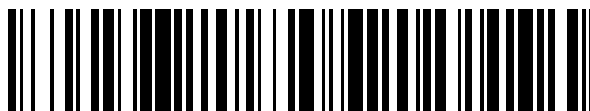


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 872**

51 Int. Cl.:

A61K 31/138 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 31/137 (2006.01)
A61K 31/185 (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/42 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2013** **PCT/EP2013/054024**
87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013** **WO13127917**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2013** **E 13706548 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017** **EP 2819664**

54 Título: **Nuevas composiciones para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica**

30 Prioridad:

01.03.2012 WO PCT/EP2012/053565
01.03.2012 WO PCT/EP2012/053570

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.10.2017

73 Titular/es:

PHARNEXT (100.0%)
11 Rue des Peupliers
92130 Issy-les-Moulineaux, FR

72 Inventor/es:

COHEN, DANIEL;
NABIROCHKIN, SERGUEI;
CHUMAKOV, ILYA y
HAJJ, RODOLPHE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 635 872 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

Nuevas composiciones para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica y trastornos relacionados. Más específicamente, la presente invención se refiere a nuevas terapias combinatorias para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica y trastornos relacionados.

Antecedentes de la invención

- 10 La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, es la enfermedad de las neuronas motoras adultas más frecuente. Fue descrita por primera vez en 1869 por el neurólogo francés Jean-Martin Charcot. Esta enfermedad se caracteriza por la degeneración y la muerte de las neuronas motoras, lo que conduce a debilidad generalizada y atrofia muscular. El curso del trastorno es inexorablemente progresivo, muriendo el 50% de los pacientes a los 3 años del inicio. La ELA aparece como una enfermedad rara con una prevalencia de 4 a 6 por 100.000 cada año y una incidencia de 1 a 2 por 100.000 cada año.
- 15 La mayoría de los casos (90%) se clasifican como ELA esporádica (ELAE), y el 10% restante se hereda y se denomina ELA familiar (ELAF), con un patrón mendeliano de herencia. Desde el punto de vista clínico, los casos familiares (ELAF) y esporádicos (ELAE) no se pueden distinguir entre sí, aparte de la edad media de inicio de la ELAE que es 10 años más tarde que para la ELAF (56 años frente a 46 años) [1]. Las causas de la mayoría de los casos de ELA son desconocidas y el curso clínico es muy variable, lo que sugiere que múltiples factores subyacen en el mecanismo de la enfermedad. Pocos tratamientos están disponibles.
- 20 El sello de esta enfermedad es la muerte selectiva de las neuronas motoras ubicadas en el tronco encefálico, la corteza motora y la médula espinal, lo que lleva a la parálisis de los músculos voluntarios. La parálisis comienza focalmente y se disemina en un patrón que sugiere que la degeneración se está extendiendo entre los grupos contiguos de las neuronas motoras. Normalmente, la mortalidad se produce cuando el control del diafragma se ve alterado y se pierde la capacidad de respirar.
- 25 La ELA se caracteriza por manifestaciones progresivas de la disfunción de las neuronas motoras inferiores y superiores. Las neuronas motoras inferiores conectan el tronco encefálico y la médula espinal con las fibras musculares. Su disfunción conduce a atrofia muscular, calambres y fasciculaciones (contracción muscular pequeña, local, involuntaria). Las neuronas motoras superiores se originan en la región motora de la corteza cerebral o del tronco encefálico y llevan la información motora hasta las neuronas motoras que son directamente responsables de
- 30 estimular el músculo diana. Su disfunción conduce a espasticidad (contracción muscular continua que interfiere con la marcha, el movimiento y el habla) y reflejos patológicos [2]. Las otras enfermedades relacionadas con las neuronas motoras se distinguen generalmente por el tipo de células nerviosas alteradas, es decir, las neuronas motoras superiores o inferiores: se conocen como esclerosis lateral primaria (ELP), atrofia muscular progresiva (AMP), parálisis pseudobulbar y parálisis bulbar progresiva (PBP).
- 35 El diagnóstico de la ELA se basa en los signos clínicos, establecidos por el neurólogo sobre la base de la historia, la distribución topográfica de la pérdida neuronal y el hallazgo de algunos cambios citológicos característicos. Sin embargo, no hay una prueba diagnóstica clara de la ELA disponible. Las características clínicas se clasifican de acuerdo con las regiones neurológicas afectadas que son la bulbar, cervical y lumbar.
- 40 Como ya se mencionó, la degeneración en la ELA afecta predominantemente al sistema motor. Sin embargo, recientemente se han observado síntomas cognitivos y conductuales, así como sensoriales [3, 4] y hay evidencia de una superposición entre la demencia frontotemporal (FTD) y la ELA tanto clínicamente como patológicamente [17].
- Algunas evidencias débiles sugieren que el inicio de la ELA puede ser desencadenado por factores ambientales putativos [5 - 6].
- 45 Se han publicado varios genes mutados o regiones genómicas que causan o predisponen a la ELA, así como a la ELA con demencia frontotemporal (FTD) [7 - 9]. Por ejemplo, alrededor del 20-25% de todos los casos de ELAF y alrededor del 1% de los casos de ELAE surgen debido a las mutaciones en la superóxido dismutasa SOD1 [10]. Múltiples presentaciones clínicas dentro de la misma familia se obtienen con la misma mutación SOD1 que no necesariamente causa un fenotipo homogéneo. No existe una clara correlación entre la actividad enzimática, la progresión clínica y el fenotipo de la enfermedad. Sin embargo, el período de la enfermedad es similar, cualquiera
- 50 que sea la mutación. Históricamente, el descubrimiento de las mutaciones SOD1 llevó a la generación de los primeros modelos animales de ELA. Desarrollan una enfermedad de la motoneurona estrechamente parecida a la ELA humana [11 - 12]. Entre otros genes implicados en el desarrollo de ELA o enfermedades relacionadas con las neuronas motoras, puede ser mencionados la alsina, un factor de intercambio para Rab5A [13], senataxina, potencialmente implicado en el procesamiento del ARN, la proteína VAPB que regula el transporte de vesículas, la principal proteína motora retrógrada axonal dinactina, los genes mitocondriales para citocromo c oxidasa e isoleucina tRNA sintetasa [14 - 15], moduladores angiogénicos VEGF y angiogenina [16].
- 55

La ELA es una enfermedad compleja con múltiples causas y los mecanismos precisos involucrados en la patogénesis de esta enfermedad aún no se han resuelto. Esto desafía el descubrimiento de terapias farmacológicas eficaces. Los ensayos clínicos han demostrado que la supervivencia, pero no la función, es modestamente prolongada por el riluzol en ELA [18]. Sin embargo, el riluzol es actualmente el único fármaco aprobado y el único tratamiento conocido para la ELA. En cuanto a la gravedad de la enfermedad, se administra en consecuencia como un compuesto modificador de la enfermedad a todos los pacientes que sufren de ELA.

Los documentos WO 2009/133128, WO 2009/133141, WO 2009/133142, WO 2011/054759, WO2009/068668 y WO 2009/153291 describen tratamientos potenciales para varias enfermedades neurodegenerativas, entre las que se incluyen la ELA.

Se han realizado los primeros intentos para establecer pautas para las terapias no farmacológicas. Sin embargo, las normas siguen basándose en la opinión de expertos y difieren entre países.

Por consiguiente, todavía existe una gran necesidad en la técnica de terapias novedosas y eficaces para tratar la esclerosis lateral amiotrófica.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevas composiciones y métodos para tratar la esclerosis lateral amiotrófica ("ELA") y los trastornos relacionados. La invención proviene, entre otras cosas, de la identificación de combinaciones de fármacos que proporcionan un efecto terapéutico mejorado y un beneficio clínico para sujetos que tienen ELA.

También se proporciona una composición para su uso en el tratamiento de ELA o un trastorno relacionado, que comprende al menos dos fármacos seleccionados de acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o una sal, profármaco, derivado de cualquier pureza química, o formulación de liberación sostenida del mismo.

También se proporciona un método para tratar ELA o un trastorno relacionado en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto al menos dos fármacos seleccionados entre acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida o una sal, profármaco, derivado de cualquier pureza química, o formulación de liberación sostenida del mismo.

Ejemplos preferidos de combinaciones de fármacos para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, baclofeno y acamprosato; torasemida y baclofeno; baclofeno y cinacalcet; torasemida y sulfisoxazol; mexiletina y cinacalcet; o baclofeno y acamprosato y torasemida.

En una realización particular de la invención, la composición comprende además riluzol, o una sal, o formulación de liberación sostenida del mismo.

Las composiciones de la invención pueden comprender además uno o varios vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, y pueden administrarse repetidamente al sujeto. Las composiciones preferidas se administran oralmente. Además, los fármacos pueden formularse o administrarse juntos, por separado o secuencialmente.

La invención es adecuada para tratar ELA en cualquier sujeto mamífero, particularmente en un sujeto humano, en cualquier etapa de la enfermedad. La invención puede usarse para retardar el desarrollo de la enfermedad, reducir, retrasar o prevenir la parálisis, la degeneración de las neuronas motoras y/o el dolor, y/o aumentar la supervivencia.

Leyenda a las figuras

Figura 1: Efecto de la terapia de combinación con baclofeno y acamprosato frente a la toxicidad del glutamato en las células corticales neuronales. La intoxicación con glutamato se evita de forma significativa mediante la combinación de baclofeno (400 nM) y acamprosato (1,6 nM), mientras que, a esas concentraciones, el baclofeno y el acamprosato por sí solos no tienen un efecto significativo en la intoxicación. *: $P < 0,001$, significativamente diferente de la intoxicación por glutamato; (ANOVA + prueba de Dunnett Post-Hoc).

Figura 2: Efecto de la terapia de combinación de baclofeno y acamprosato frente a la toxicidad del glutamato (GLU) en el modelo de co-cultivo de células musculares nerviosas, sobre el número (A), el área (B) y la longitud neurítica (C) de las unidades motoras. Cualquiera que sea el punto final considerado, la intoxicación con glutamato se evita de forma significativa mediante la combinación de baclofeno (BCL, 80 nM) y acamprosato (ACP, 0,32 nM), mientras que, a esas concentraciones, el baclofeno y el acamprosato por sí solos no tienen un efecto significativo en la intoxicación. *: $P < 0,05$, significativamente diferente de la intoxicación por glutamato; (ANOVA + prueba de Dunnett Post-Hoc).

Figura 3: Efecto de la terapia de combinación cinacalcet y mexiletina contra la toxicidad del glutamato en las células corticales neuronales. La intoxicación con glutamato se evita significativamente mediante la combinación de cinacalcet (64 pM) y mexiletina (25,6 pM), mientras que, a esas concentraciones, el cinacalcet y la mexiletina por sí

solos no tienen un efecto significativo en la intoxicación. *: $P < 0,001$, significativamente diferente de la intoxicación por glutamato; (ANOVA + prueba de Dunnett Post-Hoc).

Figura 4: Efecto de la terapia de combinación de sulfisoxazol y torasemida frente a la toxicidad del glutamato en las células corticales neuronales. La intoxicación con glutamato se evita significativamente mediante la combinación de sulfisoxazol (6,8 nM) y torasemida (400 nM), mientras que, a esas concentraciones, el sulfisoxazol y la torasemida por sí solos no tienen un efecto significativo en la intoxicación. *: $P < 0,001$, significativamente diferente de la intoxicación por glutamato; (ANOVA + prueba de Dunnett Post-Hoc).

Figura 5: La combinación de baclofeno (BCL) y acamprosato (ACP) actúa como potenciador del efecto protector de riluzol (RIL) contra la toxicidad del glutamato, en el modelo de co-cultivo de células nerviosas-musculares, área (A), y longitud de neuritas (B) de unidades motoras. Se observa un efecto potenciador significativamente más fuerte cuando se usan concentraciones tan bajas como ACP (0,14 nM) BCL (36 nM), cuando se compara con el efecto obtenido para ACP (0,32 nM) BCL (80 nM).

Figura 6: El baclofeno (BCL) y el acamprosato (ACP) actúan sinérgicamente con el riluzol en la protección de las uniones neuromusculares contra la toxicidad del glutamato en el modelo de co-cultivo de las células nerviosas-musculares. Una importante mejora de la protección se observa al medir el número, el área, así como la longitud neurítica de las unidades motoras. A) se observa una mejora de los puntos finales del 2 al 5% para la mezcla de ACP (0,14 nM) BCL (36 nM); de 12 a 16% cuando se usa riluzol (0,04 μ M) solo; mientras que la combinación de los 3 fármacos da como resultado una mejora del 39 al 43%. B) se observa una mejora de los puntos finales del 2 al 5% para la mezcla de ACP (0,14 nM) BCL (36 nM); de 70 a 88% cuando se utiliza riluzol 5 μ M; mientras que la combinación de los 3 fármacos da como resultado una mejora de 131 a 165%. (*: $p < 0,001$, significativamente diferente de la intoxicación con glutamato, $\diamond$: $p < 0,001$, significativamente diferente (ANOVA + prueba de Dunnett Post-Hoc)).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos enfoques terapéuticos para tratar la ELA o trastornos relacionados. Más particularmente, la presente invención describe terapias combinatorias nuevas que permiten una corrección eficaz de tales enfermedades y que pueden usarse en cualquier sujeto mamífero.

Dentro del contexto de esta invención, el término "tratamiento" de un trastorno incluye la terapia, prevención, profilaxis, retraso o reducción del dolor provocado por el trastorno. El término tratamiento incluye, en particular, el control de la progresión de la enfermedad y los síntomas asociados. En relación con la ELA, el término tratamiento también designa un retraso o atraso en el inicio de la parálisis, una reducción o prevención de la degeneración de las neuronas motoras, una reducción del dolor y/o un aumento de la supervivencia.

La expresión "trastornos relacionados con la ELA" se refiere a trastornos de las neuronas motoras tales como la Esclerosis Lateral Primaria (ELP), Atrofia Muscular Progresiva (AMP), Parálisis Pseudobulbar y Parálisis Bulbar Progresiva (PBP), así como a Demencia Fronto Temporal (FTD).

La expresión "tratamiento o terapia de combinación o combinatoria" designa un tratamiento en el que al menos dos o más fármacos se administran conjuntamente a un sujeto para provocar un efecto biológico. En una terapia combinada de acuerdo con esta invención, los al menos dos fármacos se pueden administrar juntos o por separado, al mismo tiempo o secuencialmente. Además, los al menos dos fármacos pueden administrarse a través de diferentes rutas y protocolos. Como resultado, aunque pueden formularse conjuntamente, los fármacos de una combinación también pueden formularse por separado.

Como se discutió anteriormente, la invención describe composiciones de fármacos y métodos para tratar ELA o un trastorno relacionado en un sujeto que lo necesite.

Más particularmente, la invención describe una composición para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o un trastorno relacionado, que comprende al menos dos fármacos seleccionados del grupo que consiste en acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

Los inventores han encontrado sorprendentemente que estos compuestos, en combinación o combinaciones, muestran una actividad protectora frente a la toxicidad del glutamato, que es una de las causas de la muerte neuronal, en un modelo in vitro para la ELA.

Más particularmente, la invención muestra que los fármacos de la invención ejercen una actividad protectora sorprendente sobre las neuronas motoras frente a la toxicidad del glutamato, que es una de las causas etiológicas de la degeneración nerviosa en la ELA. Además, los inventores han observado que estos compuestos, a dosis bajas, actúan sinérgicamente para proteger eficientemente las unidades motoras. Esta es una ventaja particularmente importante, que evita cualquier efecto secundario potencial. Además, como se muestra en la parte experimental, estas terapias de combinación pueden retrasar la aparición de la parálisis in vivo en modelos animales

de ELA y prolongar la duración de la vida. Por lo tanto, estas terapias de combinación representan una mejora sustancial en el tratamiento de los sujetos con ELA.

Por consiguiente, la invención describe una composición para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o un trastorno relacionado, que comprende al menos dos fármacos seleccionados entre acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

La invención también describe un método para tratar la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o un trastorno relacionado en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto al menos dos fármacos seleccionados del grupo que consiste en acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

La invención también describe un compuesto seleccionado entre acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, en combinación con al menos un segundo compuesto seleccionado entre acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para su uso en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o un trastorno relacionado mediante la administración combinada, separada o secuencial a un sujeto que lo necesite.

Las combinaciones preferidas comprenden al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, para la administración simultánea, secuencial o separada:

- baclofeno y cinacalcet,
- cinacalcet y acamprosato,
- baclofeno y acamprosato,
- baclofeno y acamprosato y torasemida,
- mexiletina y cinacalcet,

- torasemida y baclofeno, o
- torasemida y sulfisoxazol,

o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos para su uso en el tratamiento de la ELA o un trastorno relacionado. Las composiciones que comprenden dichas combinaciones también se describen en la presente invención.

El término "profármaco", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier derivado funcional (o precursor) de un compuesto de la presente invención que, cuando se administra a un sistema biológico, genera dicho compuesto como resultado, por ejemplo, de reacciones químicas espontáneas, reacciones químicas catalizadas por enzimas, y/o reacciones químicas metabólicas. Los profármacos son usualmente inactivos o menos activos que el fármaco resultante y pueden usarse, por ejemplo, para mejorar las propiedades fisicoquímicas del fármaco, dirigir el fármaco a un tejido específico, mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del fármaco y/o para reducir los efectos secundarios indeseables. Algunos de los grupos funcionales comunes que son susceptibles de producir profármacos incluyen, pero no se limitan a, grupos carboxílicos, hidroxilo, amina, fosfato/fosfonato y carbonilo. Los profármacos típicamente producidos a través de la modificación de estos grupos incluyen, pero no se limitan a ésteres, carbonatos, carbamatos, amidas y fosfatos. La orientación técnica específica para la selección de profármacos adecuados es del conocimiento común general (19 - 23). Además, la preparación de profármacos puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos que pueden usarse para sintetizar otros profármacos se describen en numerosas revisiones sobre el tema (20; 24 - 30). Por ejemplo, el arbaclofen placarbil aparece en la base de datos de ChemID plus Advance (sitio web: chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) y el arbaclofen placarbil es un profármaco bien conocido del baclofeno (31-32). Ejemplos específicos de profármacos de baclofeno se dan en Hanafi et al., 2011 (33), en particular los ésteres de baclofeno y los carbamatos de ésteres de baclofeno, que son de particular interés para la selección del SNC. Por lo tanto, tales profármacos son particularmente adecuados para las composiciones de esta invención. El arbaclofen placarbil, como se ha mencionado anteriormente, es también un profármaco bien conocido y por lo tanto puede usarse en lugar del baclofeno en las composiciones de la invención. Otros profármacos de baclofeno se pueden encontrar en las siguientes solicitudes de patente: WO2010102071, US2009197958, WO2009096985, WO2009061934, WO2008086492, US2009216037, WO2005066122, US2011021571, WO2003077902, WO2010120370.

Los profármacos útiles para el acamprosato, tales como los ésteres de neopentilsulfonilo del éster de ácido pantoico, los profármacos de ésteres de neopentilsulfonilo o los profármacos del éster de neopentilsulfonilo de carboxilato

enmascarados de acamprosato se enumeran notablemente en los documentos WO2009033069, WO2009033061, WO2009033054, WO2009052191, WO2009033079, US 2009/0099253, US 2009/0069419, US 2009/0082464, US 2009/0082440 y US 2009/0076147.

El término "derivado" de un compuesto incluye cualquier molécula que esté funcionalmente y/o estructuralmente relacionada con dicho compuesto, tal como un ácido, una amida, un éster, un éter, una variante acetilada, una variante hidroxilada o una variante (C1-C6) alquilada de tal compuesto. El término derivado también incluye un compuesto estructuralmente relacionado que ha perdido uno o más sustituyentes como se ha enumerado anteriormente. Por ejemplo, la homotaurina es un derivado desacetilado de acamprosato. Los derivados preferidos de un compuesto son moléculas que tienen un grado sustancial de similitud con dicho compuesto, según se determina por métodos conocidos. Compuestos similares junto con su índice de similitud con una molécula madre se pueden encontrar en numerosas bases de datos tales como PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) o DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>). En una realización más preferida, los derivados deben tener un índice de similitud de Tanimoto mayor que 0,4, preferiblemente mayor que 0,5, más preferiblemente mayor que 0,6, incluso más preferiblemente mayor que 0,7 con un fármaco original. El índice de similitud de Tanimoto se utiliza ampliamente para medir el grado de similitud estructural entre dos moléculas. El índice de similitud de Tanimoto puede ser computado por software tal como el Detector de Subgrafía de Pequeña Molécula (34-35) disponible en línea (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/SMSD/>). Los derivados preferidos deben estar tanto estructural como funcionalmente relacionados con un compuesto original, es decir, también deben retener al menos parte de la actividad del fármaco original, más preferiblemente deben mostrar una actividad protectora frente a la toxicidad del glutamato para las unidades motrices (como se ejemplifica en la parte experimental).

El término derivados también incluye metabolitos de un fármaco, por ejemplo, una molécula que resulta de la modificación (o modificaciones) bioquímicas o procesamiento de dicho fármaco después de la administración a un organismo, usualmente a través de sistemas enzimáticos especializados, y que muestra o retiene una actividad biológica del fármaco. Se han descrito metabolitos como responsables de gran parte de la acción terapéutica del fármaco original. En una realización específica, un "metabolito", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, designa un fármaco modificado o procesado que retiene al menos parte de la actividad del fármaco original, más preferiblemente debe mostrar una actividad protectora frente a la toxicidad del glutamato para las unidades motoras (como se ejemplifica en la parte experimental). Ejemplos de metabolitos incluyen formas hidroxiladas de torasemida resultantes del metabolismo hepático del fármaco (base de datos de bancos de fármacos (36)).

El término "sal" se refiere a una sal de adición de ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptable y relativamente no tóxica de un compuesto de la presente invención. La formación de sales farmacéuticas consiste en emparejar una molécula de fármaco ácida, básica o zwitteriónica con un contraión para crear una versión salina del fármaco. Se puede usar una amplia variedad de especies químicas en la reacción de neutralización. Por lo tanto, las sales farmacéuticamente aceptables de la invención incluyen aquellas obtenidas haciendo reaccionar el compuesto principal, que funciona como una base, con un ácido inorgánico u orgánico para formar una sal, por ejemplo, sales de ácido acético, ácido nítrico, ácido tártrico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido alcanforsulfónico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico o ácido cítrico. Las sales farmacéuticamente aceptables de la invención también incluyen aquellas en las que el compuesto principal funciona como un ácido y se hace reaccionar con una base apropiada para formar, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio o colina. Aunque la mayoría de las sales de un principio activo dado son bioequivalentes, algunas pueden tener, entre otros, propiedades incrementadas de solubilidad o biodisponibilidad. La selección de la sal es ahora una operación estándar común en el proceso de desarrollo de fármacos tal como lo mostraron H. Stahl y C.G. Wermuth en su manual (37).

En una realización preferida, la designación de un compuesto pretende designar el compuesto per se, así como cualquier sal, hidrato, isómero o racemato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

La Tabla I siguiente proporciona el número CAS de los compuestos para uso en la invención, así como de sal(es), derivados, metabolitos y/o profármacos de los compuestos.

Tabla 1

Medicamento	Números CAS	Clase o índice de similitud de Tanimoto
acamprosato y compuestos relacionados		
acamprosato	77337-76-9; 77337 - 73 - 6	NA
homotaurina	3687 - 18 - 1	0,73
propanosulfonato de etil dimetil amonio	/	0,77

Medicamento	Números CAS	Clase o índice de similitud de Tanimoto
taurina	107-35-7	0,5
baclofeno y compuestos relacionados		
baclofeno	1134-47-0; 66514 - 99 - 6; 69308-37-8; 70206 - 22 - 3; 63701-56-4; 63701-55-3	N/A
ácido 3-(p-clorofenil)-4-hidroxibutírico	/	Metabolito
arbaclofen placarbil	847353-30-4	Profármaco
mexiletina y compuestos relacionados		
mexiletina	31828-71-4; 5370-01-4	
6-hidroximetilmexiletina	53566-98-6	Metabolito
4-hidroximexiletina	53566-99-7	Metabolito
3-hidroximexiletina (MHM)	129417-37-4	Metabolito
N-hidroximexiletina glucuronida	151636-18-9	Metabolito
sulfisoxazol y compuestos relacionados		
sulfisoxazol	127-69-5; 4299-60-9	
N(4)-acetilsulfisoxazol	4206-74-0	Metabolito
sulfisoxazol acetilo	80-74-0	Profármaco
sulfametoxazol	723-46-6	0,52
cinacalcet y compuestos relacionados		
cinacalcet	226256-56-0; 364782-34-3	
ácido hidrocinnámico	501-52-0	Metabolito
torasemida y compuestos relacionados		
torasemida	56211-40-6; 72810-59-4	
hidroxitorasemida	99300-68-2; 99300-67-1	Metabolitos
carboxitorasemida		Metabolito
tolbutamida	64-77-7	0,55

Más preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden 2, 3, 4 ó 5 fármacos distintos, incluso más preferiblemente 2, 3 ó 4 fármacos distintos para el tratamiento combinado de ELA o un trastorno relacionado en un sujeto que lo necesite.

- 5 En una realización particular, la invención describe una composición en sí que comprende baclofeno y cinacalcet, o acamprosato y cinacalcet o sal(es) o profármaco(s) o derivado(s) de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida.

- 10 En otro ejemplo, la invención describe una composición que comprende acamprosato y cinacalcet o sal(es) o profármaco(s) o derivado(s) de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida para su uso en el tratamiento de la ELA o un trastorno relacionado, en el que la dosificación diaria de acamprosato es igual o inferior a 10 mg.

Además, en otro ejemplo particular, las composiciones y métodos de la presente descripción utilizan además Riluzol, o una sal, profármaco, derivado de cualquier pureza, o formulación de liberación sostenida del mismo. Los

resultados presentados sorprendentemente muestran que, cuando se usan en combinación con riluzol (CAS n° 1744-22-5), las composiciones de la invención pueden aumentar sustancialmente el beneficio clínico del tratamiento a los pacientes.

- 5 Por consiguiente, un ejemplo particular es una composición que comprende i) al menos un fármaco seleccionado entre acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, y ii) riluzol, para un uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de ELA o un trastorno relacionado.

Otro ejemplo es una composición como la descrita anteriormente, que comprende i) al menos dos fármacos seleccionados entre acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, y ii) riluzol, para un uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de ELA o un trastorno relacionado.

- 10 Un objeto preferido es una composición que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos:

- riluzol, baclofeno y cinacalcet,
- riluzol, cinacalcet y acamprosato,
- riluzol, baclofeno y acamprosato,
- riluzol, baclofeno y acamprosato y torasemida,

- 15 - riluzol, mexiletina y cinacalcet,
- riluzol, torasemida y baclofeno, o
 - riluzol, torasemida y sulfisoxazol,

o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para un uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de ELA o un trastorno relacionado.

- 20 Otras terapias adicionales que pueden usarse junto con una combinación o combinaciones de fármacos de acuerdo con la presente invención, pueden comprender uno o más fármacos que mejoran los síntomas de la enfermedad de ELA, uno o más fármacos que podrían ser utilizados para el tratamiento paliativo de la enfermedad de ELA o uno o más fármacos evaluados actualmente en el marco de ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad de ELA. Preferiblemente, dichos uno o más fármacos se seleccionan entre AEOL 10150, arimoclomol, AVP-923, toxina botulínica de tipo B (Myobloc), ceftriaxona, celastrol, celecoxib, glicósidos totales de cistanche, coenzima Q10, copaxona, creatina, creatinina, dronabinol, eritropoyetina, escitalopram (Lexapro), acetato de glatiramer, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), hormona del crecimiento (Somatropin), GSK1223249, indinavir, factor de crecimiento de tipo insulina -1 (IGF-1), IGF-1 - AAV, KNS - 760704, letepirinin, leuprolida, levetiracetam, MCI - 186, mecobalamina, minociclina, modafinil, inhibidor de Naaladasa, N-acetilcisteína, NBQX, nimesulida, nimodipina, olanzapina, olesoxima (TRO 19622), ONO - 2506, oxepa, pioglitazona, dihidrocloruro monohidrato de R(+)
- 25 pramipexol, olesoxima, oxandrolona, quinidina, fenil butirato, SB-509, Scriptaid, sNN0029, somatropina, talampanel, tamoxifeno, ácido tauroursodesoxicólico, TCH346, testosterona, talidomida, trehalosa, tretinoína, vitamina E, YAM 80 o de 17-beta-estradiol, 2-MPPA (ácido 2-(3-mercaptopropil)pentanodioico), 3,4-diaminopiridina, 5-hidroxitriptófano, 7-nitroindazol, ácido alfa-lipoico, AM1241, aminofilina, angiogenina, anticuerpo SOD1 anti-humano, ácido nucleico peptídico antisentido dirigido contra p75 (NTR), AP7, apocinina, BAPTA-AM, BDNF, BN82451, cannabinal, cardiotropina-1, anticuerpos CD4, CNTF, colivelin, cobre dietético, corticotropina, ciclofosfamida, Delta(9)-tetrahidrocannabinol, DHEA, diazepam, zinc dietético, diltiazem, DMPO, DP-109, DP-460, edaravona, EGCG, galato de epigallocatequina, etidronato, FeTCPP, fluvoxamina, ácido fólico, gabapentina, galectina-1, GDNF, ginseng, GPI-1046, guanidina, HGF, humanina, IFN-alfa, interleucina-3, ivermectina, L-745.870, L-carnitina, L-DOPA, SOD lecitinizada, lenalidomida, leupeptina, LIF, L-NAME, acetilsalicilato de lisina, melatonina, mepivacaína, metanfetamina, metilcobalamina, MK-801, MnTBAP, modafinilo, morfina, Neu2000, NGF, ácido nordihidroguaiarético, nortriptilina, NT3, olmesartán, penicilamina, pentoxifilina, pimozida, catalasa modificada con poliamina, pramipexol, prednisona, progesterona, prometazina, catalasa modificada con putrescina, piruvato, rasagilina, RK35, Ro 28-2653, rofecoxib, RPR 119990, RX77368, SB203580, selegilina, semapimod, sertralina, SS-31, SSR180575, siRNA estabilizado contra Cu,Zn-superóxido dismutasa (SOD1), tacrolimus, tamsulosin hidrocloreuro, TAT modificado Bcl-X (L), TGF-beta2, tianeptina, trientina, TRO19622, U-74389F, VEGF, vincristina, WHI-P131, WIN55,212-2, WX-340, xaliproden, ZK 187638 y zVAD-fmk.
- 30 35 40 45

- 50 Como se ha indicado anteriormente, las terapias preferidas de esta invención contienen compuestos activos 2, 3, 4 o incluso más distintivos, que pueden estar opcionalmente asociados o combinados con otro(s) tratamiento(s). En una terapia de combinación de esta invención, los compuestos o fármacos pueden formularse juntos o por separado, y administrarse juntos, por separado o secuencialmente.

La invención también describe un método para tratar la enfermedad de ELA o un trastorno relacionado, comprendiendo el método administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente a un sujeto que lo necesite una combinación de fármacos como se ha descrito anteriormente.

Los fármacos o las composiciones de la invención pueden administrarse repetidamente al sujeto.

Las composiciones de la invención típicamente comprenden uno o varios vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 5 Un objeto adicional de esta invención se refiere al uso de al menos dos fármacos seleccionados del grupo que consiste en acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la ELA o un trastorno relacionado por administración combinada, separada o secuencial a un sujeto que lo necesite.

Un objeto adicional de esta invención se refiere al uso de al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos:

- 10 - baclofeno y cinacalcet,
- cinacalcet y acamprosato,
- baclofeno y acamprosato,
- baclofeno y acamprosato y torasemida,
- mexiletina y cinacalcet,

- 15 - torasemida y baclofeno, o
- torasemida y sulfisoxazol,

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la ELA o un trastorno relacionado mediante la administración combinada, separada o secuencial a un sujeto que lo necesite.

- 20 En una realización particular, la invención se refiere también al uso de al menos un fármaco seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida en una combinación con el riluzol para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de ELA o un trastorno relacionado mediante la administración combinada, separada o secuencial a un sujeto que lo necesite.

- 25 Otra realización se refiere al uso de al menos dos fármacos seleccionados del grupo que consiste en acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida en una combinación con el riluzol para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la ELA o un trastorno relacionado por la administración combinada, separada o secuencial a un sujeto que lo necesite.

En una realización más particular, esta invención se refiere al uso de al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos:

- 30 - baclofeno y cinacalcet,
- cinacalcet y acamprosato,
- baclofeno y acamprosato,
- baclofeno y acamprosato y torasemida,
- mexiletina y cinacalcet,
- torasemida y baclofeno, o
35 - torasemida y sulfisoxazol,

en una combinación con riluzol, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la ELA o un trastorno relacionado mediante la administración combinada, separada o secuencial a un sujeto que lo necesite.

Un objeto adicional es un método para preparar una composición farmacéutica, comprendiendo el método mezclar los compuestos anteriores en un excipiente o vehículo apropiado.

- 40 La terapia de acuerdo con la invención puede proporcionarse en el hogar, en el consultorio del médico, en una clínica, en un departamento de hospitalización del hospital o en un hospital, para que el médico pueda observar los efectos de la terapia de cerca y hacer los ajustes necesarios.

La duración de la terapia depende de la etapa de la enfermedad, la edad y condición del paciente, y cómo el paciente responde al tratamiento.

Además, una persona que tiene un riesgo mayor de desarrollar un trastorno neurológico adicional (por ejemplo, una persona que está predispuesta genéticamente o tiene, por ejemplo, diabetes, o está siendo tratada para un estado oncológico, etc.) puede recibir tratamiento profiláctico para aliviar o retrasar la eventual respuesta neurológica.

- 5 La dosificación, frecuencia y modo de administración de cada fármaco se pueden controlar de forma independiente. La terapia combinada puede administrarse en ciclos a intervalos que incluyen periodos de descanso para que el cuerpo del paciente tenga la oportunidad de recuperarse de cualquier efecto secundario aún no previsto. Los fármacos también pueden formularse juntos de manera que una administración proporcione ambos fármacos.

Formulación de Composiciones Farmacéuticas

- 10 La administración de cada fármaco de la combinación puede ser por cualquier medio adecuado que dé como resultado una concentración del fármaco que, combinado con el otro componente, sea capaz de mejorar la condición del paciente.

- 15 Aunque es posible administrar los ingredientes activos de la combinación como producto químico puro, es preferible presentarlos como una composición farmacéutica, a la que también se hace referencia en este contexto como formulación farmacéutica. Las composiciones posibles incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, rectal, tópica (incluyendo transdérmica, bucal y sublingual) o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica).

- 20 Más comúnmente, estas formulaciones farmacéuticas se prescriben al paciente en "paquetes de paciente" que contienen un número de unidades de dosificación u otros medios para la administración de dosis unitarias medidas para su uso durante un período de tratamiento distinto en un solo envase, habitualmente un envase blister. Los paquetes de paciente tienen una ventaja sobre las prescripciones tradicionales, en las que el farmacéutico divide el suministro del paciente de un producto farmacéutico a partir de un suministro a granel, en el que el paciente siempre tiene acceso al inserto del paquete incluido en el paquete del paciente, que normalmente falta en las recetas tradicionales. Se ha demostrado que la inclusión de un prospecto del paquete mejora el cumplimiento farmacéutico del paciente con las instrucciones del médico. Por lo tanto, la invención incluye además una formulación farmacéutica, como se ha descrito anteriormente, en combinación con el material de envasado adecuado para dichas formulaciones. En tal paquete del paciente, el uso pretendido de una formulación para el tratamiento combinado puede deducirse mediante instrucciones, instalaciones, disposiciones, adaptaciones y/u otros medios para ayudar a usar la formulación más adecuadamente para el tratamiento. Tales medidas hacen que un paquete de paciente sea específicamente adecuado y adaptado para su uso para el tratamiento con la combinación de la presente invención.

- 35 El fármaco puede estar contenido en cualquier cantidad apropiada en cualquier sustancia portadora adecuada, y puede estar presente en una cantidad de 1 - 99% en peso del peso total de la composición. La composición puede proporcionarse en una forma de dosificación que sea adecuada para la vía oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhalante, para la piel (parche) u ocular. Por lo tanto, la composición puede estar en forma, por ejemplo, de comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles que incluyen hidrogeles, pastas, ungüentos, cremas, emplastos, empapados, dispositivos de liberación osmótica, supositorios, enemas, inyectables, implantes, pulverizadores o aerosoles.

- 40 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed.), Ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

- 45 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden formularse para liberar el fármaco activo sustancialmente inmediatamente después de la administración o en cualquier periodo de tiempo o tiempo predeterminado después de la administración.

- 50 Las formulaciones de liberación controlada incluyen (i) formulaciones que crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado; (ii) formulaciones que después de un tiempo de retardo predeterminado crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado; (iii) formulaciones que sostienen la acción del fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado manteniendo un nivel de fármaco relativamente constante y eficaz en el cuerpo con una minimización concomitante de los efectos secundarios indeseables asociados con las fluctuaciones en el nivel de plasma de la sustancia farmacológica activa; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco, por ejemplo, la colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente al tejido u órgano enfermo o en el mismo; y (v) formulaciones que dirigen la acción del fármaco utilizando portadores o derivados químicos para administrar el fármaco a un tipo de célula objetivo particular.

La administración de fármacos en forma de una formulación de liberación controlada es especialmente preferida en los casos en los que el fármaco en combinación tiene (i) un índice terapéutico estrecho (es decir, la diferencia entre la concentración en plasma que conduce a efectos secundarios dañinos o reacciones tóxicas y la concentración

plasmática que conduce a un efecto terapéutico es pequeña, en general, el índice terapéutico, TI, se define como la relación de la dosis letal media (LD50) respecto a la mediana de la dosis efectiva (ED50)); (ii) una ventana de absorción estrecha en el tracto gastrointestinal; o (iii) una semivida biológica muy corta, de modo que se requiere una dosificación frecuente durante un día para mantener el nivel en plasma a un nivel terapéutico.

Cualquiera de una serie de estrategias puede ser perseguida con el fin de obtener una liberación controlada en la que la tasa de liberación supera la tasa de metabolismo de la droga en cuestión. La liberación controlada puede obtenerse mediante la selección apropiada de diversos parámetros e ingredientes de formulación, incluyendo, por ejemplo, diversos tipos de composiciones de liberación controlada y revestimientos. De este modo, el fármaco se formula con excipientes apropiados en una composición farmacéutica que, después de su administración, libera el fármaco de una manera controlada (comprimidos o composiciones de cápsulas individuales o múltiples, soluciones oleosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, y liposomas).

Formas de dosificación sólidas para uso oral

La vía de administración preferida para el cilostazol y para el riluzol es la vía oral. Las formulaciones para uso oral incluyen tabletas que contienen el ingrediente(s) activo(s) en una mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, excipientes o cargas inertes (por ejemplo, sacarosa, celulosa microcristalina, almidones incluyendo almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro sódico, fosfato cálcico, sulfato cálcico o fosfato sódico); agentes de granulación y desintegración (por ejemplo, derivados de celulosa incluyendo celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, croscarmelosa sódica, alginatos o ácido algínico); agentes aglutinantes (por ejemplo, acacia, ácido algínico, alginato de sodio, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol); y agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo, ácido esteárico, sílices o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes aromatizantes, plastificantes, humectantes, agentes tamponantes y similares.

Los comprimidos pueden estar sin revestimiento o pueden recubrirse por técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y, de este modo, proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. El revestimiento puede estar adaptado para liberar la sustancia farmacéutica activa en un patrón predeterminado (por ejemplo, para conseguir una formulación de liberación controlada) o puede adaptarse para no liberar la sustancia farmacológica activa hasta después del paso del estómago (revestimiento entérico). El revestimiento puede ser un revestimiento de azúcar, un revestimiento de película (por ejemplo, a base de hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, metil hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona), o un revestimiento entérico (por ejemplo, un copolímero a base de ácido metacrílico, acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de acetato de polivinilo, goma laca y/o etilcelulosa). Se puede emplear un material de retardo de tiempo tal como, por ejemplo, monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones de comprimidos sólidos pueden incluir un revestimiento adaptado para proteger la composición de cambios químicos no deseados (por ejemplo, la degradación química antes de la liberación de la sustancia farmacológica activa). El revestimiento puede aplicarse sobre la forma de dosificación sólida de una manera similar a la descrita en Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

Los fármacos se pueden mezclar juntos en el comprimido, o pueden dividirse. Por ejemplo, un primer fármaco está contenido en el interior del comprimido, y un segundo fármaco está en el exterior, de manera que una porción sustancial del segundo fármaco se libera antes de la liberación del primer fármaco.

Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como comprimidos masticables o como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un excipiente sólido inerte (por ejemplo, almidón de patata, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín) o como cápsulas de gelatina blandas en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, parafina líquida o aceite de oliva. Los polvos y granulados se pueden preparar usando los ingredientes mencionados anteriormente en comprimidos y cápsulas de una manera convencional.

Las composiciones de liberación controlada para su uso oral pueden, por ejemplo, ser construidas para liberar el fármaco activo controlando la disolución y/o la difusión de la sustancia farmacológica activa.

La disolución o liberación controlada por difusión puede conseguirse mediante un revestimiento apropiado de una formulación de comprimidos, cápsulas, gránulos o granulados de fármacos, o incorporando el fármaco en una matriz apropiada. Un revestimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de revestimiento mencionadas anteriormente y/o, por ejemplo, goma laca, cera de abejas, glicol, cera de ricino, cera de carnauba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, dl-ácido poliláctico, butirato de acetato de celulosa, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, vinil pirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metacrilato de metilo, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3-butilenglicol, metacrilato de etilenglicol y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada,

el material de matriz también puede incluir, por ejemplo, metilcelulosa hidratada, cera de carnauba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, cloruro de polivinilo, polietileno y/o fluorocarbono halogenado.

- Una composición de liberación controlada que contiene uno o más de los fármacos de las combinaciones reivindicadas también puede estar en forma de un comprimido o cápsula flotante (es decir, un comprimido o cápsula que, tras la administración oral, flota sobre el contenido gástrico durante cierto tiempo período de tiempo). Se puede preparar una formulación en comprimido flotante del fármaco o fármacos mediante la granulación de una mezcla del fármaco o fármacos con excipientes y un 20 - 75% p/p de hidrocoloides, tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. Los gránulos obtenidos se pueden comprimir a continuación en comprimidos. En contacto con el jugo gástrico, el comprimido forma una barrera de gel sustancialmente impermeable al agua alrededor de su superficie. Esta barrera de gel toma parte en el mantenimiento de una densidad de menos de uno, permitiendo de este modo que el comprimido permanezca flotante en el jugo gástrico.

Líquidos para la administración oral

- Los polvos, polvos dispersables o gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa por adición de agua son formas de dosificación convenientes para la administración oral. La formulación como suspensión proporciona el ingrediente activo en una mezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Agentes de suspensión adecuados son, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato sódico y similares.

Composiciones parenterales

- Aunque se prefiere menos, la composición farmacéutica también puede administrarse parenteralmente mediante inyección, infusión o implantación (intravenosa, intramuscular, subcutánea o similar) en formas de dosificación, formulaciones o mediante dispositivos de liberación adecuados o implantes que contengan vehículos y adyuvantes convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables. La formulación y preparación de tales composiciones son bien conocidas por los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica.

- Las composiciones para uso parenteral pueden proporcionarse en formas de dosificación unitarias (por ejemplo, en ampollas de dosis única), o en viales que contienen varias dosis y en las que se puede añadir un conservante adecuado (véase más adelante). La composición puede estar en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión o un dispositivo de administración para su implantación o puede presentarse como un polvo seco a reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Aparte de los fármacos activos, la composición puede incluir vehículos y/o excipientes adecuados parenteralmente aceptables. El(los) fármaco(s) activo(s) se pueden incorporar en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas o similares para su liberación controlada. La composición puede incluir agentes de suspensión, solubilización, estabilización, ajuste del pH y/o agentes dispersantes.

- Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden estar en la forma adecuada para la inyección estéril. Para preparar dicha composición, el fármaco o los fármacos activos adecuados se disuelven o suspenden en un vehículo líquido parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, agua ajustada a un pH adecuado por adición de una cantidad apropiada de ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o un tampón adecuado, 1,3-butanodiol, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. La formulación acuosa puede contener también uno o más conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo, etilo o n-propilo). En los casos en que uno de los fármacos es sólo escasamente o ligeramente soluble en agua, se puede añadir un agente potenciador de la disolución o solubilizante, o el disolvente puede incluir 10 - 60% p/p de propilenglicol o similar.

- Las composiciones parenterales de liberación controlada pueden estar en forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, soluciones de aceite, suspensiones oleosas o emulsiones. Alternativamente, el(los) fármaco(s) activo(s) se pueden incorporar en vehículos biocompatibles, liposomas, nanopartículas, implantes o dispositivos de infusión. Los materiales para usar en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, por ejemplo, polímeros biodegradables/bioerosionables tales como poligalactina, poli(cianoacrilato de isobutilo), poli(2-hidroxietil-L-glutamina). Los vehículos biocompatibles que pueden usarse cuando se formula una formulación parenteral de liberación controlada son carbohidratos (por ejemplo, dextranos), proteínas (por ejemplo, albúmina), lipoproteínas o anticuerpos. Los materiales para uso en implantes pueden ser no biodegradables (por ejemplo, polidimetilsiloxano) o biodegradables (por ejemplo, poli(caprolactona), poli(ácido glicólico) o poli(ortoésteres)).

Rutas alternativas

- Aunque menos preferidas y menos convenientes, pueden contemplarse otras vías de administración, y por lo tanto otra formulación. A este respecto, para la aplicación rectal, las formas de dosificación adecuadas para una composición incluyen supositorios (tipo emulsión o suspensión) y cápsulas de gelatina rectal (soluciones o suspensiones). En una formulación de supositorio típica, el(los) fármaco(s) activo(s) se combinan con una base de supositorio farmacéuticamente aceptable apropiada tal como manteca de cacao, ácidos grasos esterificados,

gelatina glicerizada y diversas bases solubles en agua o dispersables como polietilenglicoles. Pueden incorporarse diversos aditivos, potenciadores o tensioactivos.

Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse tópicamente sobre la piel para su absorción percutánea en formas de dosificación o formulaciones que contienen vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales que incluyen microesferas y liposomas. Las formulaciones incluyen cremas, ungüentos, lociones, linimentos, geles, hidrogeles, soluciones, suspensiones, varillas, aerosoles, pastas, yesos y otros tipos de sistemas de administración transdérmica de fármacos. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir agentes emulsionantes, antioxidantes, agentes tamponantes, conservantes, humectantes, potenciadores de penetración, agentes quelantes, agentes formadores de gel, bases para ungüentos, perfumes y agentes protectores de la piel.

Los agentes emulsionantes pueden ser gomas naturales (por ejemplo, goma arábica o goma tragacanto).

Los conservantes, humectantes, potenciadores de penetración pueden ser parabenos, tales como p-hidroxibenzoato de metilo o propilo, y cloruro de benzalconio, glicerina, propilenglicol, urea, etc.

Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para la administración tópica sobre la piel también pueden usarse en relación con la administración tópica sobre o cerca de la parte del cuerpo que se va a tratar. Las composiciones pueden adaptarse para su aplicación directa o para su aplicación por medio de dispositivos especiales de suministro de fármacos tales como apósitos o alternativamente yesos, almohadillas, esponjas, tiras u otras formas de materiales flexibles adecuados.

Dosis y duración del tratamiento

Se apreciará que los fármacos de la combinación pueden administrarse concomitantemente, ya sea en la misma o en una formulación farmacéutica diferente o secuencialmente. Si hay administración secuencial, el retraso en la administración de uno de los ingredientes activos no debe ser tal que pierda el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. Un requisito mínimo para una combinación según esta descripción es que la combinación debe estar destinada al uso combinado con el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. El uso pretendido de una combinación puede deducirse por los equipos, disposiciones, adaptaciones y/u otros medios que ayuden a usar la combinación según la invención.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de cilostazol es una cantidad adecuada para prevenir o reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad de ELA y detener o retardar la progresión de la enfermedad de ELA una vez que se ha manifestado clínicamente.

Ejemplos preferidos de dosificaciones de acuerdo con la invención son:

- mexiletina: de aproximadamente 6 a 120 mg por día, preferiblemente menos de 60 mg por día, más preferiblemente menos de 30 mg por día, incluso más preferiblemente menos de 15 mg por día, siendo tales dosificaciones particularmente adecuadas para la administración oral,

- torasemida: de aproximadamente 0,05 a 4 mg por día, preferiblemente menos de 2 mg al día, más preferiblemente menos de 1 mg al día, incluso más preferiblemente menos de 0,5 mg al día, siendo tales dosificaciones particularmente adecuadas para la administración oral,

- acamprosato: entre 1 y 1.000 mg por día, preferiblemente menos de 400 mg por día, más preferiblemente menos de 200 mg por día, incluso más preferiblemente menos de 50 mg por día, o incluso menos de 10 mg por día, siendo dichas dosificaciones particularmente adecuadas para la administración oral,

- baclofeno: entre 0,01 y 150 mg por día, preferiblemente menos de 100 mg por día, más preferiblemente menos de 50 mg por día, incluso más preferiblemente menos de 30 mg por día, siendo tales dosificaciones particularmente adecuadas para la administración oral,

- cinacalcet: de aproximadamente 0,3 a 150 mg por día, más preferiblemente menos de 100 mg por día, incluso más preferiblemente menos de 36 mg por día, siendo tales dosificaciones particularmente adecuadas para la administración oral,

- sulfisoxazol: de aproximadamente 20 a 800 mg por día, siendo tales dosificaciones particularmente adecuadas para la administración oral,

- riluzol: de aproximadamente 0,01 a 100 mg por día, preferiblemente menos de 75 mg por día, más preferiblemente menos de 50 mg por día, incluso más preferiblemente menos de 25 mg por día, siendo tales dosificaciones particularmente adecuadas para la administración oral.

Se entenderá que la cantidad del fármaco realmente administrado será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes incluyendo la condición o condiciones a tratar, la composición exacta a administrar, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y la vía de

administración elegida. Adicionalmente, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo sobre el perfil farmacocinético, farmacodinámico o el perfil de eficacia de una terapéutica) sobre un paciente en particular puede afectar a la dosis utilizada. Por lo tanto, los intervalos de dosificación anteriores están destinados a proporcionar una orientación general y soporte para las enseñanzas de la presente memoria, pero no pretenden limitar el alcance de la invención.

Aunque los fármacos activos de la presente invención se pueden administrar en dosis divididas, por ejemplo dos o tres veces al día, se prefiere una única dosis diaria de cada fármaco en la combinación, siendo la más preferida una única dosis diaria de todos los fármacos en una composición farmacéutica única (forma de dosificación unitaria). La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas (tales como cápsulas, comprimidos o cilindros de jeringa cargados) adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo o materiales calculados para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

La administración puede ser de una a varias veces al día durante varios días a varios años, e incluso puede ser para toda la vida del paciente. En la mayoría de los casos se indicará la administración crónica o por lo menos periódicamente repetida a largo plazo.

En una realización más preferida, las combinaciones de la invención se usan en una combinación con riluzol, en donde todos los fármacos se administran oralmente. En dicho protocolo, el riluzol se administra preferiblemente de forma repetida, por ejemplo, diariamente, más preferiblemente a una dosis diaria de 0,01 - 100 mg por día, incluso más preferiblemente a una dosificación diaria de 0,1 - 100 mg por día, lo más preferiblemente entre 0,1 - 50 mg por día, y los otros fármacos en las dosis indicadas anteriormente.

Los fármacos pueden administrarse simultáneamente, es decir, aproximadamente al mismo tiempo, aunque no necesariamente exactamente al mismo tiempo, o a través de la misma formulación. En particular, el riluzol puede formularse por separado de los otros fármacos y todos se ingieren aproximadamente al mismo período del día, para asegurarse que están presentes y pueden actuar en combinación en el cuerpo. También es posible definir un protocolo terapéutico en el que se administre riluzol en alternancia con la combinación que comprende al menos dos fármacos seleccionados de acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida (por ejemplo, riluzol un día, al día siguiente dicha combinación, y así). Debe observarse que varios protocolos pueden ser ajustados o definidos por el médico, asegurando que la terapia de combinación de la invención es más eficaz en cada paciente.

Los siguientes ejemplos se dan a título ilustrativo y no limitativo.

EJEMPLOS

Efecto protector de combinaciones de drogas en modelos de ELA.

Las terapias de combinación de acuerdo con la presente invención se ensayan *in vitro*, en células corticales de rata, en un modelo de co-cultivo músculo-nervio, e *in vivo*, en un modelo de ratón de ELA. Los protocolos y resultados se presentan en esta sección.

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del Instituto Nacional de Salud (NIH) para el cuidado y uso de animales de laboratorio, y aprobado por la Junta Nacional de Experimentación Animal.

1. Efecto protector contra la toxicidad del glutamato en cultivos primarios de células neuronales.

La toxicidad del glutamato está implicada en la patogénesis de la ELA. En este conjunto de experimentos, los compuestos candidatos se han ensayado en cuanto a su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos del glutamato en las células neuronales. Los fármacos primero se prueban individualmente, seguidos por los ensayos de su acción combinatoria.

Preparación celular neuronal

La eficacia de las combinaciones de los fármacos de la invención se evaluó primero en células neuronales corticales primarias.

Las neuronas corticales de rata se cultivaron como se describe en Singer et al. (38). Brevemente, ratas hembra embarazadas de 15 días de gestación fueron sacrificadas por dislocación cervical (Ratas Wistar) y los fetos fueron retirados del útero. La corteza se retiró y se colocó en medio frío de Leibovitz (L15) que contenía 2% de penicilina 10.000 U/ml y estreptomycin 10 mg/ml y 1% de albúmina de suero bovino (BSA). Los cortices se disociaron por tripsina durante 20 minutos a 37°C (0,05%). La reacción se detuvo mediante la adición de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía DNase grado II y 10% de suero fetal de ternera (FCS). Las células se disociaron entonces mecánicamente por 3 pasos en serie a través de una pipeta de 10 ml y se centrifugaron a 515 x g durante 10 minutos a + 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento de células se resuspendió en un

medio de cultivo definido que consistía en Neurobasal suplementado con B27 (2%), L-glutamina (0,2 mM), 2% de solución PS y 10 ng/ml de BDNF. Las células viables se contaron en un citómetro de Neubauer usando la prueba de exclusión de azul de tripano. Las células se sembraron a una densidad de 30.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (los pocillos se pre-recubrieron con poli-L-lisina (10 µg/ml)) y se cultivaron a + 37°C en una atmósfera de aire humidificado (95%)/CO₂ (5%).

Ensayos de toxicidad del glutamato

El efecto neuroprotector de los compuestos se evaluó mediante la cuantificación de la red de neuritas (inmunotinción de neurofilamentos (NF)) que revela específicamente las neuronas glutamatérgicas.

Después de 12 días de cultivo neuronal, los fármacos de las combinaciones candidatas se resolvieron en medio de cultivo (+ 0,1% de DMSO). Las combinaciones candidatas se preincubaron entonces con las neuronas durante 1 hora antes de la lesión por glutamato. Una hora después de la incubación, se añadió glutamato durante 20 min, a una concentración final de 40 µM, en presencia de combinaciones candidatas, con el fin de evitar diluciones de fármaco adicionales. Al final de la incubación, el medio se cambió con el medio con la combinación candidata pero sin glutamato. El cultivo se fijó 24 horas después de la lesión con glutamato. MK801 (maleato de dizocilpinehidrógeno, 77086-22-7 - 20 µM) se utilizó como un control positivo.

Después de la permeabilización con saponina (Sigma), las células se bloquearon durante 2 horas con PBS que contenía suero de cabra al 10%, después se incubaron las células con anticuerpo primario monoclonal de ratón contra anticuerpo Neurofilament (NF, Sigma). Este anticuerpo se reveló con IgG anti-ratón de cabra Alexa Fluor 488.

Los núcleos de las células se marcaron mediante un marcador fluorescente (Hoechst solución, SIGMA), y red de neurita cuantificada. Se utilizaron seis pozos por condición para evaluar la supervivencia neuronal en 3 cultivos diferentes.

Resultados

Todas las combinaciones de fármacos probadas dan un efecto protector frente a la toxicidad del glutamato para las células neuronales corticales. Los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Como se ejemplifica en las figuras 1, 3 y 4, las combinaciones de la invención protegen fuertemente a las neuronas de la toxicidad del glutamato bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente. Es de notar que se observa una protección eficaz usando concentraciones de fármaco en las que los fármacos usados solos no tienen un efecto protector significativo o tienen uno menor.

De hecho, como se ejemplifica en la figura 3, la combinación de mexiletina - cinacalcet protege eficazmente las células neuronales de la toxicidad del glutamato, mientras que no se proporciona protección por los fármacos individuales. La combinación de baclofeno - acamprosato (figura 1) da un efecto protector contra la toxicidad del glutamato para las células neuronales corticales. La combinación de baclofeno y acamprosato induce una mejora de más del 200% en comparación con el acamprosato solo y más del 47% en comparación con el baclofeno usado solo.

Tabla 2

Combinación de fármacos	Efecto neuroprotector frente a la toxicidad del glutamato
baclofeno y torasemida	+
baclofeno-acamprosato-torasemida	+
mexiletina y cinacalcet	+
sulfisoxazol y torasemida	+
baclofeno y acamprosato	+
acamprosato y cinacalcet	+
baclofeno y cinacalcet	+

2. Efecto protector frente a la toxicidad del glutamato en cultivos primarios de co-cultivo de músculo-nervio

Cocultivos primarios de células nerviosas y musculares

El músculo humano se prepara de acuerdo con un método previamente descrito a partir de porciones de biopsia de un sujeto sano (39). Las células musculares se establecen a partir de células disociadas (20.000 células por pocillo), se recubren en placas revestidas con gelatina al 0,1% en placas de 48 pocillos y se cultivan en un medio proliferante que consiste en una mezcla de 75% de medio MEM con 25% de medio M199 suplementado con Glutamina 2 mM,

5

Inmediatamente después de la fusión de células satelitales, se colocan en la monocapa muscular (un explante por pocillo, en el área central) cortes transversales enteros de médulas espinales de embriones de ratas Wistar de 13 días de edad con 4 ganglios de raíz dorsal (DRG). Los DRG son necesarios para lograr una buena relación de innervaciones. Los cultivos innervados se mantienen en un medio mixto (75% de MEM con 25% de M199), suplementado con glutamina 2 mM, FCS al 5%, insulina bovina 5 µg/ml y 2% de penicilina 10.000 U/ml y estreptomycin (10 mg/ml).

10

Después de 24h de co-cultivo, se observan neuritas que crecen fuera de los explantes de la médula espinal. Hacen contactos con los miotubos e inducen las primeras contracciones después de unos 8 días. Rápidamente después de esto, las fibras musculares innervadas localizadas en la proximidad de los explantes de la médula espinal se contraen virtualmente continuamente. Las fibras innervadas son morfológicamente y espacialmente distintas de las no innervadas y se pueden distinguir fácilmente de ellas.

15

Lesión por glutamato

El día 27, los co-cultivos se incuban con compuestos candidatos, combinación de los mismos o riluzol una hora antes de la intoxicación con glutamato (60 µM) durante 20 min. A continuación, se lavan los co-cultivos y se añaden los compuestos candidatos, la combinación de los mismos y/o el riluzol durante 48 horas adicionales. Después de este tiempo de incubación, los cocultivos no fijados se incuban con α -bungarotoxina acoplada con Alexa 488 a una concentración de 500 nmol/l durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los cocultivos se fijan por PFA durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la permeabilización con 0,1% de saponina, los cocultivos se incuban con un anticuerpo monoclonal anti-neurofilamento de ratón (NF, dilución 1/400).

20

25

Estos anticuerpos se detectan con IgG anti-ratón de cabra Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, dilución 1/400), los núcleos de las neuronas se marcan con un marcador fluorescente (solución Hoechst, 1 µg/ml en la misma solución).

Los puntos finales son (1) la longitud total de la neurita, (2) el número de unidades motoras, (3) el área total de la unidad motora, que son indicativos de la supervivencia y funcionalidad de la neurona motora.

30

Para cada condición, se toman 2 x 10 imágenes por pocillo usando InCell Analyzer™ 1000 (GE Healthcare) con una ampliación de 20x. Todas las imágenes se toman en las mismas condiciones.

Lesión por glutamato con pre-tratamiento de riluzol

El día 23 (es decir, 4 días de pretratamiento), los co-cultivos se incuban con riluzol. Después de 4 días (es decir, el día 27), las combinaciones de fármacos se añaden una hora antes de la adición de glutamato y luego se añade glutamato (60 µM) durante 20 min. Los cocultivos se tratan a continuación para el análisis de inmunofluorescencia como se ha indicado anteriormente.

35

Resultados

Se observa una protección significativa para los tres puntos finales cuando los fármacos se usan en combinación, en concentraciones donde, cuando se usan solos, no se observa ningún efecto. Las combinaciones de fármacos probados se enumeran en la Tabla 3 y se ejemplifican en la Figura 2. Este efecto sinérgico inesperado permite el uso de fármacos a dosis tan bajas que se deben superar los efectos secundarios potenciales.

40

Tabla 3

Combinación de fármacos	Efecto protector frente a la intoxicación por glutamato en los co-cultivos musculares y nerviosos
baclofeno y cinacalcet	+
cinacalcet y acamprosato	+
baclofeno-torasemida	+
baclofeno-acamprosato-torasemida	+

Combinación de fármacos	Efecto protector frente a la intoxicación por glutamato en los co-cultivos musculares y nerviosos
mexiletina y cinacalcet	+
sulfisoxazol y torasemida	+
baclofeno y acamprosato	+

Las combinaciones de fármacos de la invención mejoran el efecto protector del riluzol frente a la toxicidad del glutamato, en el modelo in vitro, para los tres puntos extremos (Tabla 4).

Tabla 4

Combinación de fármacos	Mejora del efecto protector del riluzol frente a la intoxicación con glutamato en los co-cultivos de músculo/nervio
baclofen-cinacalcet-riluzol	+
cinacalcet - acamprosato - riluzol	+
baclofen-torasemida-riluzol	+
baclofeno-acamprosato-torasemida-riluzol	+
mexiletina-cinacalcet-riluzol	+
sulfisoxazol-torasemida-riluzol	+
baclofeno-acamprosato-riluzol	+

5

Los inventores han descubierto que las combinaciones de la invención potencian el efecto protector de riluzol en el modelo de co-cultivo músculo/nervio. De hecho, la adición de baclofeno-acamprosato a las células intoxicadas con glutamato tratado con riluzol da como resultado una mejora de la protección proporcionada a las células. Además, como se muestra en la figura 5, los inventores han sido capaces de identificar concentraciones de fármaco en las

10

Como se ilustra en la figura 6, las combinaciones de fármacos de la invención actúan sinérgicamente con riluzol para proteger las uniones neuromusculares frente a la toxicidad del glutamato. Debe tenerse en cuenta que, usado a una dosis escasamente eficiente (36 nM y 0,14 nM de baclofeno y acamprosato, respectivamente), la adición de mezcla de baclofeno-acamprosato en el medio de cultivo de células tratadas con riluzol da como resultado casi la duplicación (o incluso más) del efecto protector de riluzol contra las lesiones por glutamato.

15

De este modo, las composiciones de la invención son también particularmente eficaces como terapia adyuvante para otros tratamientos de ELA (más particularmente, riluzol) o tratamientos candidatos de ELA.

3. Las terapias combinadas son eficientes en el modelo ELA de ratón

Se han elegido ratones heptógenos transgénicos B6SJL-Tg (SOD1-G93A)IGur/ratones J y ratones WT (cepa 1012, JAX) para imitar la ELA en este conjunto de experimentos. Los ratones enfermos expresan el transgén SOD1-G93A, diseñado con un gen humano SOD1 mutante (una sola sustitución de aminoácido de glicina a alanina en el codón 93) impulsado por su promotor SOD1 humano endógeno.

20

Los animales se alojan a una temperatura estándar ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y en un ambiente controlado por la luz (encendidas de 7 am a 8 pm) con acceso ad libitum a alimentos y agua. A partir de la edad de 100 días, todos los ratones G93A SOD1 reciben alimento en polvo húmedo (dieta estándar de laboratorio mezclada con agua para formar una pasta) y gel nutricional colocado en la jaula. Además, los chorros de agua están equipados con extensiones para permitir a los ratones acceder fácilmente desde el nivel del piso.

25

Administración de fármacos

Los ratones fueron dosificados con el tratamiento de fármaco candidato diluido en el vehículo a partir del día 60 después del nacimiento hasta que los ratones alcanzaron los 150 días de edad. Las disoluciones diluidas de fármacos candidatos se preparan con agua a temperatura ambiente justo antes del comienzo de la administración.

30

Tanto el riluzol como las combinaciones de fármacos se administran per os. La ciclodextrina se utiliza como vehículo a la concentración final del 5%, diluida en agua a temperatura ambiente a partir de la solución madre (ciclodextrina al 20%). El tratamiento con combinaciones de fármacos (10 ml/kg) y vehículo comienza a la edad de 60 días y continúa hasta que los ratones alcanzan los 150 días de edad. Las combinaciones de fármacos se administraron p.o. BID entre 8-11 am y 4-7 pm.

Configuración experimental de ratones

Al establecer grupos para el estudio (es decir, elemento de ensayo o de control tratados), los ratones transgénicos se distribuyen al azar en grupos de manera que camadas completas de ratones no terminan en un solo grupo de ensayo, evitando así los efectos de camada en los resultados globales. Además, los grupos están igualmente equilibrados en la relación machos/hembras.

Los ratones hembra se alojan en grupos de 5 ratones máximos y los machos son alojados individualmente. Se deja que los ratones se aclimaten a la sala experimental durante al menos una hora antes del comienzo de cualquier experimento. Los ratones son transportados de la sala de la colonia a los cuartos experimentales en sus jaulas habituales.

Peso corporal

La pérdida de peso ha demostrado correlacionarse bien con el desarrollo de la enfermedad y se califica fácilmente conjuntamente con las etapas de la enfermedad. Los ratones serán pesados una vez a la semana el mismo día de cada semana (lunes) a la edad de 60-91 días y tres veces a la semana (de lunes a miércoles) después de que lleguen a la edad de 91 días (13 semanas).

Puntuación clínica

El elemento original (40) que describe la generación de los ratones SOD1-G93A informa de un inicio temprano de la enfermedad (~100 días) y una disminución rápida con los ratones afectados llegando a la etapa final en promedio en 40 días (supervivencia típica 130-150 días). Por lo tanto, los ratones se examinan cuidadosamente usando la puntuación clínica como se describe a continuación una vez por semana (lunes) hasta la edad de 91 días y tres veces a la semana (de lunes a miércoles) después de que lleguen a la edad de 91 días.

Los signos clínicos más tempranos son temblores y sacudidas de sus extremidades cuando los ratones son suspendidos brevemente en el aire por sus colas. El sistema de puntuación clínica está en una escala de 1 a 5; con 1 como punto final para la eutanasia y 5 como saludable con pocos o ningún signo de aparición de la enfermedad. Los animales se puntúan levantándolos suavemente por la base de sus colas y observándolos según los temblores, rigidez y su capacidad para extender sus extremidades.

Sistema de puntuación: 5 = saludable

- 4-5 = mayormente sanos, temblores menores, muy activos, extensión de todos los miembros

- 4 = temblores menores visibles, extensión de todos los miembros, muy activos

- 3-4 = temblores, con alguna rigidez menor, muy activos

- 3 = temblores, rigidez de los miembros, tal vez alguna parálisis menor, activos

- 2-3 = temblores, parálisis parcial, rigidez, la extensión de los miembros es forzada, activos

- 2 = parálisis, algo activos

- 1-2 = parálisis de las extremidades posteriores, sin extensión de las extremidades posteriores, se puede realizar la eutanasia dependiendo de la actividad del animal y su capacidad de enderezarse a los 30 segundos.

- 1 = punto final, animal incapaz de enderezarse.

El inicio de la enfermedad se registra cuando la puntuación llega a una etapa de la enfermedad de 4.

Pruebas conductuales

Todas las pruebas de comportamiento se detienen a la edad de 20 semanas cuando aproximadamente el 70% de los ratones TG del grupo vehículo se pierden. Después de esta edad los ratones restantes son demasiado frágiles para la prueba motora y sólo se someten a la medición del peso corporal, la etapa de la enfermedad y la puntuación de supervivencia.

Prueba de campo abierto

Se realizan mediciones de pruebas de campo abierto antes de comenzar la dosificación (línea de base) y alrededor del día 90 (13ª semana de edad) y el día 110 (16ª semana de edad). Los ratones nacidos a los 2-4 días se agrupan para pruebas en campo abierto. Las cámaras de actividad (Med Associates Inc, St Albans, VT, 27 x 27 x 20,3 cm) están equipadas con haces IR. Los ratones se colocan en el centro de la cámara y su comportamiento se registra durante 10 min. Se registran la distancia movida, el número de levantamientos verticales y la velocidad promedio.

Rotarod

La prueba de Rotarod se realiza antes de comenzar la dosificación (línea de base) y alrededor del día 90 (13ª semana de edad) y día 110 (16ª semana de edad): Los ratones nacidos a los 2-4 días se agrupan para las pruebas de campo abierto. Una sesión de un día incluye un ensayo de entrenamiento de 5 min a 4 RPM en el aparato rotarod (AccuScan Instruments, Columbus, EE.UU.). Una hora más tarde, los animales se ensayan durante 3 ensayos de aceleración consecutivos de 6 minutos con la velocidad cambiando de 0 a 40 RPM durante 360 segundos y un intervalo entre ensayos de al menos 30 minutos. Se registra la latencia a caer de la varilla. Los ratones que permanecen en la varilla durante más de 360 segundos se retiran y su tiempo se anota como 360 segundos.

Resultados

Las terapias de combinación son eficientes en el modelo de ELA in vivo.

Se observa una mejora de la enfermedad para los animales enfermos tratados con las combinaciones de fármacos de la invención. En particular, las combinaciones de fármacos de la invención mejoran eficazmente la puntuación clínica de estos animales durante las diferentes etapas de la enfermedad (Tabla 5) y también los resultados en las pruebas de comportamiento anteriores (Tabla 6).

Tabla 5

Combinación de fármacos	Mejora de la puntuación clínica global
baclofeno y cinacalcet	+
cinacalcet y acamprosato	+
baclofeno-torasemida	+
baclofen-acamprosato-torasemida	+
mexiletina y cinacalcet	+
sulfisoxazol y torasemida	+
baclofeno y acamprosato	+

Tabla 6

Combinación de fármacos	Pruebas conductuales	
	Mejora de los resultados	
	prueba de rotarod	prueba de campo abierto
baclofeno y cinacalcet	+	+
cinacalcet y acamprosato	+	+
baclofeno-torasemida	+	+
baclofeno-acamprosato-torasemida	+	+
mexiletina y cinacalcet	+	+
sulfisoxazol y torasemida	+	+
baclofeno y acamprosato	+	+

Las composiciones de la invención son también eficientes para mejorar la puntuación clínica y el curso de la enfermedad en animales tratados con riluzol (Tabla 7).

Tabla 7

Combinación de fármacos	Mejora de la puntuación clínica global en animales tratados con riluzol
baclofeno y cinacalcet	+
cinacalcet y acamprosato	+
baclofeno-torasemida	+
baclofen-acamprosato-torasemida	+
mexiletina y cinacalcet	+
sulfisoxazol y torasemida	+
baclofeno y acamprosato	+

5

Referencias

- 1 - Camu W, Khoris J, Moulard B, Salachas F, Briolotti V, Rouleau GA, Meininger V, Genetics of familial ALS and consequences for diagnosis. French ALS Research Group. J Neurol Sci. 1999; 165 Suppl 1(S21-26)
- 2 - Mitchell JD, Borasio GD, Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 2007; 369(9578):2031-41.
- 3 - Phukan J, Pender NP, Hardiman O, Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. Lancet Neurol. 2007; 6(11):994-1003.
- 4 - Hammad M, Silva A, Glass J, Sladky JT, Benatar M, Clinical, electrophysiologic, and pathologic evidence for sensory abnormalities in ALS. Neurology. 2007; 69(24):2236-42.
- 5 - Yoshida S, Kihira T, Yase Y, Etiology of Kii ALS/PDC, featuring a mineral hypothesis. Rinsho Shinkeigaku. 2007; 47(11):970-3.
- 6 - Waring SC, Esteban-Santillan C, Reed DM, Craig UK, Labarthe DR, Petersen RC, Kurland LT, Incidence of amyotrophic lateral sclerosis and of the parkinsonism-dementia complex of Guam, 1950-1989. Neuroepidemiology. 2004; 23(4):192-200.
- 7 - Sapp PC, Rosen DR, Hosler BA, Esteban J, McKenna-Yasek D, O'Regan JP, Horvitz HR, Brown RH Jr, Identification of three novel mutations in the gene for Cu/Zn superoxide dismutase in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. Neuromuscul Disord. 1995; 5(5):353-7.
- 8 - Hentati A, Ouahchi K, Pericak-Vance MA, Nijhawan D, Ahmad A, Yang Y, Rimmler J, Hung W, Schlotter B, Ahmed A, Ben Hamida M, Hentati F, Siddique T, Linkage of a commoner form of recessive amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 15q15-q22 markers. Neurogenetics. 1998; 2(1):55-60.
- 9 - Ruddy DM, Parton MJ, Al-Chalabi A, Lewis CM, Vance C, Smith BN, Leigh PN, Powell JF, Siddique T, Meyjes EP, Baas F, de Jong V, Shaw CE, Two families with familial amyotrophic lateral sclerosis are linked to a novel locus on chromosome 16q. Am J Hum Genet. 2003; 73(2):390-6.
- 10 - Pasinelli P, Brown RH, Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. Nat Rev Neurosci. 2006; 7(9):710-23.
- 11 - Gurney ME, Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med. 1994; 331(25):1721-2.
- 12 - Deng HX, Shi Y, Furukawa Y, Zhai H, Fu R, Liu E, Gorrie GH, Khan MS, Hung WY, Bigio EH, Lukas T, Dal Canto MC, O'Halloran TV, Siddique T, Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103(18):7142-7.
- 13 - Cai H, Lin X, Xie C, Laird FM, Lai C, Wen H, Chiang HC, Shim H, Farah MH, Hoke A, Price DL, Wong PC, Loss of ALS2 function is insufficient to trigger motor neuron degeneration in knock-out mice but predisposes neurons to oxidative stress. J Neurosci. 2005; 25(33):7567-74.

35

- 14 - Comi GP, Bordoni A, Salani S, Franceschina L, Sciacco M, Prella A, Fortunato F, Zeviani M, Napoli L, Bresolin N, Moggio M, Ausenda CD, Taanman JW, Scarlato G, Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease. *Ann Neurol*. 1998; 43(1):110-6.
- 5 15 - Borthwick GM, Taylor RW, Walls TJ, Tonska K, Taylor GA, Shaw PJ, Ince PG, Turnbull DM, Motor neuron disease in a patient with a mitochondrial tRNA^{Ala} mutation. *Ann Neurol*. 2006; 59(3):570-4.
- 10 16 - Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P, VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet*. 2003; 34(4):383-94.
- 17 - Bigio EH, Lipton AM, White CL 3rd, Dickson DW, Hirano A. Frontotemporal and motor neurone degeneration with neurofilament inclusion bodies: additional evidence for overlap between FTD and ALS. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2003 Jun;29(3):239-53.
- 15 18 - Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 1996;347:1425-1431.
19. Ettmayer P, Amidon GL, Clement B, Testa B, Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J Med Chem*, 2004. 47(10): p. 2393-404.
- 20 20. Beaumont K, Webster R, Gardner I, Dack K Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr Drug Metab*, 2003. 4(6): p. 461-85.
21. Yang CY, Dantzig AH, and Pidgeon C, Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm Res*. 1999. 16(9): p. 1331-43.
22. Steffansen, B., Nielsen CU, Brodin B, Eriksson AH, Andersen R, Frokjaer S, Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur J Pharm Sci*, 2004. 21(1): p. 3-16.
- 25 23. Heimbach T, Oh DM, Li LY, Rodríguez-Hornedo N, Garcia G, Fleisher D, Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *Int J Pharm*, 2003. 261(1-2): p. 81-92.
24. Stella, BORCHARDT R, HAGEMAN M, OLIYAI R, MAAG H, TILLEY J, Prodrugs: Challenges and Rewards. Vol. 1-2. 2007, New York: AAPS Press and Springer.
- 30 25. Wermuth CG, Designing prodrugs and bioprecursors, in *The Practice of Medicinal Chemistry*, Hardbound, Editor. 2003.
26. Pezron I, Mitra AK, Duvvuri S, Tiruchera GS, Prodrug strategies in nasal drug delivery. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2002. 12(3): pp. 331-340(10).
27. Stella, V.J., Prodrugs as therapeutics *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2004. 14(3): p. pp. 277-280(4).
- 35 28. Higuchi T, Stella VJ, Prodrugs As Novel Drug Delivery Systems. ACS Symposium Series., ed. A.C. Society. 1975, Washington, DC.
29. Roche EB, Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs. 1977, Washington, DC American Pharmaceutical Association.
30. Stella VJ, Nti-Addae KW, Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007. 59(7): p. 677-94.
- 40 31. Lal R, Sukbuntherng J, Tai EH, Upadhyay S, Yao F, Warren MS, Luo W, Bu L, Nguyen S, Zamora J, Peng G, Dias T, Bao Y, Ludwikow M, Phan T, Scheuerman RA, Yan H, Gao M, Wu QQ, Annamalai T, Raillard SP, Koller K, Gallop MA, Cundy KC, Arbaclofen placarbil, a novel R-baclofen prodrug: improved absorption, distribution, metabolism, and elimination properties compared with R-baclofen. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. 330(3): p. 911-21.
- 45 32. Xu F, Peng G, Phan T, Dilip U, Chen JL, Chernov-Rogan T, Zhang X, Grindstaff K, Annamalai T, Koller K, Gallop MA, Wustrow DJ, Discovery of a novel potent GABA(B) receptor agonist. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011. 21(21): p. 6582-5.
33. Hanafi R, Mosad S, Abouzid K, Niess R, Spahn-Langguth H., Baclofen ester and carbamate prodrug candidates: a simultaneous chromatographic assay, resolution optimized with DryLab. *J Pharm Biomed Anal*, 2011. 56(3):569-76.
- 50 34. Leach AR, Gillet VJ, An Introduction to Chemoinformatics. 2007: Springer.

35. Rahman SA, Bashton M, Holliday GL, Schrader R, Thornton JM, Small Molecule Subgraph Detector (SMSD) toolkit. *J Cheminform*, 2009. 1(1): p. 12.
36. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, Gautam B, Hassanali M, DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res*, 2008. 36(Database issue): p. D901-6.
- 5 37. Stahl, H. and C.G. Wermuth, *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*. 2 ed. 2011: Wiley-VCH.
38. Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, and Dorsa DM Mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neuroscience*, 1999. 19(7):2455-2463.
- 10 39. Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Wartera JM, Poindron P. Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord-human muscle cocultures. *Volume 136, Issues 1-2, March 1996, Pages 17-23*.
40. Gurney M, Pu H, Chiu A, Dal Canto M, Polchow C, Alexander D, Caliendo J, Hentati A, Kwon Y, Deng H, Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 1994 Jun 17; 264(5166):1772-5.
- 15

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica ("ELA") o un trastorno relacionado seleccionado de Esclerosis Lateral Primaria (ELP), Atrofia Muscular Progresiva (AMP), Parálisis Pseudobulbar y Parálisis Bulbar Progresiva (PBP) y Demencia Fronto Temporal (DFT), que comprende (i) acamprosato, o una sal del mismo, o una formulación de liberación sostenida del mismo, y (ii) baclofeno, o una sal del mismo, o una formulación de liberación sostenida del mismo.
2. La composición para uso de la reivindicación 1, que además comprende torasemida o una sal del mismo, o una formulación de liberación sostenida del mismo.
3. La composición para uso de la reivindicación 1 ó 2, que comprende además riluzol, o una sal del mismo, o una formulación de liberación sostenida del mismo.
4. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
5. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los compuestos se formulan o administran juntos, por separado o secuencialmente.
6. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición se administra repetidamente al sujeto.
7. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en la que el riluzol se administra en una dosificación de 0,01 a 100 mg por día, preferiblemente de 0,1 a 50 mg por día.
8. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el acamprosato se administra en una dosificación de menos de 50 mg por día, más preferiblemente menos de 10 mg por día.
9. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el baclofeno se administra en una dosis de menos de 30 mg por día.
10. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición se administra oralmente.
11. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha composición se administra oralmente y repetidamente cada dos días, alternativamente con riluzol.
12. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los compuestos se formulan juntos.
13. Acamprosato, o una sal del mismo, o una formulación de liberación sostenida del mismo, para uso en combinación con baclofeno, o una sal del mismo, o una formulación de liberación sostenida de los mismos, en un método de tratamiento de ELA o un trastorno relacionado seleccionado de Esclerosis Lateral Primaria (ELP), Atrofia Muscular Progresiva (AMP), Parálisis Pseudobulbar y Parálisis Bulbar Progresiva (PBP) y Demencia Fronto Temporal (DFT).
14. Acamprosato, o una sal del mismo, o una formulación de liberación sostenida del mismo, para uso en combinación con baclofeno o una sal del mismo, o una formulación de liberación sostenida del mismo, y riluzol, o una sal del mismo, o una formulación de liberación sostenida del mismo, en un método de tratamiento de la ELA o un trastorno relacionado seleccionado de Esclerosis Lateral Primaria (ELP), Atrofia Muscular Progresiva (AMP), Parálisis Pseudobulbar y Parálisis Bulbar Progresiva (PBP) y Demencia Fronto Temporal (DFT).

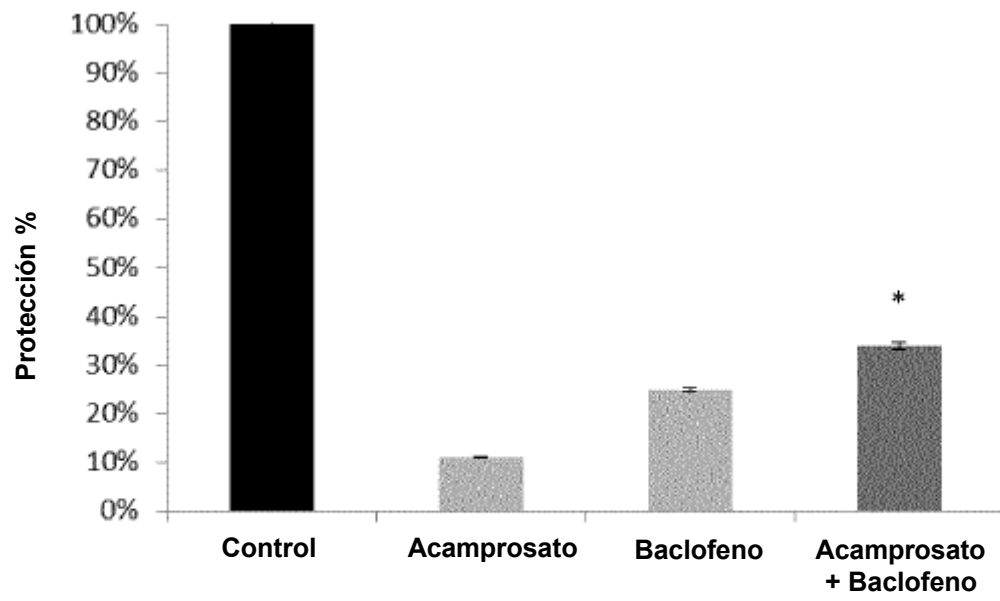


Figura 1

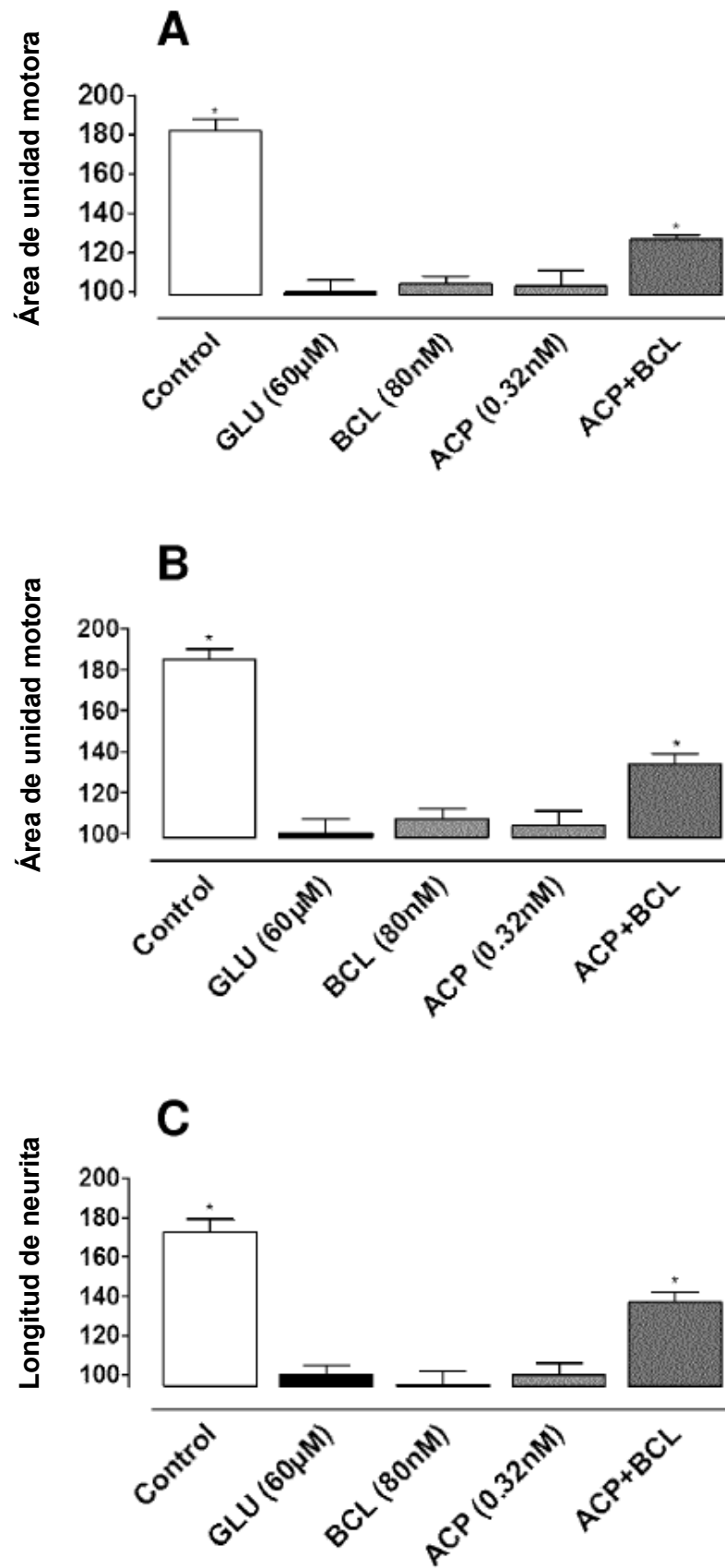


Figura 2

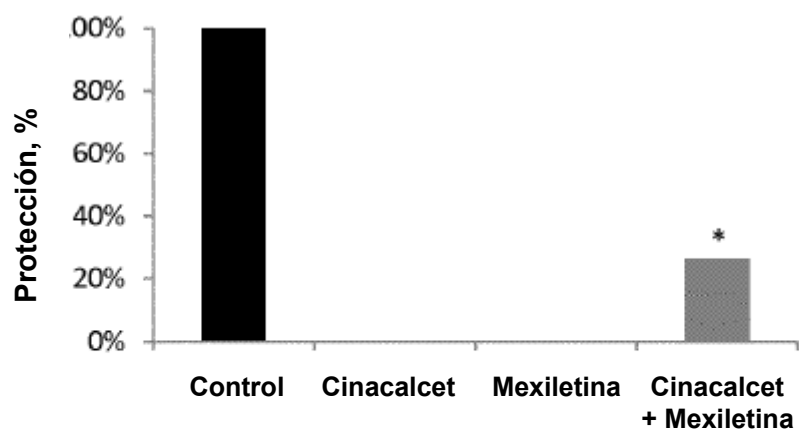


Figura 3

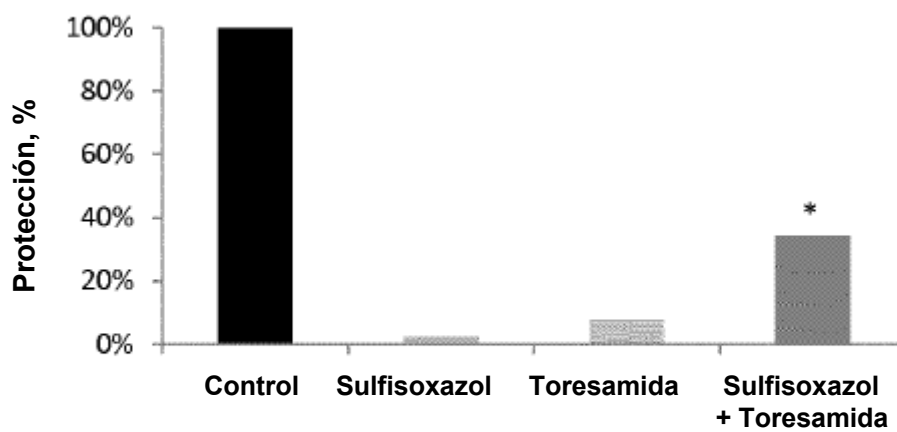


Figura 4

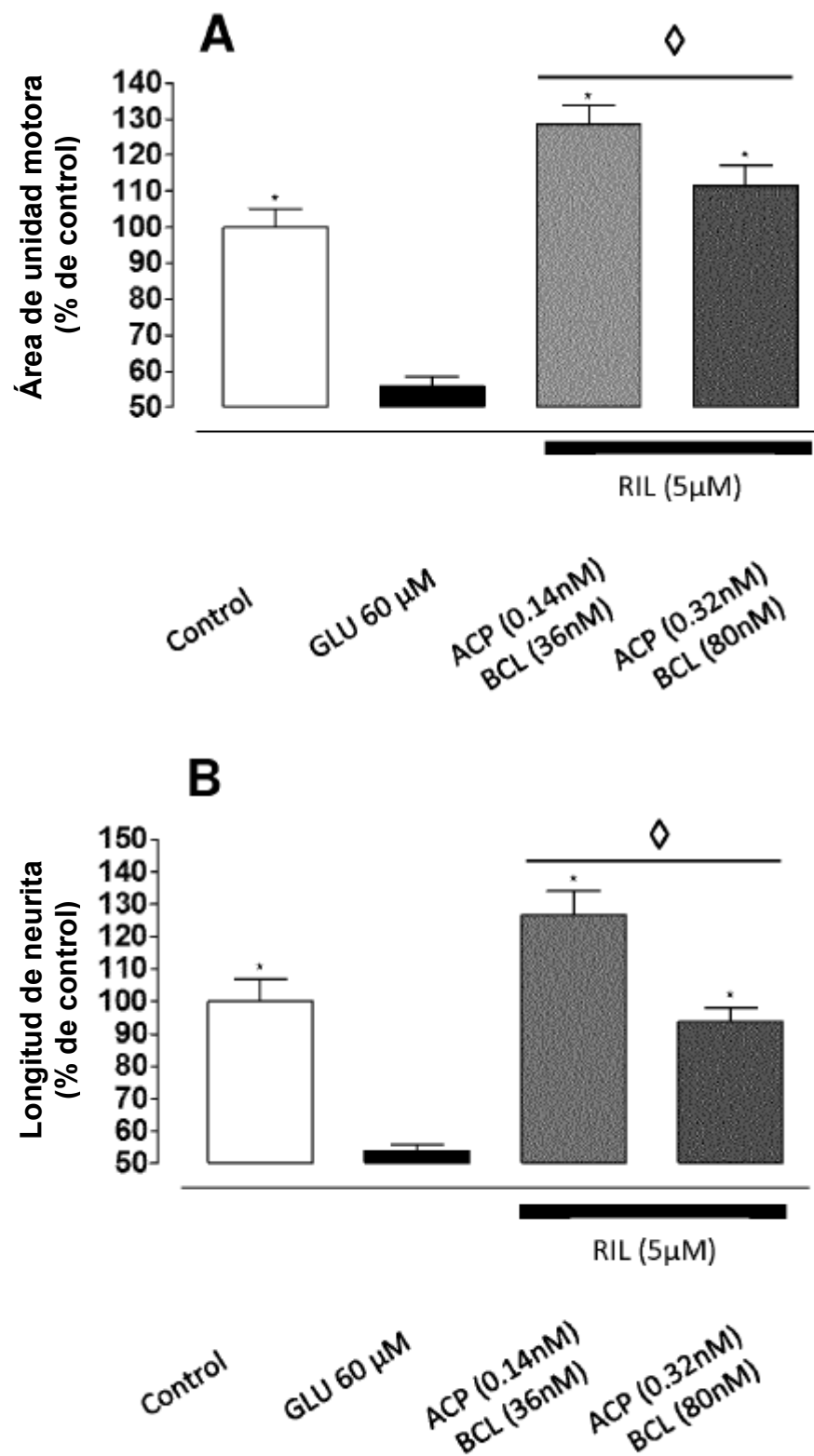


Figura 5

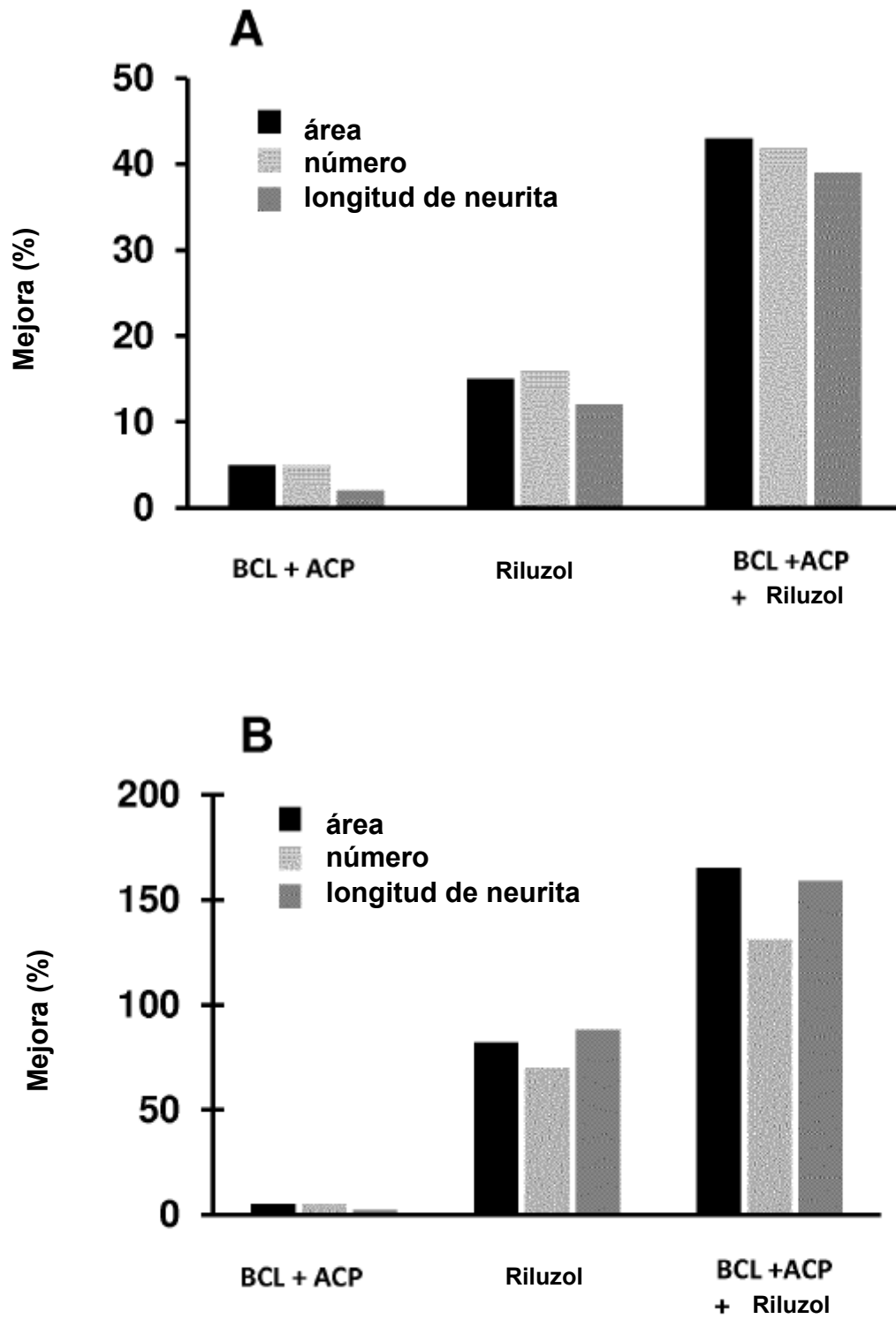


Figura 6