



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 330 184**

⑫ Número de solicitud: 200801733

⑬ Int. Cl.:
A61K 31/40 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **03.06.2008**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **04.12.2009**

Fecha de la concesión: **16.06.2010**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
01.06.2010

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **05.07.2010**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
05.07.2010

⑲ Titular/es: **NEURON BIOPHARMA, S.A.**
PTS; Avda. de la Innovación, 1
18100 Armilla, Granada, ES

⑳ Inventor/es: **Burgos Muñoz, Javier Santos;**
Ramírez Moreno, Carlos y
Velasco Álvarez, Javier

㉑ Agente: **Arias Sanz, Juan**

㉒ Título: **Uso de estatinas como anticonvulsivantes, antiepilépticos y neuroprotectores.**

㉓ Resumen:

Uso de estatinas como anticonvulsivantes, antiepilépticos y neuroprotectores.

Se describe el empleo de estatinas como compuestos antiepilépticos, anticonvulsivantes, neuroprotectores y antioxidantes, potencialmente útiles para la prevención y/o el tratamiento de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas, o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada.

ES 2 330 184 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso de estatinas como anticonvulsivantes, antiepilépticos y neuroprotectores.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con la utilización de estatinas como compuestos antiepilépticos, anticonvulsivantes, neuroprotectores y antioxidantes en procesos neurodegenerativos o asociados a la edad, potencialmente útiles para la prevención y/o el tratamiento de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas, o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada.

Antecedentes de la invención

La epilepsia es una enfermedad crónica caracterizada por convulsiones recurrentes sin causa aparente. Estas convulsiones son transitorias y ocurren como consecuencia de una actividad neuronal sincrónica o excesiva del cerebro. No obstante, por extensión, el término “epilepsia” incluye un conjunto de enfermedades caracterizadas por una amplia variedad de síntomas, siendo común a todas ellas una actividad eléctrica episódica anormal en el cerebro que causa convulsiones.

Los medicamentos actualmente utilizados para la prevención y/o tratamiento de la epilepsia (antiepilépticos) se basan fundamentalmente en compuestos inhibidores de canales iónicos (de voltaje y asociados a receptores neuronales); no obstante, la utilización de tales fármacos provoca efectos secundarios graves en los pacientes que afectan al sistema nervioso central, tales como ataxia, diplopia (visión doble), descoordinación motora, hiperactividad, etc., por lo que existe la necesidad de encontrar nuevos compuestos útiles para el tratamiento de la epilepsia. Ventajosamente, la seguridad y eficacia de dichos compuestos debería ser igual o superior a la de los antiepilépticos habitualmente utilizados en el tratamiento de la epilepsia.

Ahora se ha encontrado que las estatinas pueden ser utilizadas como agentes anticonvulsivantes y antiepilépticos en la prevención y/o tratamiento de la epilepsia, las crisis epilépticas y las convulsiones.

Las estatinas son inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis del colesterol, y habitualmente se utilizan para disminuir los altos niveles de colesterol asociados a las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Las indicaciones terapéuticas de las estatinas se han ido ampliando a lo largo de los años. De hecho, estos compuestos no sólo se utilizan para disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos sino también para reducir el riesgo de infarto de miocardio y de muerte coronaria. Además, se están asociando nuevas propiedades a las estatinas, especialmente a nivel de daño cerebral causado por trauma o en demencias. Se han propuesto propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Pahan, *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63[10]:1165-78). Adicionalmente, se ha demostrado que la simvastatina intensifica la capacidad de memoria y aprendizaje en ratones (Ling *et al.*, *Ann Neurol.* 2006; 60[6]:729-39). Asimismo, se ha descrito su potencial empleo como agente antineoplásico y como agente antirretroviral. También se ha descrito que algunas estatinas previenen del daño neuronal en modelos de enfermedades agudas tales como la degeneración retiniana (Nakazawa *et al.*, *J Neurochem.* 2007; 100[4]:1018-31) y el trauma o isquemia (Vaughan y Delanty, *Stroke* 1999; 30[9]:1969-73) así como en modelos *in vitro* de neuronas corticales primarias (Bosel *et al.*, *J Neurochem.* 2005; 92[6]:1386-98; Zacco *et al.* *J Neurosci.* 2003; 23[35]:11104-11).

Las estatinas, en general, son fármacos con un alto nivel de seguridad ya que se administran para disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos en bolsas muy amplias de población. De hecho, los fármacos relacionados con el control de los niveles de colesterol y de triglicéridos representan el área terapéutica con mayor éxito a nivel mundial, donde las estatinas representan un 90% del mismo, siendo los 2 fármacos más vendidos durante estos 2 últimos años la atorvastatina y la simvastatina. No obstante, algunas estatinas han sido retiradas del mercado como consecuencia de sus efectos secundarios. Así, se han documentado crisis epilépticas en algunos casos tras la administración de estatinas, concretamente, se ha documentado un episodio de rhabdomiólisis severa con convulsiones y coma tras la administración de rosuvastatina a un paciente (Lorenzoni *et al.*, *Arq Neuropsiquiatr.* 2007; 65[3B]:834-7); y, en otro caso, la administración de fluvastatina a un paciente con síndrome antifosfolipídico catastrófico produjo convulsiones focales (Miesbach *et al.*, *J Neurol Sci.* 2005; 238[1-2]:93-5).

Compendio de la invención

Los inventores ahora han encontrado que una estatina, concretamente la simvastatina, sorprendentemente, tiene propiedades antiepilépticas y anticonvulsivantes (Ejemplos 1-3), ejerce un efecto protector frente a la muerte causada por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 4), así como un efecto protector frente a la muerte neuronal en el hipocampo causada por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 5), y un efecto neuroprotector frente a la neurodegeneración, apoptosis y gliosis reactiva, causada por una sustancia excitotóxica (Ejemplos 6-8), y, además, ejerce un efecto antioxidante frente a la peroxidación lipídica causada por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 9).

Dichos ejemplos ponen de manifiesto el potencial empleo de las estatinas en la prevención y/o tratamiento de la epilepsia y las crisis convulsivas o convulsiones, así como su capacidad para proteger de la muerte neuronal asociada a

enfermedades neurodegenerativas en regiones profundas del cerebro tales como el hipocampo. Además, y, sorprendentemente, en la presente invención se muestra por primera vez *in vivo* que las estatinas son agentes anti-excitotóxicos, lo que pone de manifiesto su capacidad protectora frente al síndrome excitotóxico asociado a diferentes enfermedades neurodegenerativas crónicas (e.g., Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, *status epilepticus*, Huntington, etc.).

Por tanto, la presente invención se relaciona con el empleo de estatinas como agentes (i) antiepilépticos, (ii) anti-convulsivantes, (iii) neuroprotectores, en particular, neuroprotectores frente a enfermedades neurodegenerativas crónicas (e.g., Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, *status epilepticus*, Huntington, etc.), más concretamente, neuroprotectores frente al síndrome excitotóxico asociado a dichas enfermedades neurodegenerativas crónicas, así como neuroprotectores frente a la apoptosis y gliosis reactiva, causada por sustancias excitotóxicas, (iv) antiapoptóticos, y (v) antioxidantes en procesos neurodegenerativos o asociados a la edad.

Los resultados obtenidos pueden ser extrapolados con fines profilácticos o terapéuticos para su aplicación sobre la población de riesgo. Asimismo, debido a que las estatinas, en general, son compuestos bastante seguros, con un perfil de toxicidad relativamente bajo, su uso como fármaco resulta muy adecuado y no requiere de ensayos clínicos complejos como ocurre con otros candidatos a fármacos cuya toxicidad y seguridad se desconoce.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con el empleo de una estatina en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas, o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una estatina para la prevención y/o el tratamiento de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas, o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas, o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada, en un sujeto con necesidad de tratamiento, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficiente de una estatina.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un diagrama de barras que representa el tiempo de latencia en el comienzo de las convulsiones en los animales con los diferentes tratamientos. La gráfica muestra el tiempo post-administración del agente epiléptico al que aparece la primera convulsión en función del tratamiento.

La Figura 2 es una gráfica de dispersión XY que representa el nivel de severidad del estado epileptogénico observado según la escala de Racine (Racine, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32[3]:281-94), frente al tiempo post-inoculación de la sustancia epileptogénica (ácido kaínico o kainato o KA). La gráfica muestra la evolución del estado epileptogénico de los animales según el tratamiento recibido: PBS o simvastatina [SIM].

La Figura 3 es una gráfica de dispersión XY que representa el nivel de severidad del estado epileptogénico observado según la escala de Racine (Racine, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32[3]:281-94), frente al tiempo post-inoculación de la sustancia epileptogénica (ácido kaínico o kainato o KA). La gráfica muestra la evolución del estado epileptogénico de los animales según el tratamiento recibido: PBS o DNQX (un antagonista de kainato).

La Figura 4 es una gráfica de dispersión XY que representa el nivel de severidad del estado epileptogénico observado según la escala de Racine (Racine, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32[3]:281-94), frente al tiempo post-inoculación de la sustancia epileptogénica (ácido kaínico o kainato o KA). La gráfica muestra la evolución del estado epileptogénico de los animales según la dosis de simvastatina (SIM) administrada durante el tratamiento.

La Figura 5 es una gráfica de dispersión XY que representa el nivel de severidad del estado epileptogénico observado según la escala de Racine (Racine, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32[3]:281-94), frente al tiempo post-inoculación de la sustancia epileptogénica (ácido kaínico o kainato o KA). La gráfica muestra la evolución del estado epileptogénico de los animales según la vía de administración de simvastatina (SIM) utilizada durante el tratamiento.

La Figura 6 es una gráfica de Kaplan-Meier que muestra el índice de supervivencia de los ratones tratados con PBS y con kainato [KA] y su comparación con los ratones tratados con simvastatina [SIM] y con KA.

La Figura 7 es una composición de micrografías que muestra una región del hipocampo teñida con hematoxilina-eosina de ratones tratados con PBS y PBS, ratones tratados con PBS y con kainato [KA] y ratones tratados con simvastatina [SIM] y con KA.

La Figura 8 es una composición de micrografías que muestra una región del hipocampo teñida con Fluoro Jade B de ratones tratados con PBS y PBS, ratones tratados con PBS y con kainato [KA] y ratones tratados con simvastatina [SIM] y con KA.

La Figura 9 es una composición de micrografías que muestra una región del hipocampo teñida con Naranja de Acridina de ratones tratados con PBS y PBS, ratones tratados con PBS y con kainato [KA] y ratones tratados con simvastatina [SIM] y con KA.

La Figura 10 es una composición de micrografías que muestra una región del hipocampo marcada contra la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) de ratones tratados con PBS y PBS, ratones tratados con PBS y con kainato [KA] y ratones tratados con simvastatina [SIM] y con KA.

La Figura 11 es una composición de micrografías que muestra una región del hipocampo marcada contra HNE de ratones tratados con PBS y PBS, ratones tratados con PBS y con kainato [KA] y ratones tratados con simvastatina [SIM] y con KA.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención objeto de esta solicitud de patente, a continuación se expone el significado de algunos términos y expresiones utilizados en el contexto de la invención.

El término “estatina”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima que cataliza el paso limitante de la biosíntesis del colesterol, e incluye cualquier estatina tanto natural como sintética o semisintética, conocida o de nueva síntesis o de nuevo diseño o moléculas relacionadas; tal como aquí se utiliza, el término “moléculas relacionadas” con las estatinas, se refiere a aquellas moléculas con capacidad hipolipemiente (hipocolesterolémica o hipotrigliceridémica). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de estatinas que pueden ser utilizadas en el contexto de la presente invención incluyen atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, una monacolina (e.g., monacolina M, monacolina J, monacolina N, monacolina L, monacolina X, etc.), pitavastatina (también llamada itavastatina), pravastatina, rosuvastatina, simvastatina, etc., así como combinaciones de dos o más estatinas cualesquiera, por ejemplo, monacolinas, por ejemplo, monacolina M, monacolina J, monacolina N, monacolina L, monacolina X, etc.. o cualquier otra combinación de dos o más estatinas cualesquiera. Algunas estatinas pueden presentarse en forma cerrada (lactona) o en forma abierta (hidroxiácido). Los hidroxiácidos (forma abierta) pueden prepararse a partir de las lactonas correspondientes por hidrólisis convencional, por ejemplo, con hidróxido sódico en metanol, hidróxido sódico en tetrahidrofurano-agua y similares.

En la forma abierta (hidroxiácido), las estatinas reaccionan para formar sales con cationes de metales y aminos, farmacéuticamente aceptables, formadas a partir de bases orgánicas o inorgánicas. El término “farmacéuticamente aceptable” significa que el compuesto es tolerable fisiológicamente y no produce, en general, una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar, tal como un trastorno gástrico, mareo o similares, cuando se administra a un sujeto; preferiblemente, dicho término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno o recogido en la farmacopea estadounidense o en otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales (e.g., farmacopea europea, etc.). El término “sal metálica farmacéuticamente aceptable” contempla sales formadas con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, aluminio, hierro y zinc. El término “sal de amina farmacéuticamente aceptable” contempla sales con amoníaco y bases nitrogenadas orgánicas suficientemente fuertes para formar sales con ácidos carboxílicos. Las sales farmacéuticamente aceptables de las estatinas pueden diferir de los ácidos libres correspondientes en algunas características físicas tales como solubilidad y punto de fusión, pero se consideran equivalentes a la forma de ácido libre para los fines de esta invención. La forma abierta (hidroxiácido) libre de las estatinas puede regenerarse a partir de la forma de sal, si se desea, poniendo en contacto la sal con una solución acuosa diluida de un ácido tal como ácido clorhídrico y similares.

La forma cerrada (lactona) de las estatinas puede regenerarse por disolución de la forma abierta (hidroxiácido) en un disolvente inerte tal como, por ejemplo, tolueno, benceno, acetato de etilo y similares, a temperaturas comprendidas entre aproximadamente 0°C y aproximadamente el punto de ebullición del disolvente, típicamente (aunque no necesariamente) con separación simultánea del agua resultante y catálisis con ácidos fuertes, e.g., ácido clorhídrico y similares.

Asimismo, las estatinas pueden existir en forma solvatada o no solvatada y tales formas son equivalentes a la forma no solvatada para los fines de esta invención.

En consecuencia, tanto las formas cerradas (lactonas) como abiertas (hidroxiácidos) de las estatinas, bien en forma de ácido libre o de sal farmacéuticamente aceptable, solvatadas o no solvatadas, caen dentro del ámbito de la definición de estatina tal como se utiliza en la presente descripción.

El término “epilepsia”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un síndrome cerebral crónico de causas diversas, caracterizada por crisis recurrentes debidas a unas descargas excesivas hipersincrónicas de impulsos nerviosos por las neuronas cerebrales, asociadas eventualmente con diversas manifestaciones clínicas y paraclínicas. Las crisis pueden ser convulsivas o no convulsivas. La epilepsia puede tener muchas causas; en unos casos puede ser debida a lesiones cerebrales de distintos tipos (e.g., traumatismos craneales, secuelas de meningitis, tumores, etc.); en otros casos no hay ninguna lesión sino una predisposición de origen genético a padecer la crisis; en otros casos, la etiología de la epilepsia

puede ser ambiental, por tratamientos farmacológicos, por excitotoxicidad, trauma, procesos de estrés, envejecimiento, problemas del desarrollo, enfermedades neurológicas, crisis psicológicas, problemas en la gestación, problemas en el parto, etc.

- 5 El término “epiléptico o convulsivante”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier crisis epiléptica o convulsión de cualquier etiología, por ejemplo, genética, ambiental, por tratamientos farmacológicos, por excitotoxicidad, por trauma, por procesos de estrés, por envejecimiento, por problemas del desarrollo, por enfermedades neurológicas, por crisis psicológicas, por problemas en la gestación, por problemas en el parto, etc. Una crisis epiléptica ocurre cuando una actividad anormal eléctrica en el cerebro causa un cambio involuntario de movimiento o función del cuerpo, de
10 sensación, en la capacidad de estar alerta o de comportamiento, y pueden ser parciales o generalizadas (convulsivas o no-convulsivas).

- El término “antiepiléptico o anticonvulsivante”, tal como aquí se utiliza, se refiere a la atenuación de las crisis epilépticas o convulsivas, por ejemplo, en la duración y/o en la intensidad, o a la desaparición de las crisis epilépticas o convulsivas, o a la disminución o desaparición de sus efectos secundarios.
15

- El término “enfermedad neurodegenerativa”, tal como aquí se utiliza, incluye enfermedades que resultan de la degeneración o deterioro del tejido nervioso, en particular de las neuronas, que conduce, a lo largo del tiempo, a una disfunción o a una incapacidad; el término degeneración incluye pérdida de la viabilidad celular, pérdida de la
20 función celular y/o pérdida del número de células (neuronas y otras). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de enfermedades neurodegenerativas incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, etc. En una realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad relacionada con la muerte neuronal causada por una sustancia excitotóxica, por ejemplo, con la muerte neuronal en el hipocampo causada por una sustancia excitotóxica.

- 25 El término “neuroprotector”, tal como aquí se utiliza, se refiere a la atenuación de los efectos de la degeneración o muerte neuronal mediante cualquier mecanismo conocido o por conocer por ejemplo, necrosis, apoptosis, autofagia, daño oxidativo, deposición de subproductos, pérdida de la arquitectura celular, etc., o a la desaparición de los efectos de la degeneración o muerte neuronal mediante cualquier mecanismo conocido o por conocer por ejemplo,
30 necrosis, apoptosis, autofagia, daño oxidativo, deposición de subproductos, pérdida de la arquitectura celular, etc., o a la disminución o desaparición de sus efectos secundarios.

- El término “enfermedad asociada con una oxidación indeseada”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una enfermedad causada por una oxidación indeseada (e.g., excesiva) o en el que dicha oxidación indeseada es un síntoma. Dicha
35 oxidación indeseada puede ser la consecuencia del daño causado por radicales libres a proteínas, ADN y/o lípidos independientemente del radical libre específico implicado o de la diana. La oxidación indeseada implica una generación excesiva de radicales libres que puede causar una disfunción en células, tejidos u órganos y puede constituir, por tanto, un mecanismo potencial de una enfermedad. En una realización particular, dicha oxidación indeseada puede ser causada por la edad (envejecimiento) o por un proceso neurodegenerativo y puede provocar por sí sola o en combinación
40 con otros factores el comienzo de diversas enfermedades. En una realización concreta, dicha oxidación indeseada se relaciona con el daño oxidativo por peroxidación lipídica causada por una sustancia excitotóxica.

- El término “sujeto”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie de mamífero, e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y humanos; preferentemente, el sujeto es un ser humano, masculino
45 o femenino, de cualquier edad o raza. En una realización particular, dicho sujeto es un mamífero que padece, o es susceptible de padecer, epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, o una enfermedad neurodegenerativa, tal como una enfermedad neurodegenerativa crónica.

50 *Nuevos usos terapéuticos de las estatinas*

En un aspecto, la invención se relaciona con el empleo de una estatina en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de:

- 55 a) epilepsia,
b) crisis epilépticas,
c) convulsiones,
60 d) enfermedades neurodegenerativas, o
e) enfermedades asociadas con una oxidación indeseada.

- 65 Prácticamente cualquier estatina, tanto natural como sintética o semisintética, conocida o de nueva síntesis o de nuevo diseño o molécula relacionada, puede ser utilizada en la puesta en práctica de la presente invención. La invención contempla tanto el uso de una única estatina como de una mezcla de dos o más estatinas. En una realización particular, dicha estatina se selecciona del grupo formado por atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, me-

vastatina, monacolina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina, sus sales farmacéuticamente aceptables, y sus mezclas. Por simplicidad, el término “monacolina” se refiere a cualquiera de las monacolinas (monacolina M, monacolina J, monacolina N, monacolina L, monacolina X, etc.) aisladas así como a las mezclas de dos o más de dichas monacolinas. En una realización particular, dicha estatina es la simvastatina.

Las estatinas previamente mencionadas son compuestos conocidos, disponibles comercialmente, o bien pueden ser obtenidos por métodos convencionales, por ejemplo mediante fermentación (e.g., lovastatina, mevastatina, pravastatina, simvastatina, etc.) o mediante síntesis (e.g., atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, pitavastatina, rosuvastatina, etc.), tal como se describe, por ejemplo, en EP 409281, EP 325130, WO 84/02131, US 4231938, US 3983140, US 4346227 y EP 33538.

Numerosos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto tanto el efecto antiepiléptico de una estatina (simvastatina) frente a la acción de una sustancia excitotóxica, como su efecto neuroprotector en las neuronas del hipocampo, y su efecto antioxidante en regiones de la corteza cerebral ya que previene del daño oxidativo por peroxidación lipídica debida a la acción de una sustancia excitotóxica.

El efecto antiepiléptico de la simvastatina frente a la acción de una sustancia excitotóxica (kainato) se describe en los Ejemplos 1-3. En dichos ejemplos, se observó que el periodo de tiempo en el que aparecía la primera convulsión (latencia) en los animales a los que se les había administrado la sustancia excitotóxica y la estatina (simvastatina) era mayor que en el resto de tratamientos (Figura 1), lo que demuestra el efecto antiepiléptico o anticonvulsivante de dicha estatina.

Asimismo, como es conocido, la severidad de las convulsiones y el efecto en cadena de la excitotoxicidad induce, en algunos casos, la muerte del animal; por este motivo, los inventores analizaron si el efecto antiepiléptico de la estatina (simvastatina) se veía acompañado de una reducción de la mortalidad producida por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 4). En los resultados obtenidos (Figura 6) se observa un mayor índice de supervivencia en los ratones tratados con simvastatina respecto a los tratados con PBS, lo que indica que el tratamiento con dicha estatina (simvastatina) protege a los animales de la muerte debida a las convulsiones y al resto de efectos orgánicos producidos por una sustancia excitotóxica.

Dado que la gravedad en los síntomas epilépticos tiene una correlación directa con la muerte neuronal y la desestructuración de regiones específicas, por ejemplo, el hipocampo, los inventores analizaron si el efecto antiepiléptico y protector de dicha estatina (simvastatina) iba acompañado de una reducción de esos efectos a nivel celular producidos por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 5). Los resultados obtenidos (Figura 7) ponen de manifiesto que tanto en el grupo de animales tratados con PBS y KA (PBS+KA) como en el grupo de animales tratados con dicha estatina (simvastatina) y KA (SIM+KA) existen evidencias de muerte neuronal en el hipocampo; sin embargo, en el grupo de animales tratados con simvastatina dichas evidencias están restringidas a una región concreta (región CA2) mientras que en el grupo de animales tratados con placebo (PBS) se observa una desestructuración del hipocampo más general, observándose evidencias de muerte neuronal en varias regiones: CA1, CA2, CA3 y giro dentado. Estos resultados pusieron de manifiesto el efecto protector (capacidad para minimizar los efectos del daño neuronal) de dicha estatina (simvastatina) frente a la muerte neuronal en el hipocampo causada por una sustancia excitotóxica.

Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector de la simvastatina, los inventores analizaron con más detalle el proceso neurodegenerativo que se estaba produciendo en las neuronas del hipocampo y el efecto que en él tenía el tratamiento con dicha estatina (Ejemplo 6). Los resultados obtenidos (Figura 8) ilustran que el tratamiento con simvastatina (SIM+KA) reduce cualitativamente el número de neuronas del hipocampo que se encuentran en degeneración, lo que pone de manifiesto la capacidad neuroprotectora de dicha estatina (simvastatina) frente a la neurodegeneración causada por una sustancia excitotóxica.

Asimismo, con el fin de analizar la capacidad protectora de la simvastatina ante la muerte por apoptosis, los inventores analizaron el efecto ejercido por el tratamiento con una estatina (simvastatina) sobre la muerte neuronal por apoptosis en las neuronas del hipocampo producida por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 7). Los resultados obtenidos (Figura 9) ponen de manifiesto que el tratamiento con simvastatina reduce cualitativamente el número de neuronas en apoptosis y que el marcaje positivo para apoptosis en el grupo de animales tratados con simvastatina (SIM+KA) se restringe exclusivamente a la región CA2 del hipocampo, mientras que en otros grupos de animales se observa un mayor número de neuronas en apoptosis en las regiones CA1, CA2, CA3 y giro dentado, comprobándose de ese modo la capacidad protectora de dicha estatina (simvastatina) ante la muerte neuronal por apoptosis producida por la administración de una sustancia excitotóxica.

Además, con el objetivo de determinar si la capacidad protectora de dicha estatina (simvastatina) tenía un efecto global, los inventores analizaron otras marcas histopatológicas que indican un daño neuronal, en concreto, la gliosis reactiva producida en el hipocampo por una sustancia excitotóxica y el efecto que en ella tenía el tratamiento con dicha estatina (Ejemplo 8). Los resultados obtenidos (Figura 10) muestran que el tratamiento con dicha estatina (simvastatina) reduce de manera cualitativa la activación astrocítica en la región del neuropilo del hipocampo así como la presencia de astrocitos en esa región del hipocampo, lo que demuestra, en combinación con los resultados anteriores, la capacidad neuroprotectora de dicha estatina (simvastatina) ante los efectos de la administración de una sustancia excitotóxica.

Finalmente, con el objetivo de determinar si la capacidad neuroprotectora de las estatinas (e.g., simvastatina) también incluía un efecto antioxidante, los inventores analizaron el efecto que tenía el tratamiento con dicha estatina (simvastatina) en la peroxidación lipídica inducida por una sustancia excitotóxica (Ejemplo 9). Los resultados obtenidos (Figura 11) ilustran que el tratamiento con dicha estatina (simvastatina) reduce de manera cualitativa el número de neuronas marcadas y la intensidad de la señal de HNE, lo que pone de manifiesto que dicha estatina (simvastatina), además de un efecto neuroprotector en las neuronas del hipocampo, tiene un efecto antioxidante en regiones de la corteza cerebral ya que previene del daño oxidativo por peroxidación lipídica debida a la acción de una sustancia excitotóxica.

Para su administración en la prevención y/o tratamiento de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas, o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada, la estatina se formulará en una composición farmacéutica, en una cantidad terapéuticamente efectiva, junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede contener una o más estatinas diferentes junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, dicha composición farmacéutica comprende una única estatina. En otra realización particular, dicha composición farmacéutica comprende dos o más estatinas. Dicha composición farmacéutica es útil para el tratamiento de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas, o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada.

Las composiciones farmacéuticas que contienen una estatina, proporcionadas por esta invención, pueden formularse en cualquier forma farmacéutica de administración adecuada para su administración por la vía de administración elegida, e.g., oral, parenteral (subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, etc.), tópica, rectal, etc. A modo ilustrativo, no limitativo, las composiciones farmacéuticas proporcionadas por esta invención pueden formularse en una forma farmacéutica sólida de administración por vía oral (e.g., gránulos, comprimidos, cápsulas, etc.), en una forma farmacéutica líquida de administración por vía oral (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.), en una forma farmacéutica para su administración por vía parenteral (e.g., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). Para ello, en cada caso, se elegirán los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para la forma farmacéutica de administración y vía de administración elegida, por ejemplo, aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., para la formulación de formas farmacéuticas de administración sólidas, y tampones, tensioactivos, etc., para la formulación de formas farmacéuticas de administración líquidas. Dichos vehículos y excipientes deben ser farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente tolerables y han de poder ser combinados con otros componentes de la formulación sin ejercer ningún efecto adverso sobre el sujeto tratado. Información sobre dichos vehículos y excipientes, así como sobre dichas formas farmacéuticas de administración de dicho principio activo puede encontrarse en tratados de farmacia galénica. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos, en general, y de sus procedimientos de preparación puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 1ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención comprende, al menos, una estatina en una cantidad terapéuticamente eficiente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente eficiente" se refiere a la cantidad de estatina calculada para producir el efecto deseado. La dosis de estatina a administrar a un sujeto puede variar dentro de un amplio intervalo dependiendo de numerosos factores, entre los que se incluyen las características de la estatina utilizada, e.g., su actividad y vida media biológica, la concentración de la estatina en la composición farmacéutica, la situación clínica del sujeto, la severidad de la patología, la forma farmacéutica de administración elegida, etc. La composición farmacéutica proporcionada por esta invención se puede administrar una o más veces al día con fines preventivos o terapéuticos o con otras pautas de administración, no necesariamente diaria sino también de forma puntual, semanal, etc.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención, si se desea, puede usarse junto con otros fármacos, por ejemplo, fármacos útiles en el tratamiento de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas, o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada, con el fin de aumentar la eficiencia de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención, generándose de este modo una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden facilitarse como una composición farmacéutica separada para su administración al mismo tiempo (administración simultánea) que la composición farmacéutica proporcionada por esta invención o en momentos diferentes (administración secuencial) respecto a la administración de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una estatina para el tratamiento y/o prevención de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas, o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada. Las características de la estatina así como las de dichas enfermedades ya han sido mencionadas previamente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de la epilepsia, crisis epilépticas, convulsiones, enfermedades neurodegenerativas, o enfermedades asociadas con una oxidación indeseada, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficiente de una estatina o de una composición farmacéutica proporcionada por esta invención que comprende una estatina. Las características de la estatina así como las de dichas enfermedades y composiciones farmacéuticas que comprenden una estatina ya han sido mencionadas previamente.

ES 2 330 184 B1

Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

5 Ejemplo 1

Efecto antiepiléptico de la simvastatina frente a la acción de una sustancia excitotóxica

10 Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N [Taconic Farms, Inc. (www.taconic.com)]. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas “*Guidance on the Operation of Animals*” (*Scientific Procedures, Act. 1986*). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

15 Los animales, repartidos en distintos grupos, fueron inoculados intraperitonealmente con 30 mg/kg de kainato (KA) disuelto en tampón fosfato salino (PBS), de acuerdo con el siguiente protocolo:

- siete animales fueron pretratados a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección intraperitoneal (i.p.);
- 20 - seis animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p.; y
- 25 - cuatro animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con DNQX (un inhibidor específico de los receptores de KA) a una dosis de 30 mg/kg, mediante inyección i.p.

Tras la inoculación con KA los animales fueron alojados en cubetas de manera individual para su seguimiento. Durante la observación se registró el nivel máximo de epilepsia de los animales según la escala Racine cada 10 minutos y durante al menos 120 minutos post-inoculación (m.p.i.).

Posteriormente se realizaron estudios comparativos en los niveles de epilepsia entre el tratamiento con PBS, con simvastatina o con DNQX. Se observaron diferencias en el tiempo en el que aparecía la primera convulsión (*latencia*), que era mayor en el caso del tratamiento con simvastatina ($50,0 \pm 11,8$ min) que en el resto de tratamientos (PBS: $38,6 \pm 4,0$ min; DNQX: $23,3 \pm 7,6$ min) tal como se muestra en la Figura 1, lo que demuestra un efecto antiepiléptico o anticonvulsivante de la simvastatina.

A partir de 30 m.p.i. se observa que en el tratamiento con PBS los niveles de epilepsia superaron el nivel 4 de la escala Racine, que marca la aparición de convulsiones severas (Figura 2). La aparición de episodios convulsivos severos ocurre fundamentalmente en el periodo comprendido entre 40 y 80 m.p.i. El tratamiento con simvastatina estabilizó los niveles epileptogénicos a partir de 30 m.p.i. no superando un valor medio de 4 y estando por debajo respecto al tratamiento con PBS en todos los puntos temporales de la observación, lo que demuestra un efecto antiepiléptico o anticonvulsivante de la simvastatina. La disminución de los niveles de epilepsia con el tratamiento con simvastatina es mayor precisamente en el periodo de mayor gravedad de los episodios convulsivos entre 40 y 80 m.p.i. tal como se puede observar en la Figura 2.

Con el objetivo de validar las observaciones realizadas en el efecto antiepiléptico de la simvastatina se comparó el nivel de epilepsia entre ratones tratados con PBS frente a DNQX (un conocido antagonista de los receptores de KA). En la Figura 3 se observa que el tratamiento con DNQX evita el aumento de los niveles epilépticos a partir de 30 m.p.i. de KA, mostrando, de manera similar a la simvastatina, un efecto mayor durante el periodo de mayor gravedad de los episodios convulsivos que se presentan entre 40 y 80 m.p.i.

55 Ejemplo 2

Dependencia de la dosis en el efecto antiepiléptico de la simvastatina

El Ejemplo 1 muestra que el tratamiento con simvastatina tiene un efecto antiepiléptico frente a una agresión excitotóxica. Basándose en estos resultados los inventores decidieron estudiar la implicación de la dosis de simvastatina en su efecto antiepiléptico.

65 Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals* (*Scientific Procedures, Act. 1986*). Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

ES 2 330 184 B1

Los animales, repartidos en distintos grupos, fueron inoculados intraperitonealmente con 25 mg/kg de KA disuelto en PBS, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- tres animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 10 mg/kg mediante inyección i.p.; y
- dos animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg, mediante inyección i.p.

Tras la inoculación con KA los animales fueron alojados en cubetas de manera individual para su seguimiento. Durante la observación se registró el nivel máximo de epilepsia de los animales según la escala Racine cada 10 minutos y durante al menos 120 m.p.i.

Se observa, de manera general, un menor nivel de epilepsia en los ratones tratados con 50 mg/kg de simvastatina frente a los tratados con 10 mg/kg de simvastatina durante el periodo de observación (Figura 4). De forma destacada, se observa una drástica diferencia a partir de los 60 m.p.i. lo que pone de manifiesto que el uso de una dosis mayor de simvastatina produce un menor índice de epilepsia y favorece la recuperación de los animales de manera más rápida que las dosis bajas. Con estos resultados se pone de manifiesto la dependencia de la dosis en el efecto antiepiléptico de la simvastatina.

Ejemplo 3

Efecto de la vía de administración en el efecto antiepiléptico de la simvastatina

Como muestran los Ejemplos 1 y 2, la simvastatina tiene propiedades antiepilépticas y éstas dependen de la dosis en la que se administre dicho compuesto. Debido a estas observaciones los inventores decidieron averiguar si el efecto antiepiléptico de la simvastatina sería modulado también por la vía de administración.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Los animales, repartidos en distintos grupos, fueron inoculados intraperitonealmente con 25 mg/kg de KA disuelto en PBS, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- tres animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante administración oral directa; y
- dos animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p.

Tras la inoculación con KA los animales fueron alojados en cubetas de manera individual para su seguimiento. Durante la observación se registró el nivel máximo de epilepsia de los animales según la escala Racine cada 10 minutos y durante al menos 120 m.p.i.

Se observa, de manera general, una disminución de los niveles de epilepsia a partir de los 40 m.p.i. en ambos grupos de animales (Figura 5). Este resultado pone de manifiesto la eficiencia de la simvastatina como antiepiléptico mediante ambos tipos de administración. También se observa que mediante la inyección i.p. la disminución de la gravedad en los episodios convulsivos es más rápida que mediante la administración oral directa. En la Figura 5 se puede observar cómo la administración i.p. disminuye los niveles epilépticos al nivel 2 en la escala de Racine a los 70 m.p.i. y a nivel 1 en la escala de Racine a los 120 m.p.i., mientras que la administración oral no llega al nivel 2 en la escala de Racine hasta los 100 m.p.i. y mantiene ese nivel hasta los 120 m.p.i. Estos resultados ponen de manifiesto que la vía de administración influye en la eficiencia de la simvastatina como compuesto antiepiléptico.

Ejemplo 4

Efecto protector de la simvastatina frente a la muerte causada por una sustancia excitotóxica

Como muestran los Ejemplos 1, 2 y 3, la simvastatina tiene propiedades antiepilépticas y anticonvulsivantes. La severidad de las convulsiones y el efecto en cadena de la excitotoxicidad induce, en algunos casos, la muerte del animal. Debido a esto los inventores decidieron averiguar si el efecto antiepiléptico de la simvastatina se veía acompañado de una reducción de la mortalidad producida por una sustancia excitotóxica.

ES 2 330 184 B1

5 Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Los animales, repartidos en distintos grupos, fueron inoculados intraperitonealmente con 30 mg/kg de KA disuelto en PBS, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 10 - siete animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, fueron tratados diariamente con PBS hasta 7 días post-inoculación (d.p.i.); y
- 15 - seis animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, fueron tratados diariamente con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg hasta 7 d.p.i.

20 Tras la inoculación con KA y, una vez dado por concluido el periodo de observación tras 150 m.p.i. del KA, los animales fueron alojados en cubetas individuales para su tratamiento con PBS, o con una dosis de 50 mg/kg de una suspensión de simvastatina en PBS, durante el periodo de 7 d.p.i. En ese periodo de tiempo se registraron los óbitos.

25 En la Figura 6 se muestran los resultados mediante una curva de supervivencia. En esa figura se observa un índice de supervivencia mayor en los ratones que fueron tratados con simvastatina respecto a los tratados con PBS. Estos resultados de mortalidad indican que el tratamiento con simvastatina protegió a los animales de la muerte debida a las convulsiones y al resto de efectos orgánicos producidos por una sustancia excitotóxica.

Ejemplo 5

30 *Efecto protector de la simvastatina frente a la muerte neuronal en el hipocampo causada por una sustancia excitotóxica*

35 Como muestran los Ejemplos 1, 2 y 3, la simvastatina tiene propiedades antiepilépticas. Además, como muestra el Ejemplo 4, la simvastatina reduce la mortalidad debida al efecto de una sustancia excitotóxica. Por otra parte, la gravedad en los síntomas epilépticos tiene una correlación directa con la muerte neuronal y desestructuración de regiones específicas (e.g., el hipocampo). Debido a esto los inventores decidieron averiguar si el efecto antiepiléptico y protector de la simvastatina se veía acompañado de una reducción de estos efectos a nivel celular producidos por una sustancia excitotóxica.

40 Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Los animales, repartidos en distintos grupos, fueron inoculados intraperitonealmente con 30 mg/kg de KA disuelto en PBS, o con PBS (control), de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 50 - siete animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, fueron tratados diariamente con PBS hasta 7 d.p.i.;
- 55 - seis animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, fueron tratados diariamente con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg, hasta 7 d.p.i.; y
- cinco animales fueron inoculados con PBS (en lugar de KA) mediante inyección i.p., y fueron pretratados con PBS, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con PBS, mediante inyección i.p., y, posteriormente, fueron tratados diariamente con PBS hasta 7 días d.p.i.

60 Tras la inoculación con KA (o con PBS), los animales fueron alojados en cubetas individuales para su tratamiento con PBS o con una dosis de 50 mg/kg de una suspensión de simvastatina en PBS durante un periodo de 7 días. Una vez concluido ese periodo de tiempo de 7 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados y sus encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. Para el análisis de la arquitectura celular del hipocampo se utilizó la tinción con hematoxilina y eosina en cortes de 5 μ m de grosor.

En la Figura 7 se muestran los focos de muerte celular donde se localizan los núcleos necróticos (puntos pequeños de coloración intensa) y/o las células en degeneración (núcleos picnóticos de tamaño más reducido al normal y de color más intenso). Tanto en el grupo de animales tratados con PBS y KA (PBS+KA) como en el grupo de animales tratados con simvastatina y KA (SIM+KA) existen evidencias de muerte neuronal en el hipocampo. La diferencia fundamental estribó en que las zonas afectadas en el grupo de animales tratados con simvastatina están restringidas a la región CA2 mientras que el grupo de animales tratados con PBS muestra una desestructuración del hipocampo más general, observándose evidencias de muerte neuronal en CA1, CA2, CA3 y giro dentado. Estos resultados pusieron de manifiesto la capacidad de la simvastatina para minimizar los efectos del daño neuronal causado por una sustancia excitotóxica.

Ejemplo 6

Efecto neuroprotector de la simvastatina frente a la neurodegeneración causada por una sustancia excitotóxica

Como muestra el Ejemplo 5, la simvastatina previene la desestructuración y la muerte neuronal en el hipocampo por efecto de una sustancia neurotóxica. Con el objetivo de definir mejor el efecto neuroprotector que se apreciaba en el Ejemplo 5, los inventores decidieron estudiar el proceso neurodegenerativo que se estaba produciendo en las neuronas del hipocampo y el efecto que en él tenía el tratamiento con simvastatina.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Los animales, repartidos en distintos grupos, fueron inoculados intraperitonealmente con 30 mg/kg de KA disuelto en PBS, o con PBS (control), de acuerdo con el siguiente protocolo:

- siete animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, fueron tratados diariamente con PBS hasta 7 d.p.i.;
- seis animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, fueron tratados diariamente con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg, hasta 7 d.p.i.; y
- cinco animales fueron inoculados con PBS (en lugar de KA) mediante inyección i.p., y fueron pretratados con PBS, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con PBS, mediante inyección i.p., y, posteriormente, fueron tratados diariamente con PBS hasta 7 días d.p.i.

Tras la inoculación con KA (o con PBS), los animales fueron alojados en cubetas individuales para su tratamiento con PBS o con una dosis de 50 mg/kg de una suspensión de simvastatina en PBS durante un periodo de 7 días. Una vez concluido ese periodo de tiempo de 7 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados y sus encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. Para el análisis de la neurodegeneración del hipocampo se utilizó la tinción fluorescente de Fluoro Jade B en cortes de 5 μ m de grosor. Esta tinción tiñe las neuronas que se encuentran en un proceso degenerativo.

En la Figura 8 se observa que el tratamiento con simvastatina (SIM+KA) reduce cualitativamente el número de neuronas del hipocampo que se encuentran en degeneración y la intensidad del marcaje con Fluoro Jade B. Estos resultados pusieron de manifiesto la capacidad neuroprotectora de la simvastatina ante la acción de una sustancia excitotóxica.

Ejemplo 7

Efecto neuroprotector de la simvastatina frente a la apoptosis causada por una sustancia excitotóxica

Como muestran los Ejemplos 5 y 6, la simvastatina tiene un efecto neuroprotector en el hipocampo ante el efecto de una sustancia neurotóxica. Con el objetivo de determinar la capacidad protectora de la simvastatina ante la muerte por apoptosis, los inventores decidieron estudiar el efecto que tenía el tratamiento con simvastatina en la muerte neuronal por apoptosis en las neuronas del hipocampo producida por una sustancia excitotóxica.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

ES 2 330 184 B1

Los animales, repartidos en distintos grupos, fueron inoculados intraperitonealmente con 30 mg/kg de KA disuelto en PBS, o con PBS (control), de acuerdo con el siguiente protocolo:

- siete animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, fueron tratados diariamente con PBS hasta 7 d.p.i.;
- seis animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, fueron tratados diariamente con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg, hasta 7 d.p.i.; y
- cinco animales fueron inoculados con PBS (en lugar de KA) mediante inyección i.p., y fueron pretratados con PBS, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con PBS, mediante inyección i.p., y, posteriormente, fueron tratados diariamente con PBS hasta 7 días d.p.i.

Tras la inoculación con KA (o con PBS), los animales fueron alojados en cubetas individuales para su tratamiento con PBS o con una dosis de 50 mg/kg de una suspensión de simvastatina en PBS durante un periodo de 7 días. Una vez concluido ese periodo de tiempo de 7 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados y sus encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. Para el análisis de la muerte neuronal por apoptosis en el hipocampo se utilizó la tinción fluorescente de Naranja de Acridina en cortes de 5µm de grosor. Esta tinción tiñe el DNA de cadena simple que se produce como consecuencia del proceso apoptótico.

En la Figura 9 se observa que el tratamiento con simvastatina reduce cualitativamente el número de neuronas en apoptosis. Además el marcaje positivo para apoptosis en el grupo de animales tratados con simvastatina (SIM+KA) se restringe exclusivamente a la región CA2 del hipocampo. Sin embargo, el grupo de animales tratados con PBS (PBS+KA) muestra de manera más numerosa neuronas en apoptosis en las regiones CA1, CA2, CA3 y giro dentado. Estos resultados demostraron la capacidad de protección de la simvastatina ante la muerte neuronal por apoptosis producida por la administración de una sustancia excitotóxica.

Ejemplo 8

Efecto neuroprotector de la simvastatina frente a la gliosis reactiva causada por una sustancia excitotóxica

Como muestran los Ejemplos 5, 6 y 7, la simvastatina tiene un efecto neuroprotector directo en la neurodegeneración y en la muerte neuronal en el hipocampo ante el efecto de una sustancia neurotóxica. Con el objetivo de determinar si la capacidad protectora de la simvastatina tenía un efecto global, los inventores decidieron estudiar otras marcas histopatológicas que indican un daño neuronal. Para ello, se analizó la gliosis reactiva producida en el hipocampo por una sustancia excitotóxica y el efecto que en ella tenía el tratamiento con simvastatina.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Los animales, repartidos en distintos grupos, fueron inoculados intraperitonealmente con 30 mg/kg de KA disuelto en PBS, o con PBS (control), de acuerdo con el siguiente protocolo:

- siete animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, fueron tratados diariamente con PBS hasta 7 d.p.i.;
- seis animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras inoculación con KA, fueron tratados diariamente con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg, hasta 7 d.p.i.; y
- cinco animales fueron inoculados con PBS (en lugar de KA) mediante inyección i.p., y fueron pretratados con PBS, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con PBS, mediante inyección i.p., y, posteriormente, fueron tratados diariamente con PBS hasta 7 días d.p.i.

Tras la inoculación con KA (o con PBS), los animales fueron alojados en cubetas individuales para su tratamiento con PBS o con una dosis de 50 mg/kg de una suspensión de simvastatina en PBS durante un periodo de 7 días. Una vez concluido ese periodo de tiempo de 7 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados y sus encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. Para el análisis de la gliosis reactiva en el hipocampo se utilizó la inmunohistoquímica de fluorescencia contra la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP). Mediante esta técnica se detecta la activación de los astrocitos los cuales muestran una mayor intensidad del marcaje de esta proteína y aumentan en número como respuesta al daño neuronal.

En la Figura 10 se observa que la administración de una sustancia excitotóxica y el tratamiento con PBS produce una activación astrocítica en la región del neuropilo del hipocampo (PBS+KA). Sin embargo, el tratamiento con simvastatina reduce de manera cualitativa esta activación y la presencia de astrocitos en esta región del hipocampo (SIM+KA). Estos resultados junto con los obtenidos en los Ejemplos 5, 6 y 7 demuestran la capacidad neuroprotectora de la simvastatina ante los efectos de la administración de una sustancia excitotóxica.

Ejemplo 9

Efecto antioxidante de la simvastatina frente a la peroxidación lipídica causada por una sustancia excitotóxica

Con el objetivo de determinar si la capacidad neuroprotectora de la simvastatina también incluía un efecto antioxidante, los inventores decidieron estudiar el efecto que tenía el tratamiento con simvastatina en la peroxidación lipídica inducida por una sustancia excitotóxica.

Todos los animales incluidos durante el proceso experimental fueron ratones machos de 16 semanas de edad y de la cepa FVB/N. Los experimentos fueron llevados a cabo siguiendo estrictamente las normas *Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures, Act. 1986)*. Los animales tuvieron su respectivo periodo de cuarentena y fueron tratados con la máxima precaución para minimizar posibles contaminaciones durante las inoculaciones y manipulaciones.

Los animales, repartidos en distintos grupos, fueron inoculados intraperitonealmente con 30 mg/kg de KA disuelto en PBS, o con PBS (control), de acuerdo con el siguiente protocolo:

- siete animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con PBS mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras la inoculación con KA, fueron tratados de forma diaria con PBS hasta 7 d.p.i.;
- seis animales fueron pretratados, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con KA, con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg mediante inyección i.p., y, posteriormente, tras inoculación con KA, fueron tratados diariamente con simvastatina a una dosis de 50 mg/kg, hasta 7 d.p.i.; y
- cinco animales fueron inoculados con PBS (en lugar de KA) mediante inyección i.p., y fueron tratados con PBS, a 24 y 0,5 horas antes de la inoculación con PBS, mediante inyección i.p., y, posteriormente, fueron tratados de forma diaria con PBS hasta 7 días d.p.i.

Tras la inoculación con KA (o con PBS), los animales fueron alojados en cubetas individuales para su tratamiento con PBS o con una dosis de 50 mg/kg de una suspensión de simvastatina en PBS durante un periodo de 7 días. Una vez concluido ese periodo de tiempo de 7 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados y sus encéfalos fueron diseccionados. Las muestras de encéfalo fueron procesadas e incluidas en parafina. Para el análisis de la peroxidación lipídica se utilizó la inmunohistoquímica de campo claro con el 4-hidroxinonenal (HNE), que permite detectar los aductos de *Michael* producidos por este tipo de daño oxidativo.

En la Figura 11 se observa que la administración de una sustancia excitotóxica (KA) y el tratamiento con PBS muestra un marcaje de HNE en neuronas piramidales de la región del córtex motor (PBS+KA). Sin embargo, el tratamiento con simvastatina reduce de manera cualitativa el número de neuronas marcadas y la intensidad de la señal de HNE (SIM+KA). Estos resultados muestran que la simvastatina, además de un efecto neuroprotector en las neuronas del hipocampo, tiene un efecto antioxidante en regiones de la corteza cerebral ya que previene del daño oxidativo por peroxidación lipídica debida a la acción de una sustancia excitotóxica.

REIVINDICACIONES

5 1. Empleo de una estatina en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento y/o prevención de:

- a) epilepsia,
- b) crisis epilépticas,
- 10 c) convulsiones,
- d) enfermedades neurodegenerativas, o
- 15 e) enfermedades asociadas con una oxidación indeseada.

2. Empleo según la reivindicación 1, en el que dicha estatina se selecciona del grupo formado por una estatina natural, una estatina sintética, una estatina semisintética y sus mezclas.

20 3. Empleo según la reivindicación 1, en el que dicha estatina se selecciona del grupo formado por atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, monacolina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina, sus sales farmacéuticamente aceptables, y sus mezclas.

25 4. Una estatina para su empleo en la prevención y/o el tratamiento de:

- a) epilepsia,
- b) crisis epilépticas,
- 30 c) convulsiones,
- d) enfermedades neurodegenerativas, o
- 35 e) enfermedades asociadas con una oxidación indeseada.

5. Estatina según la reivindicación 4, seleccionada del grupo formado por una estatina natural, una estatina sintética, una estatina semisintética y sus mezclas.

40 6. Estatina según la reivindicación 4, seleccionada del grupo formado por atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, monacolina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina, sus sales farmacéuticamente aceptables, y sus mezclas.

45 7. Estatina para su empleo como antiepiléptico, anticonvulsivante, neuroprotector, antiapoptótico o antioxidante en procesos neurodegenerativos o asociados a la edad.

50

55

60

65

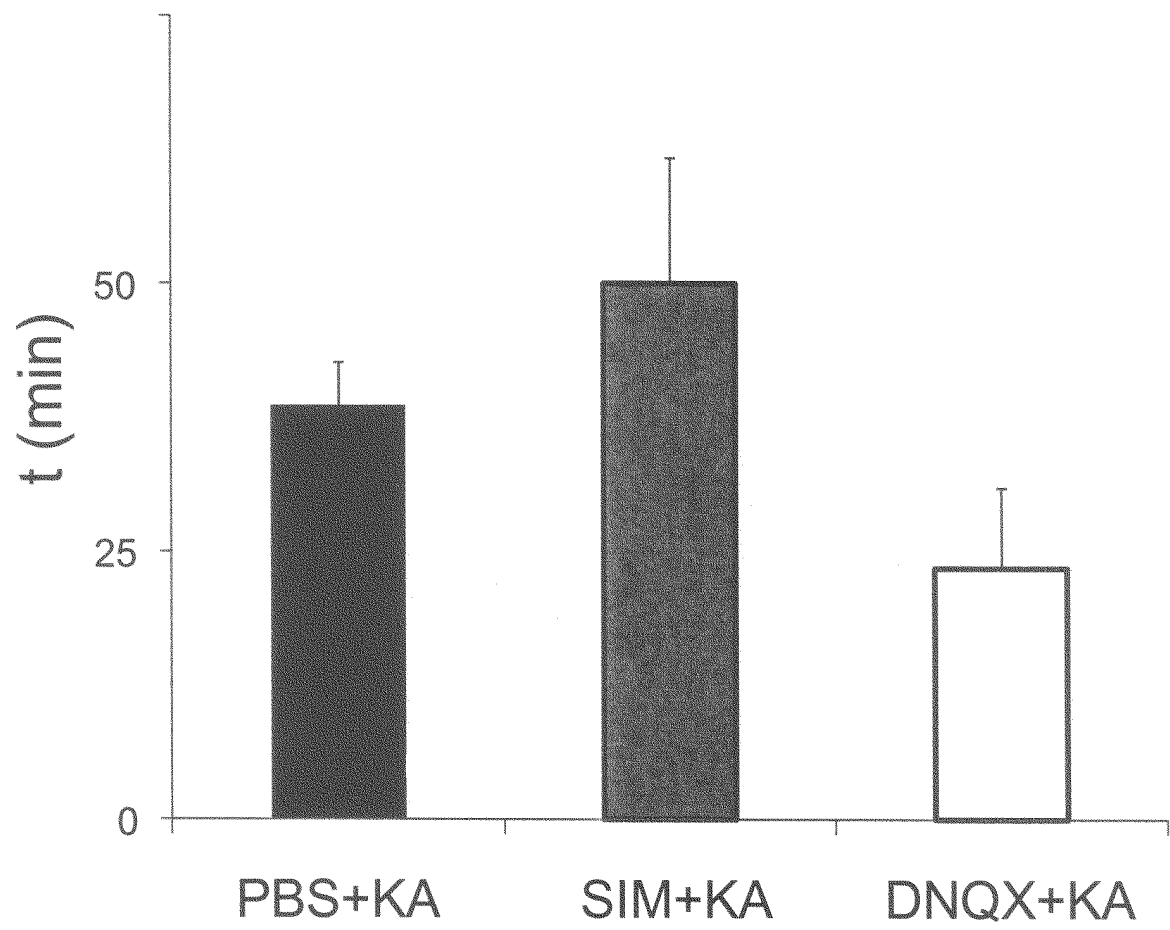


Figura 1

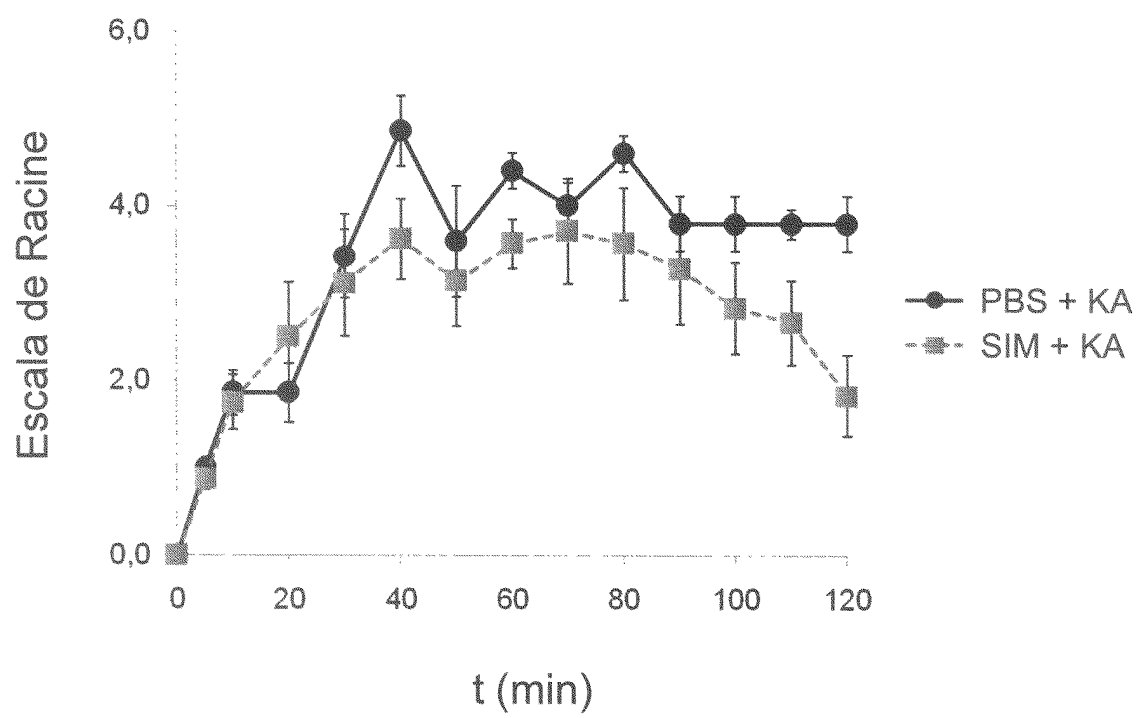


Figura 2

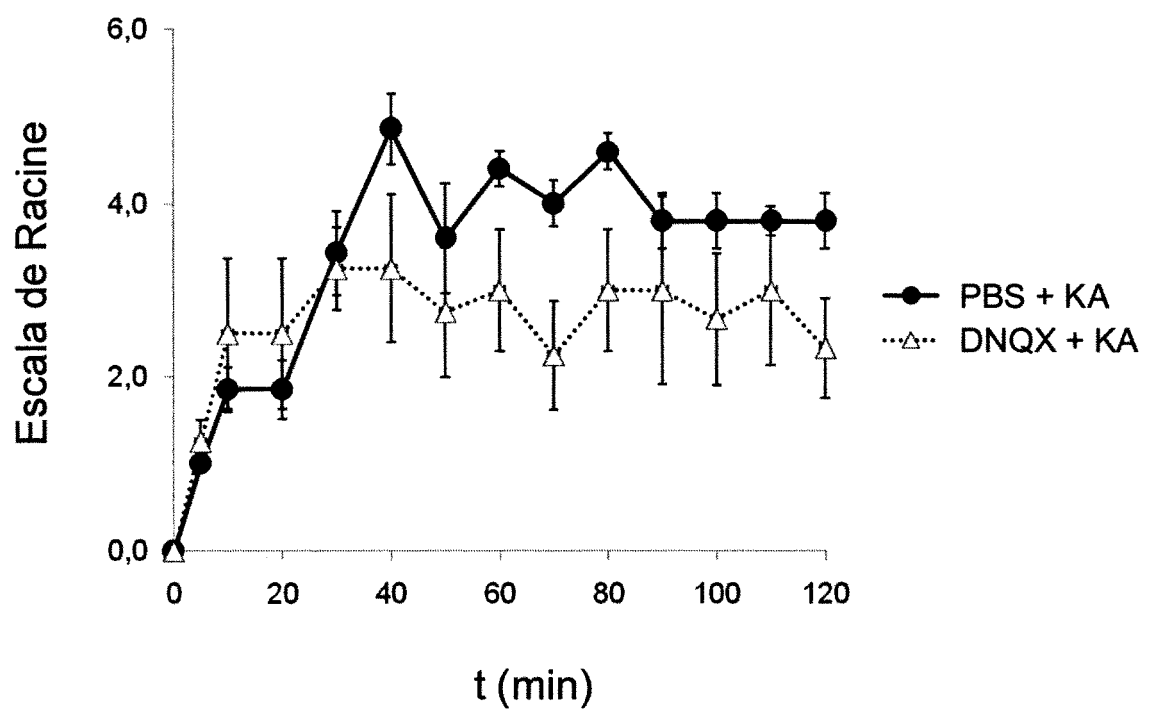


Figura 3

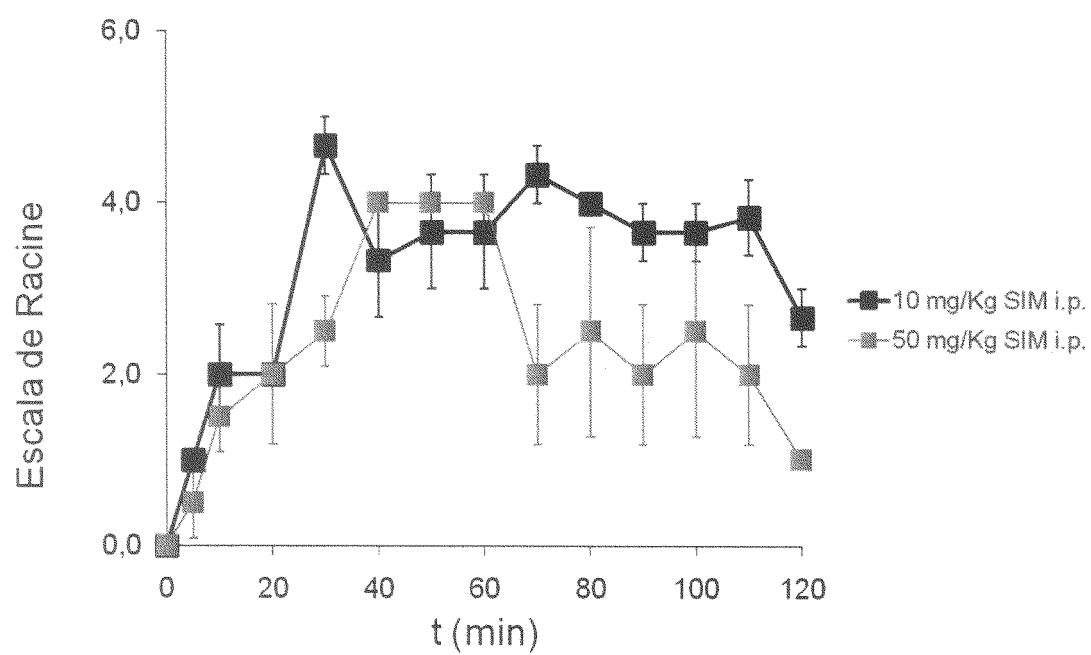


Figura 4

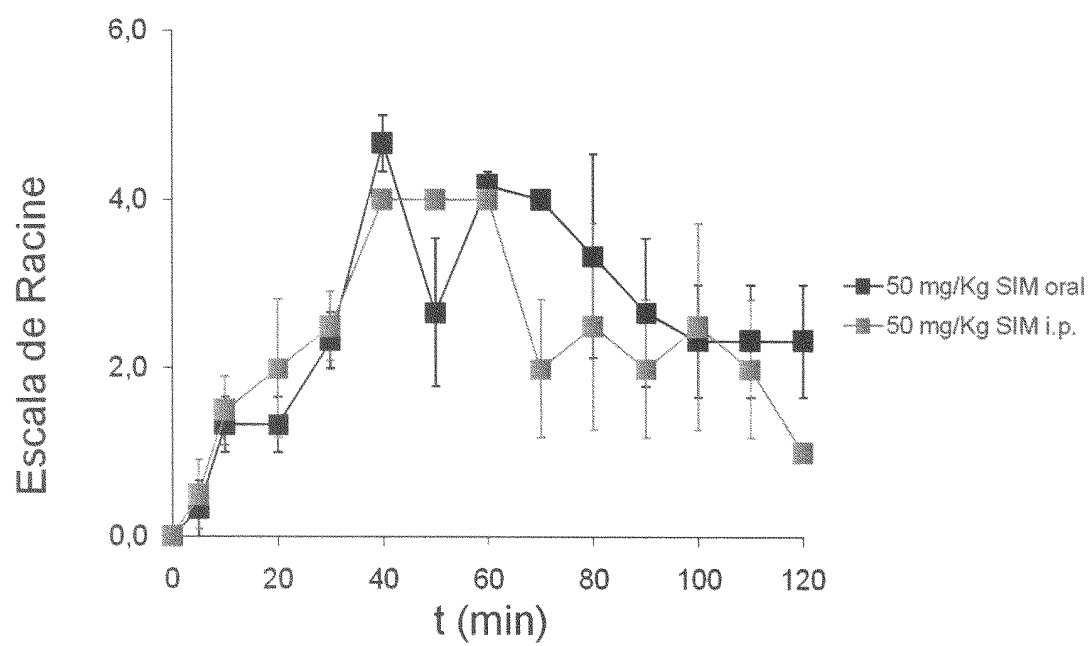


Figura 5

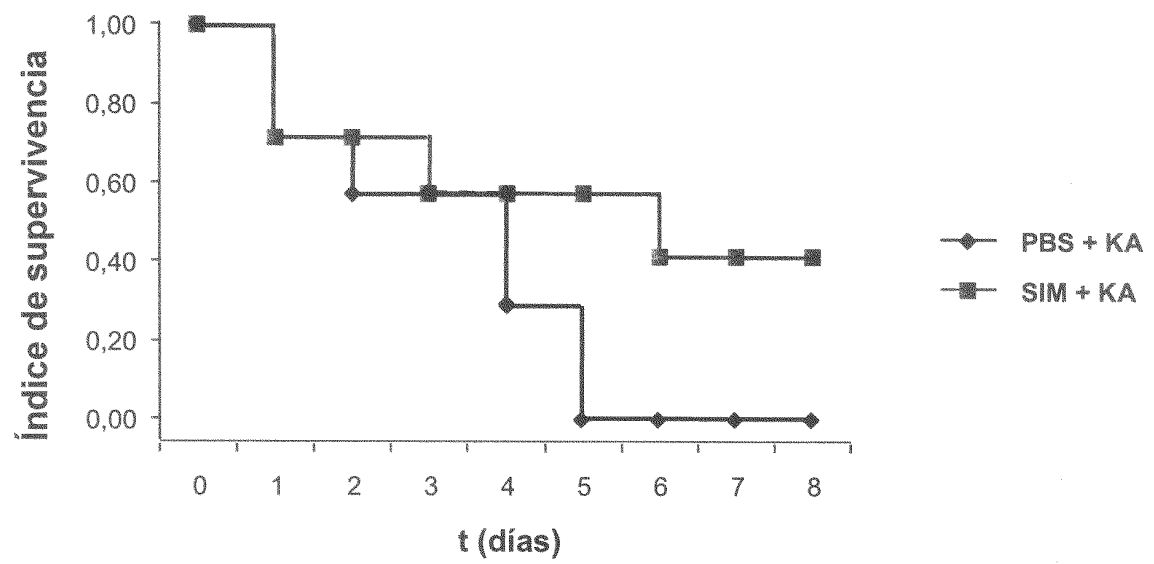


Figura 6

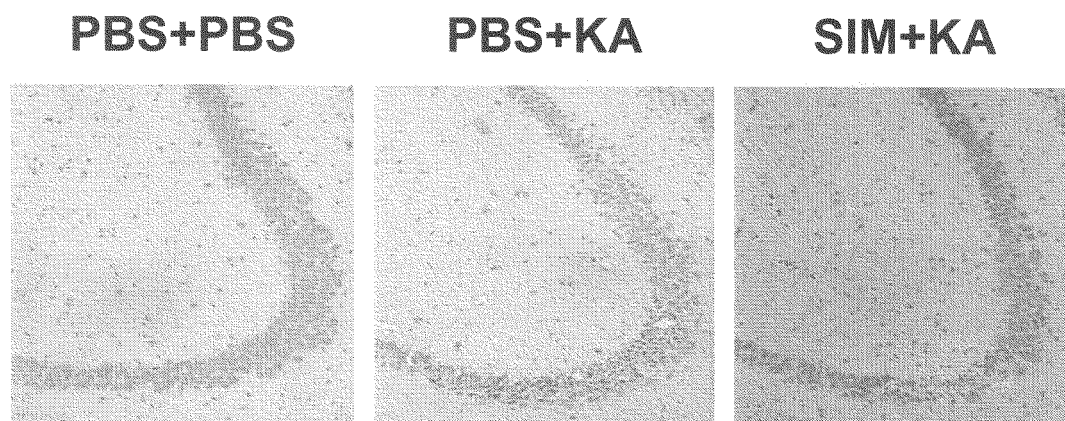


Figura 7

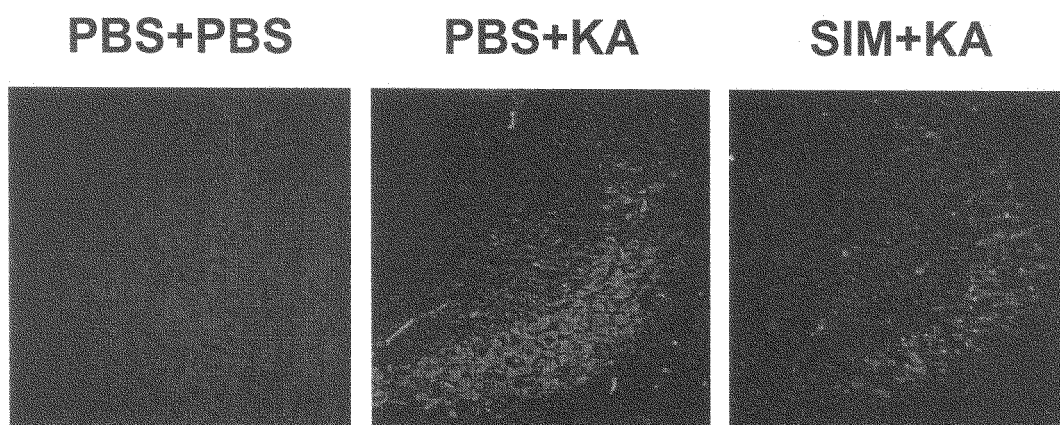


Figura 8

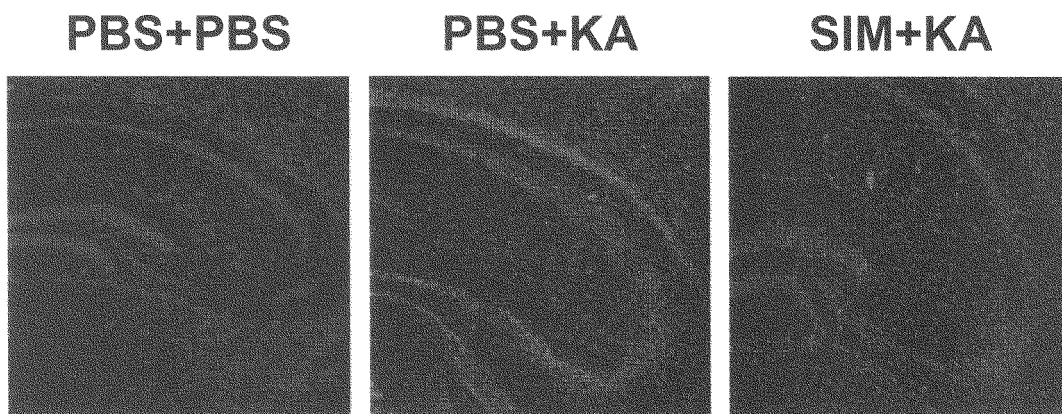


Figura 9

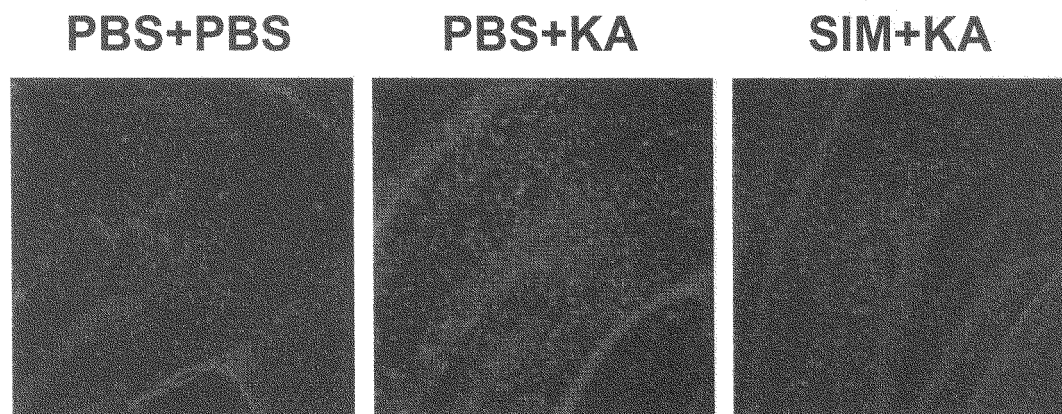


Figura 10

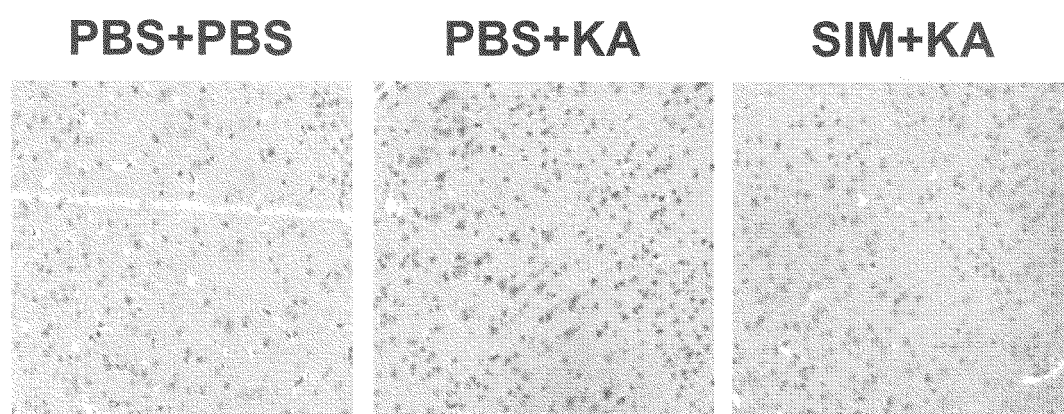


Figura 11



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 330 184

⑫ Nº de solicitud: 200801733

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 03.06.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **A61K 31/40** (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2007089787 A2 (BRYSON, I.) 09.08.2007, todo el documento.	4-7
X	O'REGAN et al.: "Statin therapy in stroke prevention: A meta-analysis involving 121.000 patients". The american journal of medicine, enero 2008, vol. 121, nº 1, páginas 24-33, página 24 página 26, results.	4-7
X	AMARENCO, P. et al.: "High -dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack" Journal of vascular surgery, 2006, vol. 44, nº 6, páginas 1374, resumen.	4-7
X	SILLESEN, H. et al.: "Atorvastatin reduces risk of stroke cardiac events and endarterectomy in patients with carotid stenosis: a substudy of sparcl". Atherosclerosis supplements, 2007, vol. 8, nº 1, página 208, resumen.	4-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.09.2009

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, ,WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.09.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-3	SÍ
	Reivindicaciones	4-7	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-3	SÍ
	Reivindicaciones	4-7	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007089787 A2	08.09.2007
D02	The american journal of medicine, vol. 121, nº 1, páginas 24-33.	2008
D03	Journal of vascular surgery, vol. 44, nº 6, páginas 1374.	2006
D04	Atherosclerosis supplements, vol. 8, nº 1, página 208,	2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere al empleo de una estatina en la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de epilepsia, convulsiones y enfermedades neurodegenerativas. Entre las estatinas que se citan se encuentran atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, monacolina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina

El documento D1 se refiere a composiciones que comprenden estatinas de diferentes grupos, lipofílicas (atorvastatina, simvastatina y lovastatina) e hidrofílicas (pravastatina, fluvastatina y rosuvastatina) (ver página 3, líneas 12-20). Asimismo se refiere a su utilización en enfermedades cardiovasculares, en hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia etc (ver página 1, líneas 8-15). Los documentos D2 -D4 se refieren a la utilización de estatinas en la prevención del ictus, apoplejía o accidente cerebrovascular. En los documentos D3 y D4 se cita específicamente la utilización de atorvastatina en dosis de 80 mg/día en la reducción de dichos ataques.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados, las reivindicaciones 4-7 carecen de novedad y de actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6.1 y 8.1 Ley Patentes.

Las reivindicaciones 1-3 se refieren al empleo de dichas estatinas en la prevención y/o tratamiento de la epilepsia, convulsiones o enfermedades neurodegenerativas. Ninguno de los documentos citados ni ninguna combinación relevante de ellos se refiere a la utilización de las estatinas en dichas enfermedades.

Por lo tanto, la materia de las reivindicaciones 1-3 tiene novedad y actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6.1 y 8.1 Ley Patentes.