínicamente utilizados en la actualidad. Cuando son coadministrados con compuestos de creatina, estos agentes pueden aumentar la interferencia
15 en las funciones celulares de la creatina cinasa/fofoscreatina, previniendo, reduciendo o eliminando por ello los efectos directos y/o indirectos de la enfermedad.

La creatina o los compuestos análogos de creatina pueden ser utilizados para reducir la gravedad de una enfermedad, reducir los síntomas de los episodios morbosos primarios, o prevenir o reducir la gravedad de los episodios
20 activos recurrentes. La creatina, el fosfato de creatina y compuestos análogos tales como la ciclocreatina y el fosfato de ciclocreatina pueden ser utilizados para tratar enfermedades progresivas. Muchos compuestos análogos de creatina pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, el tratamiento puede dar lugar a la reducción de los temblores en la enfermedad de Parkinson y de otros síntomas clínicos.

25 Modos de administración

El compuesto de creatina puede ser administrado solo o en combinación con otro compuesto análogo de creatina u otro agente al individuo afectado. Los compuestos de creatina pueden ser administrados, por ejemplo, como sales farmacéuticamente aceptables en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El compuesto puede ser administrado al sujeto a través de diversas vías que incluyen, pero no se limitan necesariamente a, por ejemplo, las vías de administración oral (dietética), transdérmica y parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, inyección intravenosa, bolo o infusión continua). Se administra al individuo una cantidad eficaz (es decir, una que es suficiente para producir el efecto deseado en un individuo) de una composición que comprende un compuesto análogo de creatina. La cantidad
30 real de fármaco que se va administrar dependerá de factores tales como el tamaño y la edad del individuo además de la gravedad de los síntomas, otros estados médicos y la finalidad deseada del tratamiento.

En estudios previos se han descrito la administración y la eficacia de los compuestos de creatina *in vivo*. Por ejemplo, se ha administrado fosfato de creatina a pacientes con enfermedades cardíacas mediante inyección intravenosa. Se administraron hasta 8 gramos/día sin efectos secundarios negativos. Se ha investigado la eficacia de compuestos análogos de sustratos de creatina cinasa seleccionados para mantener los niveles de ATP o retrasar la rigidez durante episodios isquémicos en el músculo. En un estudio, se alimentaron ratones, ratas y pollos con ciclocreatina y pareció que estos animales la toleraban bien. Se alimentaron pollos recién salidos del cascarón con una dieta que contenía ciclocreatina al 1%. En presencia de antibióticos, los pollos toleraban la ciclocreatina al 1% sin una mortalidad significativa aunque se desarrollaban más lentamente que los pollos testigo [G. R. Griffiths y J. B. Walker, *J. Biol. Chem.* 251 (7): 2.049-2.054 (1.976)]. En otro estudio, se alimentaron ratones con una dieta que contenía ciclocreatina al 1% durante 10 días [T. M. Annesley y J. B. Walker, *J. Biol. Chem.* 253 (22): 8.120-8.125 (1.978)]. Se han alimentado ratones con ciclocreatina en una cantidad de hasta el 1% de su dieta durante dos semanas o durante más de 4 semanas sin efectos negativos importantes [Lillie *et al.*, *Cancer Res.* 53: 3.172-3.178 (1.993)]. Se ha mostrado que la alimentación de animales con ciclocreatina (por ejemplo, 1% de la dieta) conduce a la acumulación de ciclocreatina en concentraciones mM en diferentes órganos. Por ejemplo, se comunicó que la ciclocreatina era incorporada por el músculo y el corazón y el cerebro de ratas que habían recibido una dieta con ciclocreatina al 1% [G. R. Griffiths y J. B. Walker, *J. Biol. Chem.* 251 (7): 2.049-2.054 (1.976)]. Como se mostró previamente, se observa actividad antiviral de la ciclocreatina tras la administración de ciclocreatina al 1% en la dieta. Muchos de los estudios anteriormente referidos indican que se ha mostrado que los compuestos análogos de creatina son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica.
55

El compuesto de creatina puede ser formulado de acuerdo con la vía seleccionada de administración (por ejemplo, polvo, tableta, cápsula, parche transdérmico, cápsula implantable, disolución o emulsión). Una composición apropiada
60 que comprenda un compuesto análogo de creatina puede ser preparada en un vehículo fisiológicamente aceptable. Por ejemplo, una composición en forma de tableta puede incluir uno o más aditivos tales como una carga (por ejemplo, lactosa), un agente aglutinante (por ejemplo, gelatina, carboximetilcelulosa o goma arábiga), un agente saboreador, un agente colorante o un material de revestimiento, según se desee. Para disoluciones o emulsiones en general, los vehículos pueden incluir disoluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, incluyendo disolución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales pueden incluir disolución de cloruro sódico, disolución de Ringer con dextrosa, dextrosa y cloruro sódico, disolución de Ringer con lactato, y aceites no volátiles. Además, los vehículos intravenosos pueden incluir sistemas reabastecedores de fluidos y nutrientes y sistemas reabastecedores de electrolitos, tales como los basados en disolución de Ringer con dextrosa. También pueden estar presentes conservan-

tes y otros aditivos. Por ejemplo, pueden añadirse agentes antimicrobianos, antioxidantes y quelantes y gases inertes (véase, en general, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Mack, redactor, 1.980).

5 Con el término "administración" se pretende incluir las vías de administración que permiten que los compuestos de creatina lleven a cabo su(s) prevista(s) función(es) de prevenir, mejorar, detener y/o eliminar la(s) enfermedad(es) del sistema nervioso en un sujeto. Los ejemplos de vías de administración que pueden ser utilizadas incluyen por inyección (subcutánea, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, etc.), oral, por inhalación, transdérmica y rectal. Dependiendo de la vía de administración, el compuesto similar a creatina puede ser revestido con, o en, un material para protegerlo de las condiciones naturales que pueden afectar perjudicialmente a su capacidad para llevar a cabo su
10 función prevista. La administración del compuesto similar a creatina se realiza con dosificaciones y durante períodos de tiempo eficaces para reducir, mejorar o eliminar los síntomas del trastorno del sistema nervioso. Los regímenes de dosificación pueden ser ajustados con el fin de mejorar la respuesta terapéutica o profiláctica del compuesto. Por ejemplo, pueden administrarse diariamente varias dosis divididas o puede reducirse proporcionalmente la dosis, según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

15 Además, los compuestos usados en el presente invento comprenden compuestos de creatina eficaces a la hora de atravesar la barrera hematoencefálica.

20 Los compuestos de creatina de este invento pueden ser administrados solos o como una mezcla de compuestos de creatina, o junto con un agente adyuvante u otro fármaco. Por ejemplo, los compuestos de creatina pueden ser coadministrados con otros diferentes restos reconocidos en la técnica, tales como nucleótidos, neurotransmisores, agonistas o antagonistas, esteroides, inmunomoduladores, inmunosupresores, vitaminas, endorfinas u otros fármacos que actúan sobre el sistema nervioso o el cerebro.

25 *Isoenzimas de creatina cinasa en el cerebro*

Las células requieren energía para sobrevivir y para llevar a cabo la multitud de tareas que caracterizan su actividad biológica. La exigencia y el suministro de energía celular están generalmente equilibrados y ajustadamente regulados para la economía y la eficacia del uso energético. La creatina cinasa desempeña un papel clave en el metabolismo
30 energético de las células con necesidades energéticas intermitentemente elevadas y fluctuantes, tales como las de los músculos esquelético y cardíaco, el cerebro y tejidos neurales, incluyendo, por ejemplo, la retina, los espermatozoides y los electrocitos. Como se afirmó anteriormente, la enzima cataliza la transferencia reversible del grupo fosforilo desde el fosfato de creatina al ADP para generar ATP. Hay múltiples isoformas de creatina cinasa (CK; del inglés, *creatine kinase*), que incluyen las isoformas muscular (CK-MM), cerebral (CK-BB) y mitocondrial (CK-Mia, CK-Mib).
35

Datos experimentales sugieren que la CK está situada cerca de los sitios celulares en que se produce la generación de energía; por ejemplo, donde tiene lugar la generación de fuerza por proteínas motoras, cerca de las bombas iónicas y los transportadores de las membranas y donde tienen lugar otros procesos dependientes de ATP. Parece que desempeña
40 un complejo papel de múltiples facetas en la homeostasis de la energía celular. El sistema de la creatina cinasa está implicado en actividades de tamponamiento de energía/transporte de energía. También está implicado en la regulación intracelular de los niveles de ADP y ATP, así como en las relaciones de ADP/ATP. El tamponamiento de protones y la producción de fosfato inorgánico son partes importantes del sistema.

45 En el cerebro, este sistema de creatina cinasa es bastante activo. En estudios en que se usó una electroforesis de isoenzimas nativas y en mediciones enzimáticas de actividad CK en extractos tisulares o células cerebrales en cultivo, se han comunicado variaciones regionales de actividad CK con niveles comparablemente elevados en el cerebelo [Chandler *et al.*, *Stroke* 19: 251-255 (1.988); Maker *et al.*, *Exp. Neurol.* 38: 295-300; Manos *et al.*, *J. Neurol. Chem.* 56: 2.101-2.107 (1.991)]. En particular, la capa molecular del córtex cerebeloso contiene niveles elevados de actividad CK [Maker *et al.*, *ídem* (1.973); Kahn, *Histochem.* 48: 29-32 (1.976)], lo que es consistente con los recientes hallazgos, por ³¹P-NMR, que indican que la materia gris muestra un mayor flujo a través de la reacción de CK y unas mayores concentraciones de fosfato de creatina en comparación con la materia blanca [Cadoux-Hudson *et al.*, *FASEB J.* 3: 2.660-2.666 (1.989)], pero también se mostraron niveles elevados de actividad CK en oligodendrocitos en cultivo [Manos *et al.*, *ídem* (1.991); Molloy *et al.*, *J. Neurochem.* 59: 1.925-1.932 (1.992), células gliales típicas de la materia
55 blanca. La isoenzima CK cerebral CK-BB es la principal isoforma hallada en el cerebro. Se hallan cantidades menores de creatina cinasa muscular (CK-MM) y creatina cinasa mitocondrial (CK-Mi).

Localización y función de isoenzimas CK en diferentes células del sistema nervioso

60 La CK cerebral (CK-BB) se halla en todas las capas del córtex cerebeloso así como en los núcleos más profundos del cerebelo. Es muy abundante en las células gliales de Bergmann (BGC; del inglés, *Bergmann glial cells*) y en las células astrogliales, pero también se halla en las células en cesta y las neuronas de los núcleos más profundos [Hemmer *et al.*, *Eur. J. Neuroscience* 6: 538-549 (1.994); Hemmer *et al.*, *Dev. Neuroscience* 15: 3-5 (1.993)]. La BCG es un tipo especializado de célula astrogliar. Proporciona la vía migratoria para la migración de las células granulares desde la
65 capa externa a la capa interna de células granulares durante el desarrollo del cerebelo. Otra función importante de estas células es el propuesto tamponamiento espacial, dependiente de ATP, de los iones potasio liberados durante la actividad eléctrica de las neuronas [Newman *et al.*, *Trends Neuroscience* 8: 156-159 (1.985); Reichenbach, *Acad. Sci. New York* (1.991), páginas 272-286]. Por lo tanto, parece que la CK-BB proporciona energía (ATP) para la migración

así como tamponamiento de K^+ a través de la regulación de la ATPasa Na^+/K^+ . La presencia de CK-BB en astrocitos (Manos *et al.*, ídem, 1.991; Hemmer *et al.*, ídem, 1.994; Hemmer *et al.*, ídem, 1.993) puede estar relacionada con las necesidades energéticas de estas células para las interacciones metabólicas con neuronas; por ejemplo, metabolito del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y tráfico de neurotransmisores [Hertz, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70: 5.145-5.157 (1.991)].

Las neuronas de Purkinje del cerebelo desempeñan un papel muy importante en la función cerebral. Reciben la entrada excitante de las fibras paralelas y las fibras trepadoras y representan las únicas estructuras de salida neuronal del córtex cerebeloso. Se piensa que las despolarizaciones mediadas por calcio en las dendritas de las células de Purkinje desempeñan un papel central en el mecanismo del aprendizaje motor cerebeloso [Ito, *Corr. Opin. Neurobiol.* 1: 616-620 (1.991)]. Se hallaron niveles elevados de CK muscular (CK-MM) en neuronas de Purkinje (Hemmer *et al.*, ídem, 1.994; Hemmer *et al.*, ídem, 1.993). Hay una acusada evidencia que apoya el hecho de que CK-MM está directa o indirectamente ligada a procesos energéticos necesarios para la homeostasis del Ca^{++} o a procesos celulares desencadenados por este segundo mensajero.

Las estructuras glomerulares del cerebelo contienen niveles elevados de CK-BB y CK mitocondrial (CK-Mi). Se necesitan grandes cantidades de energía en estas estructuras para el restablecimiento de los gradientes de ion potasio parcialmente rotos durante la excitación neuronal, así como para el tráfico metabólico y de neurotransmisores entre las células gliales y las neuronas (Hertz *et al.*, ídem, 1.991). La presencia de CK en estas estructuras puede ser una indicación de que parte de la energía consumida en estos complejos gigantes podría estar soportada por el sistema de la creatina cinasa.

En las neuronas, la CK-BB se halla en asociación con vesículas sinápticas [Friedhoff y Lerner, *Life Sci.* 20: 867-872 (1.977)] así como con membranas plasmáticas [Lim *et al.*, *J. Neurochem.* 41: 1.177-1.182 (1.983)].

Hay cierta evidencia que sugiere que la CK que está unida a vesículas sinápticas y a la membrana plasmática de las neuronas puede estar implicada en la liberación de neurotransmisores así como en el mantenimiento de los potenciales de membrana y el restablecimiento de gradientes iónicos antes y después de la estimulación. Esto es coherente con el hecho de que se han hallado una reposición de alta energía y unas concentraciones de CK concomitantemente elevadas en las regiones del cerebro que son ricas en conexiones sinápticas, por ejemplo, en la capa molecular del cerebelo, en las estructuras glomerulares de la capa granular y también en el hipocampo. La observación de que la elevación de los niveles de CK observada en una fracción del cerebro que contiene terminaciones nerviosas y sinapsis está relacionada con el aumento neonatal de ATPasa Na^+/K^+ sugiere también que los niveles superiores de fosfatos de creatina y CK son característicos de regiones en que los gastos energéticos para procesos tales como el bombeo iónico son grandes [Erecinska y Silver, *J. Cerebr. Blood Flow and Metabolism* 9: 2-19 (1.989)]. Además, la fosforilación proteica que desempeña un papel importante en la función del cerebro es también a través del consumo de una fracción considerable de la energía total disponible en esas células (Erecinska y Silver, ídem, 1.989). Finalmente, la CK, junto con la enolasa específica de células nerviosas, pertenece a un grupo de proteínas conocidas como componente lento b (SCb; del inglés, *slow component b*). Estas proteínas son sintetizadas en el cuerpo de las células neuronales y son dirigidas a las extremidades axonales por transporte axonal [Brady y Lasek, *Cell* 23: 515-523 (1.981); Oblinger *et al.*, *J. Neurol.* 7: 433-462 (1.987)]. La cuestión de si la CK participa en la energética real del transporte axonal permanece sin respuesta.

En conclusión, el sistema de la CK desempeña un papel esencial en la energética del cerebro adulto. Esto se apoya en las mediciones de transferencia de magnetización por ^{31}P -NMR que muestran que la constante de velocidad de pseudoprimer orden de la reacción de la CK en la dirección de la síntesis de ATP así como el flujo de CK se correlacionan con la actividad cerebral que se mide por un electroencefalograma así como por la cantidad de desoxiglucosa-fosfato formada en el cerebro después de la administración de desoxiglucosa. Los presentes inventores han descubierto que pueden tratarse enfermedades del sistema nervioso al modular la actividad de la vía de creatina cinasa/fosfato de creatina.

El papel de la creatina cinasa en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso

Los mecanismos mediante los cuales los metabolitos de las células nerviosas se dirigen normalmente a las tareas celulares específicas apenas son entendidos. Se piensa que las células nerviosas, como otras células, regulan la velocidad de producción de energía en respuesta a una demanda. El sistema de la creatina cinasa es activo en muchas células del sistema nervioso y se piensa que desempeña un papel en la asignación de fosfato de alta energía a muchos procesos neurológicos diferentes, tales como la biosíntesis de neurotransmisores, el flujo de electrolitos y la comunicación sináptica. La función neurológica requiere una energía significativa y parece que la creatina cinasa desempeña un papel importante en cuanto a controlar el flujo de energía dentro de células excitables especializadas tales como las neuronas. La inducción de creatina cinasa, la isozima BB y la creatina cinasa mitocondrial de cerebro en particular, da lugar a la generación de un estado de alta energía que podría mantener o multiplicar el proceso patológico en enfermedades del sistema nervioso. La inducción de creatina cinasa también causa la liberación de reservas de energía celular anormalmente elevadas que parecen estar asociadas con ciertas enfermedades del sistema nervioso. Por el contrario, la supresión del sistema de la creatina cinasa, o anomalías en él, inducen un estado de baja energía que podría dar lugar o ayudar a la muerte en el proceso de todo el sistema nervioso.

Los componentes del sistema de creatina cinasa/fosfocreatina incluyen la enzima creatina cinasa, los sustratos creatina y fosfato de creatina, y el transportador de creatina. Algunas de las funciones asociadas con este sistema

incluyen la regeneración eficaz de energía en células con una exigencia energética fluctuante y elevada, la actividad de transferencia de fosforilos, la regulación del transporte iónico, la asociación citoesquelética, la conservación de reservas de nucleótidos, el tamponamiento de protones y la implicación en vías de transducción de señales. Se ha mostrado que el sistema de creatina cinasa/fosfocreatina es activo en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann. Se ha mostrado que la actividad de la enzima está suprarregulada durante la regeneración e infrarregulada en estados degenerativos, y es anormal en enfermedades mitocondriales.

Se piensa que muchas enfermedades del sistema nervioso están asociadas con anomalías de un estado energético que podrían dar lugar a una liberación de neurotransmisores y un transporte iónico desequilibrados y dar lugar a la muerte celular. Se ha comunicado que defectos en enzimas mitocondriales de la respiración y enzimas glicolíticas pueden causar el deterioro de la función celular.

Sin pretender un respaldo teórico, se piensa que si la inducción o inhibición de la creatina cinasa es una causa o una consecuencia de una enfermedad, la modulación de su actividad puede bloquear la enfermedad. La modulación de su actividad modularía el flujo de energía y afectaría a la función celular. Alternativamente, otra posibilidad es que la actividad creatina cinasa genere un producto que afecte a la función neurológica. Por ejemplo, el fosfato de creatina puede ceder un fosfato a una proteína para modificar su función (por ejemplo, su actividad o su situación). Si la fosfocreatina es dicho dador de fosfato, los compuestos análogos de creatina que son fosforilables o los compuestos análogos de fosfocreatina pueden inhibir competitivamente la interacción de la fosfocreatina con una proteína diana, interfiriendo directa o indirectamente de ese modo en funciones del sistema nervioso. Alternativamente, los compuestos análogos de creatina fosforilables con un potencial de transferencia de grupos fosforilo alterado pueden inmovilizar los depósitos de fosfato y evitar así la transferencia eficaz de fosfato a las dianas. Una enfermedad neurológica podría estar asociada con la infrarregulación de la actividad creatina cinasa. En tales casos, el reabastecimiento de los sustratos, por ejemplo, creatina, fosfato de creatina o un compuesto análogo de sustrato, que pudieran mantener la producción de ATP durante un periodo prolongado de tiempo, con otros activadores de la enzima podría ser beneficioso para el tratamiento de la enfermedad.

Se ha mostrado que la ingestión de compuestos análogos de creatina da lugar a la reposición de las reservas de fosfocreatina tisulares por fosfágenos sintéticos con diferentes propiedades cinéticas y termodinámicas. Esto da lugar a cambios sutiles del metabolismo energético intracelular, incluyendo el aumento de las reservas totales de fosfato de alta energía [véase la referencia J. J. Roberts y J. B. Walker, *Arch. Biochem. Biophys.* 220 (2): 563-571 (1.983)]. La reposición de las reservas de fosfocreatina con fosfágenos sintéticos de acción más lenta, tales como compuestos análogos de creatina, podría mejorar los trastornos neurológicos al proporcionar una fuente de energía de mayor duración. Uno de dichos compuestos análogos, la ciclocreatina (1-carboximetil-2-iminoimidazolidina), modifica el flujo de energía de las células bajo esfuerzo y puede interferir en la utilización de ATP en sitios de actividad celular.

Se desconoce la patogenia de la muerte de la célula nerviosa en enfermedades neurodegenerativas. Una cantidad significativa de datos ha apoyado la hipótesis de que un deterioro del metabolismo energético puede ser la base de la muerte neuronal excitotóxica lenta. Varios estudios han demostrado defectos mitocondriales u oxidativos en las enfermedades neurodegenerativas. Un metabolismo energético alterado da lugar a disminuciones de los depósitos de fosfato de alta energía y a un deterioro del potencial de membrana. Bajo estas condiciones, se libera el bloqueo, sensible al voltaje, de los receptores de NMDA por Mg^{2+} , lo que permite que los receptores resulten continuamente activados por las concentraciones endógenas de glutamato. De esta manera, defectos metabólicos relacionados con la energía pueden conducir a la muerte neuronal por un mecanismo excitotóxico lento. Estudios recientes indican que dicho mecanismo se produce *in vivo* y puede desempeñar un papel en los modelos animales de la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson.

Como se discutió anteriormente con detalle, el sistema energético de creatina cinasa/fosfato de creatina es sólo un componente de un complejo sistema generador de energía hallado en el sistema nervioso. La reacción catalizada por este sistema da lugar a la rápida regeneración de energía en forma de ATP en sitios de actividad celular. En las mitocondrias, la enzima está ligada a la vía de la fosforilación oxidativa, que ha sido implicada en enfermedades del sistema nervioso. Allí, la enzima actúa en la dirección inversa para almacenar energía en forma de fosfato de creatina.

El invento es adicionalmente ilustrado mediante los ejemplos siguientes, los cuales demuestran que los compuestos de creatina, representados por la propia creatina y el compuesto análogo ciclocreatina, son agentes neuroprotectores en modelos animales usados para enfermedades neurodegenerativas, específicamente la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson.

Ejemplos

Ejemplo 1

Malonato como modelo de la enfermedad de Huntington

Se ha usado una serie de inhibidores reversibles e irreversibles de enzimas implicadas en vías generadoras de energía, para generar modelos animales para enfermedades neurodegenerativas tales como las enfermedades de Parkinson y Huntington.

Se han utilizado exitosamente inhibidores de la enzima succinato deshidrogenasa que afectan al estado energético celular, para generar un modelo para la enfermedad de Huntington [Brouillet *et al.*, *J. Neurochem.* 60: 356-359 (1.993); Beal *et al.*, *J. Neurosci.* 13: 4.181-4.192 (1.993); Henshaw *et al.*, *Brain Research* 647: 161-166 (1.994); Beal *et al.*, *J. Neurochem.* 61: 1.147-1.150 (1.993)]. La enzima succinato deshidrogenasa desempeña un papel central tanto en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos como en la cadena de transporte electrónico de las mitocondrias. El malonato, su inhibidor reversible, ha sido recientemente evaluado en animales. Se ha mostrado que inyecciones intraestriatales de malonato a ratas producen lesiones excitotóxicas estriatales dependientes de la dosis que son atenuadas por antagonistas de NMDA tanto competitivos como no competitivos [Henshaw *et al.*, *Brain Research* 647: 161-166 (1.994)]. Además, la lamotrigina, un inhibidor de la liberación de glutamato, también atenúa las lesiones. La coinyección con succinato bloquea las lesiones, lo que es coherente con un efecto sobre la succinato deshidrogenasa. Las lesiones van acompañadas de una significativa reducción de los niveles de ATP así como de un significativo aumento de los niveles de lactato *in vivo*, como se muestra mediante el análisis de imágenes de resonancia por desplazamiento químico [Beal *et al.*, *J. Neurochem.* 61: 1.147-1.150 (1.993)]. Aún más, los aumentos de lactato son mayores en los animales más viejos, lo que es coherente con que las lesiones dependan acusadamente de la edad. Estudios histológicos han mostrado que la lesión preserva las neuronas positivas para NADPH-diaforasa. También se preservaron las concentraciones de somatostatina. Análisis de lesiones por imágenes de resonancia magnética *in vivo* muestran una significativa correlación entre el tamaño creciente de la lesión y la producción de lactato.

Una serie de experimentos demostró que la administración de coenzima Q₁₀ o nicotinamida producía una protección, dependiente de la dosis, frente a las lesiones en el modelo animal del malonato. Estos compuestos atenuaban los agotamientos de ATP producidos por el malonato *in vivo*. Aún más, la coadministración de coenzima Q₁₀ con nicotinamida atenuaba las lesiones y reducía los aumentos de lactato que tenían lugar después de las inyecciones intraestriatales de malonato.

Todos los estudios anteriormente mencionados apoyan al malonato como un modelo útil para las características neuropatológicas y neuroquímicas de la enfermedad de Huntington. Estas lesiones producían el mismo patrón de preservación celular que se ve en la enfermedad de Huntington. Hay un agotamiento de neuronas espinosas estriatales pero una preservación relativa de las interneuronas que expresan NADPH diaforasa. Además, hay un aumento de concentraciones de lactato que ha sido observado en la enfermedad de Huntington.

Se evaluó el efecto de la creatina y de la ciclocreatina, su compuesto análogo, como compuestos de creatina representativos en este modelo del malonato para la enfermedad de Huntington. Ambos compuestos se administraron oralmente en una cantidad del 1% de la dieta. Este modo de administración se basaba en estudios previos en que se había demostrado una acumulación significativa de compuestos en órganos con elevada actividad creatina cinasa, tales como el músculo y el cerebro, y en que se había mostrado que la ciclocreatina al 1% en la dieta inhibía el desarrollo tumoral y la replicación vírica [Lillie *et al.*, *Cancer Research* 53: 3.172-3.178 (1.993); [Lillie *et al.*, *Antiviral Research* 23: 203-218 (1.994)].

En este experimento se usaron machos de rata Sprague-Dawley (Charles River, Wilmington, Massachusetts, EE.UU.) que pesaban aproximadamente 300 g. Los animales fueron divididos en tres grupos: 7 se usaron como testigos, 8 se trataron con creatina y 8 se trataron con ciclocreatina. El grupo uno fue alimentado con pienso normal, mientras que los otros grupos recibieron pienso enriquecido con creatina o ciclocreatina al 1%. Los compuestos fueron administrados durante dos semanas antes de la administración del malonato y luego durante una semana más antes del sacrificio. Se disolvió el malonato en agua desionizada destilada y se ajustó el pH a 7,4 con HCl 0,1 M. Se realizaron inyecciones intraestriatales de 1,5 μ l, que contenían 3 micromoles de malonato, en el cuerpo estriado a nivel del bregma, 2,4 mm laterales con respecto a la línea media y 4,5 mm ventrales con respecto a la duramadre. Los animales fueron sacrificados a los 7 días por decapitación, y los cerebros fueron rápidamente extirpados y colocados en disolución salina fría al 0,9%. Los cerebros fueron seccionados en intervalos de 2 mm en un molde para cerebros. Los cortes fueron luego colocados con el lado posterior hacia abajo en cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 2%. Los cortes fueron teñidos en la oscuridad a temperatura ambiental durante 30 minutos y fueron luego retirados y colocados en paraformaldehído al 4%, pH de 7,3. Las lesiones, indicadas por una tinción pálida, fueron evaluadas en la superficie posterior de cada sección por un histólogo experimentado que desconocía las condiciones experimentales, usando un sistema Bioquant 4. Estas mediciones fueron validadas por comparación con mediciones obtenidas en secciones adyacentes con tinción de Nissl, para demostrar la validez del método. Los datos se expresan como las medias +/- el error estándar de las medias. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante un test t de Student con datos no apareados o mediante un análisis de varianza de un factor con el test de diferencia mínima significativa protegida (PLSD; del inglés, *protected least significant difference*) de Fisher. Como se muestra en la Figura 1, el tratamiento de los animales con creatina produjo un significativo efecto neuroprotector frente a la inyección intraestriatal de malonato. La ciclocreatina también produjo cierto efecto neuroprotector. Estos resultados implican a la enzima creatina cinasa en vías que afectan a la muerte de las células neuronales, y sustentan el beneficio terapéutico de los compuestos de creatina en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y encefalopatías mitocondriales. Existe una evidencia sustancial en cuanto a la mejora del metabolismo energético mitocondrial en diversas enfermedades neurodegenerativas. Esto es particularmente cierto en el caso de la enfermedad de Huntington. Las presentes lesiones se ajustan a la enfermedad de Huntington bastante bien, por lo que los resultados indican que los compuestos de creatina son útiles para lentificar el proceso degenerativo en esta enfermedad. También se espera que otras enfermedades neurodegenerativas de las que se ha mostrado que tienen defectos subyacentes en la generación de energía resulten lentificadas por compuestos de creatina.

Ejemplo 2

MPTP como un modelo para la enfermedad de Parkinson

5 La MPTP, o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, es una neurotoxina que produce un síndrome parkinsoniano tanto en el hombre como en animales experimentales. El informe inicial lo realizó un químico que estaba sintetizando y autoinyectándose un compuesto análogo de opiáceo. Involuntariamente, sintetizó MPTP y desarrolló un parkinsonismo profundo. Estudios patológicos subsiguientes mostraron una degeneración grave de la pars compacta de la sustancia nigra. Posteriormente se produjo una gran brote en California. Estos pacientes desarrollaron síntomas típicos del parkinsonismo. También se les realizó una tomografía por emisiones de positrones que mostró una pérdida acusada de inervación dopaminérgica del cuerpo estriado.

Estudios del mecanismo de la neurotoxicidad de la MPTP muestran que está implicada en la generación de un metabolito importante, el MPP⁺. Este metabolito se forma por la actividad de la monoamino oxidasa sobre la MPTP. Inhibidores de la monoamino oxidasa bloquean la neurotoxicidad de la MPTP tanto en ratones como en primates. Parece que la especificidad de los efectos neurotóxicos del MPP⁺ sobre las neuronas dopaminérgicas se debe a la incorporación de MPP⁺ por el transportador sináptico de dopamina. Bloqueadores de este transportador evitan la neurotoxicidad del MPP⁺. Se ha mostrado que el MPP⁺ es un inhibidor relativamente específico de la actividad del complejo I mitocondrial. Se une al complejo I en el sitio de unión de la rotenona. Estudios *in vitro* muestran que produce un deterioro de la fosforilación oxidativa. Estudios *in vivo* han mostrado que la MPTP puede agotar las concentraciones estriatales de ATP en ratones. Se ha demostrado que el MPP⁺ administrado intraestriatalmente a ratas produce un agotamiento significativo de ATP así como aumentos de lactato limitados al cuerpo estriado en el sitio de las inyecciones. Los presentes inventores han demostrado recientemente que la coenzima Q₁₀, que potencia la producción de ATP, puede proteger significativamente frente a la toxicidad de la MPTP en ratones.

Usando este modelo se evaluó el efecto de dos compuestos de creatina representativos, la creatina y la ciclocreatina. Se administraron creatina y ciclocreatina como una formulación al 1% en el pienso de los animales, y se administraron durante tres semanas antes del tratamiento con MPTP. La MPTP fue administrada intraperitonealmente en una dosis de 15 mg/kg cada 2 horas, para un total de cinco inyecciones. Los animales continuaron luego durante 1 semana con sus dietas complementadas con creatina o ciclocreatina, antes de su sacrificio. Los ratones examinados eran machos de ratón Swiss Webster que pesaban 30-35 gramos, obtenidos de Taconic Farms. Los grupos testigo recibieron disolución salina normal o hidrocloreuro de MPTP solo. La MPTP fue administrada en 0,1 ml de agua. La MPTP fue obtenida de Research Biochemicals. Se examinaron de ocho a doce animales en cada grupo. Después del sacrificio, los dos cuerpos estriados fueron rápidamente disecados y colocados en ácido perclórico 0,1 M enfriado. Se sometió posteriormente el tejido a sonicación y se tomaron partes alícuotas para la cuantificación de proteínas usando un ensayo fluorimétrico. Se cuantificaron la dopamina, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA) por HPLC usando detección electroquímica con 16 electrodos. Las concentraciones de dopamina y de metabolitos se expresaron en forma de nanomoles/mg de proteína. La significación estadística de las diferencias fue determinada por ANOVA de un factor seguida de un test post hoc PLSD de Fisher para comparar las medias de los grupos.

Los resultados se muestran en la Figura 2. La administración oral de ciclocreatina o creatina protegía significativamente frente a los agotamientos de DOPAC inducidos por MPTP. La ciclocreatina era eficaz frente a los agotamientos de ácido homovanílico inducidos por MPTP. Tanto la administración de creatina como la de ciclocreatina producían una neuroprotección significativa frente a los agotamientos de dopamina inducidos por MPTP. El efecto neuroprotector producido por la ciclocreatina era superior al visto con creatina sola.

Estos resultados indican que la administración de creatina o ciclocreatina pueden producir efectos neuroprotectores significativos frente a la toxicidad dopaminérgica inducida por MPTP. Estos resultados dan a entender que estos compuestos son útiles para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Los datos establecen además la importancia del sistema de la creatina cinasa para el tamponamiento de la energía y la supervivencia del tejido neuronal. Por lo tanto, los compuestos de creatina que pueden mantener la producción de energía en las neuronas van a surgir como una nueva clase de agentes protectores terapéuticamente beneficiosos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en que se ha demostrado un deterioro de la energía.

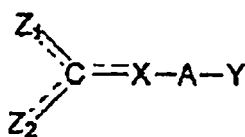
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de creatina de fórmula general:



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, fórmula en que:

a) Y es seleccionado del grupo que consiste en: $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NHOH}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{NHSO}_2\text{J}$ y $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{OJ})$, en que J es seleccionado del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo C_1-C_6 de cadena lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alquenilo C_2-C_6 , alquenilo C_3-C_6 ramificado, y arilo;

b) A es seleccionado del grupo que consiste en: C, CH, alquilo C_1-C_5 , alquenilo C_2-C_5 , alquinilo C_2-C_5 , y cadenas alcoilo C_1-C_5 , teniendo cada uno 0-2 sustituyentes que son independientemente seleccionados del grupo que consiste en:

1) K, en que K es seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1-C_6 lineal, alquenilo C_2-C_6 lineal, alcoilo C_1-C_6 lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alquenilo C_3-C_6 ramificado y alcoilo C_4-C_6 ramificado, teniendo K 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

2) un grupo arilo seleccionado del grupo que consiste en: un carbociclo de 1-2 anillos y un heterociclo de 1-2 anillos, grupo arilo que contiene 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{L}$ y $-\text{COCH}_2\text{L}$ en que L es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi; y

3) $-\text{NH}-\text{M}$, en que M es seleccionado del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_2-C_4 , alcoilo C_1-C_4 , alquilo C_3-C_4 ramificado, alquenilo C_3-C_4 ramificado y alcoilo C_4 ramificado;

c) X es seleccionado del grupo que consiste en NR_1 , CHR_1 , CR_1 , O y S, en que R_1 es seleccionado del grupo que consiste en:

1) hidrógeno;

2) K, en que K es seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1-C_6 lineal, alquenilo C_2-C_6 lineal, alcoilo C_1-C_6 lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alquenilo C_3-C_6 ramificado y alcoilo C_4-C_6 ramificado, teniendo K 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

3) un grupo arilo seleccionado del grupo que consiste en: un carbociclo de 1-2 anillos y un heterociclo de 1-2 anillos, grupo arilo que contiene 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{L}$ y $-\text{COCH}_2\text{L}$ en que L es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

4) un ácido α -amino-w-metil-w-adenosilcarboxílico C_5-C_9 , unido a través del carbono w-metilico;

5) un ácido α -amino-w-aza-w-metil-w-adenosilcarboxílico C_5-C_9 , unido a través del carbono w-metilico; y

6) un ácido α -amino-w-tia-w-metil-w-adenosilcarboxílico C_5-C_9 , unido a través del carbono w-metilico;

d) Z_1 y Z_2 son independientemente escogidos del grupo que consiste en: $=\text{O}$, $-\text{NHR}_2$, $-\text{CH}_2\text{R}_2$, y $-\text{NR}_2\text{OH}$; en que Z_1 y Z_2 no pueden ser $=\text{O}$ a la vez y en que R_2 es seleccionado del grupo que consiste en:

1) hidrógeno;

2) K, en que K es seleccionado del grupo que consiste en: alquilo C_1-C_6 lineal, alquenilo C_2-C_6 lineal, alcoilo C_1-C_6 lineal, alquilo C_3-C_6 ramificado, alquenilo C_3-C_6 ramificado y alcoilo C_4-C_6 ramificado, teniendo K 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

3) un grupo arilo seleccionado del grupo que consiste en: un carbociclo de 1-2 anillos y un heterociclo de 1-2 anillos, grupo arilo que contiene 0-2 sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que

ES 2 268 696 T3

consiste en: $-\text{CH}_2\text{L}$ y $-\text{COCH}_2\text{L}$ en que L es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: bromo, cloro, epoxi y acetoxi;

4) un ácido α -amino-carboxílico $\text{C}_4\text{-C}_8$, unido a través del carbono w;

5) B, en que B es seleccionado del grupo que consiste en: $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NHOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NO}_2$, $\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})(\text{OJ})$ y $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{OJ})$, en que J es seleccionado del grupo que consiste en: hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal, alquilo $\text{C}_3\text{-C}_6$ ramificado, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_6$, alqueno $\text{C}_3\text{-C}_6$ ramificado, y arilo, en que B está opcionalmente conectado con el nitrógeno a través de un conector seleccionado del grupo que consiste en: alquilo $\text{C}_1\text{-C}_2$, alqueno C_2 , y alcoilo $\text{C}_1\text{-C}_2$;

6) -D-E, en que D es seleccionado del grupo que consiste en: alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$ lineal, alquilo C_3 ramificado, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_3$ lineal, alqueno C_3 ramificado, alcoilo $\text{C}_1\text{-C}_3$ lineal, arilo y aroilo; y E es seleccionado del grupo que consiste en: $-(\text{PO}_3)_n\text{NMP}$, en que n es 0-2 y NMP es un ribonucleótido-monofosfato conectado a través del 5'-fosfato, el 3'-fosfato o el anillo aromático de la base; $-\text{[P}(=\text{O})(\text{OCH}_3)(\text{O})]_m\text{-Q}$, en que m es 0-3 y Q es un ribonucleosido conectado a través de la ribosa o el anillo aromático de la base; $-\text{[P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{CH}_2)]_m\text{-Q}$, en que m es 0-3 y Q es un ribonucleosido conectado a través de la ribosa o el anillo aromático de la base; y un grupo arilo que contiene 0-3 sustituyentes elegidos independientemente del grupo que consiste en: Cl, Br, epoxi, acetoxi, $-\text{OG}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{G}$ y $-\text{CO}_2\text{G}$, en que G es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_6$ lineal, alcoilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal, alquilo $\text{C}_3\text{-C}_6$ ramificado, alqueno $\text{C}_3\text{-C}_6$ ramificado y alcoilo $\text{C}_4\text{-C}_6$ ramificado; en que E puede estar unido a D por cualquier punto, y, si D es alquilo o alqueno, D puede estar conectado en cualquier extremo o en ambos extremos mediante un enlace amida; y

7) -E, en que E es seleccionado del grupo que consiste en: $-(\text{PO}_3)_n\text{NMP}$, en que n es 0-2 y NMP es un ribonucleótido-monofosfato conectado a través del 5'-fosfato, el 3'-fosfato o el anillo aromático de la base; $-\text{[P}(=\text{O})(\text{OCH}_3)(\text{O})]_m\text{-Q}$, en que m es 0-3 y Q es un ribonucleosido conectado a través de la ribosa o el anillo aromático de la base; $-\text{[P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{CH}_2)]_m\text{-Q}$, en que m es 0-3 y Q es un ribonucleosido conectado a través de la ribosa o el anillo aromático de la base; y un grupo arilo que contiene 0-3 sustituyentes elegidos independientemente del grupo que consiste en: Cl, Br, epoxi, acetoxi, $-\text{OG}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{G}$ y $-\text{CO}_2\text{G}$, en que G es independientemente seleccionado del grupo que consiste en: alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_6$ lineal, alcoilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal, alquilo $\text{C}_3\text{-C}_6$ ramificado, alqueno $\text{C}_3\text{-C}_6$ ramificado y alcoilo $\text{C}_4\text{-C}_6$ ramificado; y, si E es arilo, E puede estar conectado por un enlace amida;

e) si R_1 y al menos un grupo R_2 están presentes, R_1 puede estar conectado a un grupo R_2 mediante un enlace sencillo o doble para formar un ciclo de 5 a 7 miembros;

f) si dos grupos R_2 están presentes, pueden estar conectados mediante un enlace sencillo o doble para formar un ciclo de 4 a 7 miembros; y

g) si R_1 está presente y Z_1 o Z_2 es seleccionado del grupo que consiste en $-\text{NHR}_2$, $-\text{CH}_2\text{R}_2$ y $-\text{NR}_2\text{OH}$, R_1 puede estar entonces conectado al carbono o el nitrógeno de Z_1 o Z_2 mediante un enlace sencillo o doble para formar un ciclo de 4 a 7 miembros;

en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de, o para la prevención de la aparición de, o para el tratamiento de los síntomas asociados con, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica.

2. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 1, de un compuesto seleccionado entre creatina y ciclocreatina.

3. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, para la fabricación de un medicamento para uso en un tratamiento que comprende coadministrar un neurotransmisor, un compuesto análogo de neurotransmisor, un esteroide, un agente inmunomodulador o un agente inmunosupresor.

4. Un uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero.

5. Un uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un ser humano.

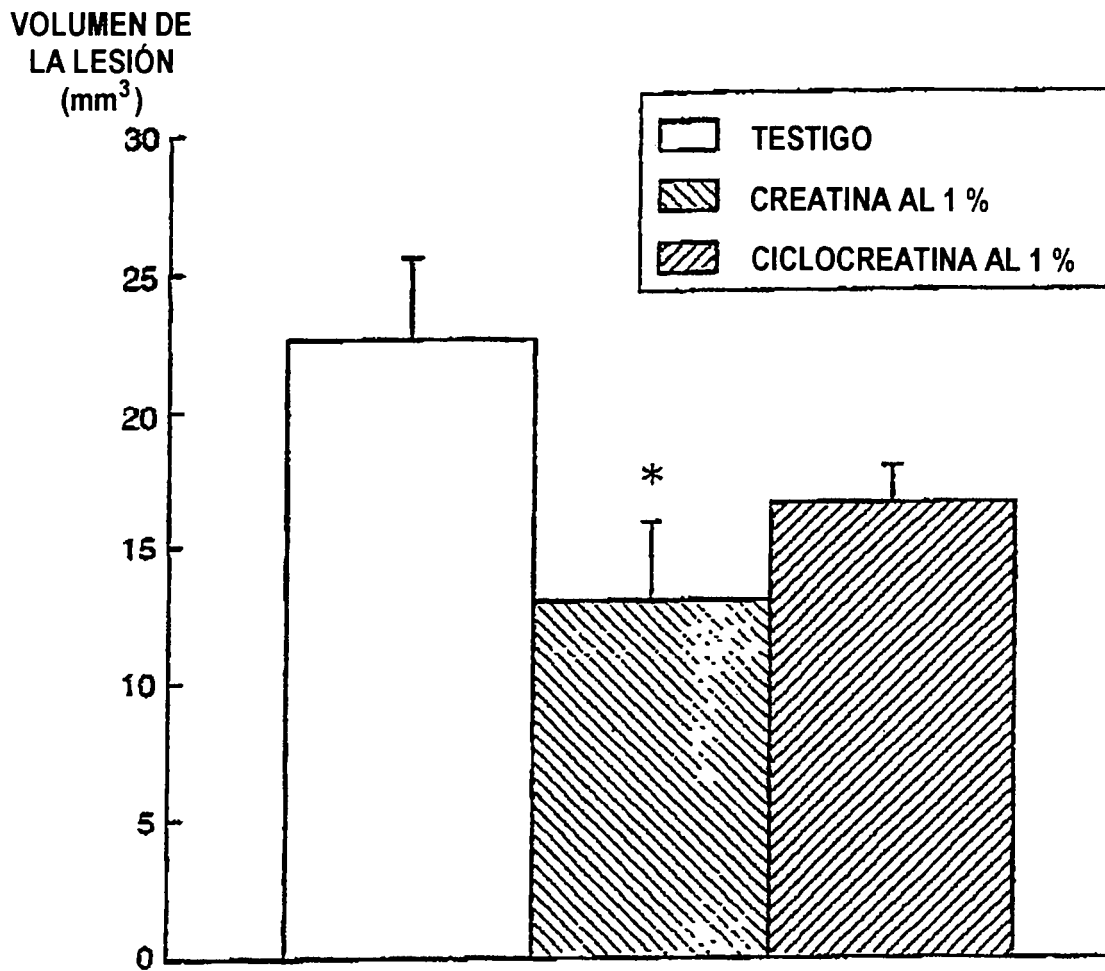


FIG. 1

