



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 409**

51 Int. Cl.:
A61K 31/445 (2006.01)
A61K 31/4412 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06740387 .3**
96 Fecha de presentación : **04.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1871368**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2008**

54 Título: **Compuestos de dihidropiridina para enfermedades neurodegenerativas y demencia.**

30 Prioridad: **04.04.2005 US 667665 P**
13.06.2005 US 689519 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.10.2011

73 Titular/es: **EISAI R&D MANAGEMENT Co., Ltd.**
6-10, Koishikawa 4-chome,
Bunkyo, Tokyo, JP

72 Inventor/es: **Gray, Julian, A.;**
Yoshiharu, Yamanishi;
Nobuyuki, Mori y
Fields, Scott

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 365 409 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

Compuestos de Dihidropiridina para Enfermedades Neurodegenerativas y Demencia

5 La invención se refiere a compuestos de dihidropiridina para su uso combinado con un inhibidor de colinesterasa para el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos. La invención también se refiere a un inhibidor de colinesterasa para su uso combinado con un compuesto de dihidropiridina para el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos.

10 **Antecedentes de la Invención**

Los receptores de aminoácidos excitadores se clasifican en dos tipos generales. Los receptores que se acoplan directamente a la abertura de los canales catiónicos en la membrana celular de las neuronas se denominan "ionotrópicos". Este tipo de receptor se ha subdividido en al menos tres subtipos, que son definidos por las acciones despolarizantes del agonista selectivo N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico (AMPA), y el ácido kaínico. El segundo tipo general es la proteína G o receptor de aminoácidos excitadores "metabotrópico" acoplado a segundos mensajeros. Este segundo tipo, cuando es activado por los agonistas quisqualato, ibotenate, o ácido trans-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxílico, conduce a la hidrólisis de fosoinositido en la célula postsináptica. Ambos tipos de receptores parecen no solo mediar las conexiones sinápticas normales durante el desarrollo, sino también el cambio de eficacia de la transmisión sináptica durante toda la vida. Schoepp et al, Trends Pharm Sci., 11:508 (1990); McDonald et al, Brain Res. Rev., 15:41 (1990).

La excitación excesiva por los neurotransmisores puede ocasionar la degeneración y muerte de las neuronas. Se cree que esta degeneración está mediada en parte por las acciones excitotóxicas de los aminoácidos excitadores, glutamato y aspartato, en el receptor de NMDA, el receptor de AMPA, y el receptor de kainato. Esta acción excitotóxica es responsable de la pérdida de neuronas en trastornos cerebrovasculares tales como la isquemia cerebral o el infarto cerebral resultante de un abanico de afecciones, tales como el ictus tromboembólico o hemorrágico, el vasoespasmio cerebral, la hipoglicemia, el paro cardíaco, el estado epiléptico, la asfixia perinatal, anoxia tal como aquella por casi ahogamiento, cirugía pulmonar y traumatismo cerebral así como latirismo, enfermedades de Alzheimer, y Huntington. Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.765.006 y 5.843.945.

El documento US 2004/0023973 describe compuestos de 1,2-dihidropiridina y su uso como inhibidores de receptores no de NMDA, concretamente un receptor de AMPA.

35 Shigeta et al. (CNS Drug Reviews, Branford, CT, US, vol. 7, núm. 4, 21 de Diciembre de 2001, 353-368) describen el uso de donepezilo para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y describe los perfiles farmacodinámicos, farmacocinéticos y clínicos del donepezilo.

El documento US 2006/0100249 describe composiciones que comprenden compuestos de 1,2-dihidropiridin-2-ona y un agente inmunorregulador o antiinflamatorio, y su uso en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

El documento US 2003/0144255 describe una composición farmacéutica que comprende un compuesto de 4,4'-diaminodifenilsulfona combinado con un compuesto que tiene actividad inhibitoria de la colinesterasa, y su uso en el tratamiento de la demencia.

45 Existe una necesidad en la técnica de nuevos compuestos y nuevos métodos para el tratamiento de enfermedades y trastornos que puedan estar mediados hasta un cierto grado por los receptores de NMDA, los receptores de AMPA y/o receptores de kainato. La invención se refiere a éste, así como a otros, fines importantes.

50 **Compendio de la Invención**

La invención proporciona un compuesto para su uso combinado con donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en el tratamiento de (i) la enfermedad de Alzheimer en un paciente o (ii) la demencia o uno o más deterioros cognitivos en un paciente; donde el compuesto es 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, una de sus sales farmacéuticamente aceptables, uno de sus hidratos o un hidrato de una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también proporciona un compuesto para su uso combinado con 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, una de sus sales farmacéuticamente aceptables, uno de sus hidratos o un hidrato de una de sus sales farmacéuticamente aceptables en el tratamiento de (i) la enfermedad de Alzheimer en un paciente o (ii) la demencia o uno o más deterioros cognitivos en un paciente; donde el compuesto es el donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también proporciona el uso de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, una de sus sales farmacéuticamente aceptables, uno de sus hidratos o un hidrato de una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la fabricación de un medicamento para su uso combinado con donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en el tratamiento de (i) la enfermedad de Alzheimer en un paciente o (ii) la demencia o uno o más deterioros cognitivos en un paciente.

La presente invención también proporciona el uso de donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la fabricación de un medicamento para su uso combinado con 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, una de sus sales farmacéuticamente aceptables, uno de sus hidratos o un hidrato de una de sus sales farmacéuticamente aceptables en el tratamiento de (i) la enfermedad de Alzheimer en un paciente o (ii) la demencia o uno o más deterioros cognitivos en un paciente.

El donepezilo o su sal farmacéuticamente aceptable y la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridina, su sal farmacéuticamente aceptable, su hidrato o el hidrato de una de sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso en la presente invención puede ser (a) administrado separadamente al paciente o (b) administrado al paciente en forma de una composición farmacéutica.

La demencia puede estar causada por la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, o la enfermedad de Huntington.

La combinación del compuesto de 1,2-dihidropiridina y donepezilo produce inesperadamente efectos sinérgicos en el tratamiento y/o la profilaxis de la demencia o los deterioros cognitivos.

La combinación del compuesto de 1,2-dihidropiridina y donepezilo también produce inesperadamente efectos sinérgicos en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra el efecto del Compuesto A (esto es, 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona) sobre el contenido de dopamina, DOPAC, y HVA en los núcleos estriados de ratones.

La Figura 2 muestra los efectos del donepezilo sobre el recambio de dopamina en los núcleos estriados de ratones.

Las Figuras 3A-E muestran los efectos de una combinación del Compuesto A (esto es, 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona) y donepezilo sobre el recambio de dopamina, DOPAC, HVA, DOPAC/DA y HVA/DA, respectivamente, en los núcleos estriados de ratones.

La Figura 4 muestra los efectos del Compuesto A (esto es, 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona) y la combinación del Compuesto A (esto es, 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona) y donepezilo sobre la toxicidad neuronal inducida por kainato en neuronas corticales. El * indica que $p < 0,05$ vs. control, y # indica que $p < 0,05$ vs. donepezilo solo.

La Figura 5 muestra el efecto del Compuesto A (esto es, 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona) y el tratamiento combinado del Compuesto A (esto es, 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona) y donepezilo sobre la toxicidad neural inducida por NMDA en neuronas corticales. El * indica que $p < 0,05$ vs. control.

Descripción Detallada de la Invención

"Paciente" hace referencia a animales, preferiblemente mamíferos, más preferiblemente seres humanos. El término "paciente" incluye hombres y mujeres; e incluye adultos, niños y neonatos. En una realización, el paciente puede ser un animal de compañía, tal como un perro o un gato.

"Deterioros cognitivos" hace referencia a un déficit adquirido en una o más de la función de la memoria, la solución de problemas, la orientación, y la abstracción que afecta a la capacidad de un paciente para funcionar independientemente.

"Demencia" hace referencia a un deterioro global de la función intelectual en clara inconsciencia, y está caracterizada por uno o más síntomas de desorientación, deterioro de la memoria, deterioro del juicio, y deterioro del intelecto.

"Administrado separadamente" con referencia a la administración de dos o más compuestos para el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades y trastornos descritos en la presente memoria incluye, por ejemplo, la administración sucesiva de los compuestos en cualquier orden o la administración simultánea de los compuestos. La administración simultánea de los compuestos significa que los compuestos se administran al paciente esencialmente al mismo tiempo o exactamente al mismo tiempo, dependiendo del modo de administración. La administración sucesiva de los compuestos puede ocurrir en cualquier orden y puede ocurrir en el transcurso de cualquier cantidad tiempo entre la administración de los compuestos. La administración sucesiva puede estar basada en factores que puedan influir en que los compuestos se administren en primer lugar y que los compuestos se administren en

segundo lugar, y en cuánto tiempo transcurra entre la administración de los compuestos. Por ejemplo, cuando dos o más compuestos se administran separadamente y sucesivamente, los factores que influyen cuando los compuestos se administran al paciente incluyen, por ejemplo, (a) el tiempo o los tiempos que proporcionan la mejor eficacia para administrar el compuesto, (b) el tiempo o los tiempos que proporcionan los menores efectos secundarios para administrar el compuesto, (c) la dosificación del compuesto, (d) la ruta de administración del compuesto, (e) la enfermedad o trastorno que esté siendo tratado, (f) el paciente que esté siendo tratado, (g) las relaciones *in vivo* de los compuestos que se estén administrando, y otros factores semejantes conocidos en la técnica. Preferiblemente, los intervalos de tiempo para la administración sucesiva se eligen de manera que el efecto sobre la enfermedad o trastorno que estén siendo tratados en el uso combinado de los ingredientes activos sea mayor que el aditivo cuando se compare con el efecto que se podría obtener por medio del uso de solo uno de los ingredientes activos.

El término "combinación" hace referencia al compuesto de 1,2-dihidropiridina y al segundo ingrediente activo (donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables) que se estén administrando separadamente en forma de composiciones farmacéuticas o formulaciones distintas. Las composiciones farmacéuticas o las formulaciones pueden tener el mismo modo o diferentes modos de administración.

"Ingrediente activo" hace referencia al compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria y donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables descritos en la presente memoria que son responsables del tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad o trastorno.

"Monoterapia" es una terapia que utiliza solo un ingrediente activo para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad o trastorno.

"Terapia combinada" es una terapia en la que dos o más ingredientes activos se administran separadamente o se administran en forma de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a la cantidad de ingrediente activo que es necesaria para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad. Cuando dos o más ingredientes activos se administran para una terapia combinada, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a la cantidad de ingredientes activos que son necesarios para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad e incluye, por ejemplo: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer ingrediente activo y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo ingrediente activo (esto es, para la terapia combinada se utiliza la cantidad de cada ingrediente activo que se utilizaría en la monoterapia para el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad); (b) una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer ingrediente activo y una cantidad subterapéutica de un segundo ingrediente activo, que combinadas eficazmente proporcionan el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad (p. ej., se puede utilizar la cantidad subterapéutica de un segundo ingrediente activo en una terapia combinada para lograr un resultado que sería igual o mayor que el resultado que lograría el segundo ingrediente activo si éste se utilizara para la monoterapia); (b) una cantidad subterapéutica de un primer ingrediente activo y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo ingrediente activo, que combinadas eficazmente proporcionan el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad (p. ej., la cantidad subterapéutica del primer ingrediente activo se puede utilizar en la terapia combinada para lograr un resultado que sería igual o mayor que el resultado que lograría el primer ingrediente activo si éste se utilizara para la monoterapia); y (d) una cantidad subterapéutica de un primer ingrediente activo y una cantidad subterapéutica de un segundo ingrediente activo, cuya terapia combinada proporciona el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad o trastorno (p. ej., la cantidad subterapéutica del primer ingrediente activo se puede utilizar en la terapia combinada para lograr un resultado que sería igual o mayor que el resultado que lograría el primer ingrediente activo si éste se utilizara para la monoterapia; y la cantidad subterapéutica del segundo ingrediente activo se puede utilizar en la terapia combinada para lograr un resultado que sería igual o mayor que el resultado que lograría el segundo ingrediente activo si éste se utilizara para la monoterapia).

Los "envases comerciales", también conocidos como kits, pueden incluir una combinación de (i) una primera composición farmacéutica o formulación que comprende el compuesto de 1,2-dihidropiridina); (ii) una segunda composición farmacéutica o formulación que comprende el segundo ingrediente activo (donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables); (iii) instrucciones aprobadas por la FDA para la utilización de las composiciones farmacéuticas o formulaciones para el tratamiento de o la prevención de la enfermedad; y (iv) opcionalmente otros materiales para la administración de las composiciones farmacéuticas o formulaciones (p. ej., jeringas, diluyentes, guantes médicos, desinfectantes para las manos, y similares); para verificar los niveles de fármaco en el organismo; para ayudar a la observancia de la dosificación de la medicación por parte del paciente; o para verificar el estado de la enfermedad. El envase comercial puede suministrar suficiente medicación y materiales para días, semanas o meses. También se describen en la presente memoria "envases comerciales" que pueden incluir (i) la composición farmacéutica o formulación que comprende tanto el compuesto de 1,2-dihidropiridina y el segundo ingrediente activo (donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables); (ii) las instrucciones aprobadas por la FDA para la utilización de la composición farmacéutica o formulación para el tratamiento o la prevención de la enfermedad; y (iii) opcionalmente otros materiales para la administración de las composiciones farmacéuticas o formulaciones (p. ej., jeringas, diluyentes, guantes médicos, desinfectantes para las manos, y

similares); para verificar los niveles de fármaco en el organismo; para ayudar a la observancia de la dosificación de la medicación por parte del paciente, o para verificar el estado de la enfermedad. El envase comercial puede suministrar suficiente medicación y materiales para días, semanas o meses.

5 "Hidrato" hace referencia a un compuesto que contiene una molécula de agua de cristalización. La molécula de agua de cristalización puede ser un número entero de 1 o más, por ejemplo de 1 a 10; o puede ser cualquier fracción superior a 0 o una fracción de un número entero de 1 a 10. Por ejemplo, el hidrato puede estar representado como compuesto· $\frac{1}{4}$ H₂O; compuesto· $\frac{1}{2}$ H₂O; compuesto· $\frac{3}{4}$ H₂O; compuesto·2H₂O; compuesto·5 $\frac{1}{2}$ H₂O; compuesto·6H₂O; y similares. El "compuesto" puede ser cualquiera de los descritos en la presente memoria, tal como 3-(2-cianofenil)-5-

10 (2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona.

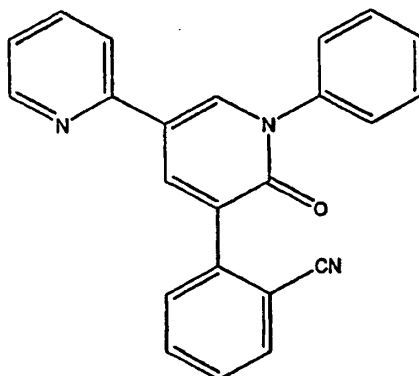
Las "sales farmacéuticamente aceptables" son bien conocidas en la técnica e incluyen las de ácidos inorgánicos, tales como hidrocloreuro, sulfato, hidrobromuro y fosfato; y las de ácidos orgánicos, tales como formiato, acetato, trifluoroacetato, metanosulfonato, bencenosulfonato y toluenosulfonato. Cuando se seleccionan ciertos

15 sustituyentes, los compuestos de la invención pueden formar, por ejemplo, sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio o potasio; sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio o magnesio; sales de aminas orgánicas, tales como una sal con trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, diciclohexilamina o N,N'-dibenciletilendiamina. Un experto en la técnica reconocerá que los compuestos de la invención se pueden elaborar en forma de cualquier otra sal farmacéuticamente aceptable.

20 El término "compuesto de 1,2-dihidropiridina" utilizado en la presente memoria incluye los compuestos de 1,2-dihidropiridina, las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de 1,2-dihidropiridina, estereoisómeros del compuesto de 1,2-dihidropiridina, las sales farmacéuticamente aceptables de los estereoisómeros del compuesto de 1,2-dihidropiridina, los hidratos de los compuestos de 1,2-dihidropiridina, los hidratos de las sales farmacéuticamente

25 aceptables del compuesto de 1,2-dihidropiridina, los estereoisómeros de los hidratos del compuesto de 1,2-dihidropiridina, y los estereoisómeros de los hidratos de las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de 1,2-dihidropiridina.

30 El compuesto de 1,2-dihidropiridina utilizado en los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria es el Compuesto A:



(A).

El nombre IUPAC para el Compuesto A es 2-(2-oxo-1-fenil-5-piridin-2-il-1,2-dihidropiridin-3-il)benzonitrilo. El Compuesto A puede ser referido también como 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona.

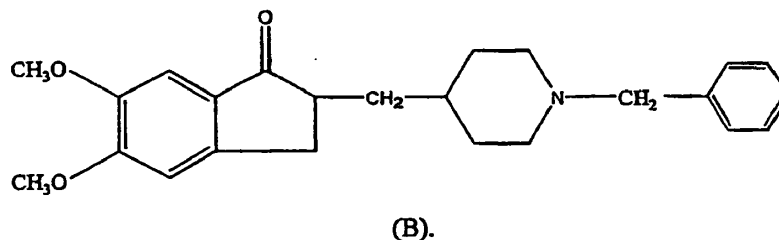
35 A lo largo de la memoria, se pretende que los términos "Compuesto A", "2-(2-oxo-1-fenil-5-piridin-2-il-1,2-dihidropiridin-3-il)benzonitrilo", y "3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona" incluyan sus sales farmacéuticamente aceptables, sus estereoisómeros, las sales farmacéuticamente aceptables de sus estereoisómeros, sus hidratos, los hidratos de sus sales farmacéuticamente aceptables, los estereoisómeros de sus hidratos, y los estereoisómeros de los hidratos de sus sales farmacéuticamente aceptables. En otra realización, se

40 pretende que los términos "Compuesto A," "2-(2-oxo-1-fenil-5-piridin-2-il-1,2-dihidropiridin-3-il)benzonitrilo", y "3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona" incluyan sus sales farmacéuticamente aceptables, sus hidratos, y los hidratos de sus sales farmacéuticamente aceptables.

45 El compuesto de 1,2-dihidropiridina y los métodos para la elaboración del compuesto de 1,2-dihidropiridina utilizados en la presente invención se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.949.571, la Publicación de los Estados Unidos Núm. 2004/0023973, y la Publicación PCT Núm. WO 03/047577, el documento WO 04/009553, el documento WO 06/004100, y el documento WO 06/004107, cuyas descripciones se incorporan como referencia en la presente memoria en su totalidad. Los métodos para la elaboración de otros antagonistas del receptor de AMPA se describen en el documento WO 2005/094797.

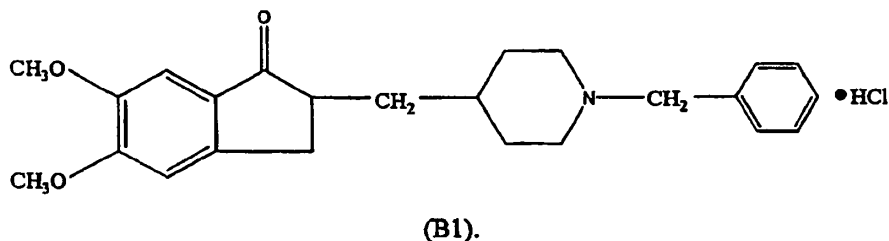
50

La presente invención emplea preferiblemente 1-bencil-4-((5,6-dimetoxi-1-indanon)-2-il)metilpiperidina; que está representada por la fórmula (B):



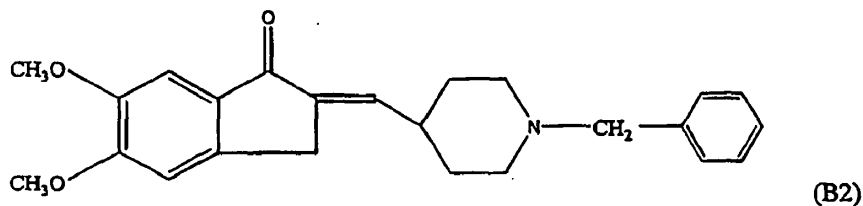
5 El compuesto de Formula (B), conocido como donepezilo, puede existir como un forma polimórfica o como un cristal polimórfico. Por ejemplo, el donepezilo puede estar en una forma polimórfica (II), (III), (IV), o (V); preferiblemente una forma polimórfica (III). El donepezilo puede estar en forma de cristales polimórficos (A), (B), o (C). Las formas polimórficas, los cristales polimórficos, y los métodos para la elaboración de formas polimórficas y cristales polimórficos se describen en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.985.864, 6.140.321 y 6.245.911, cuyas descripciones se incorporan como referencia en la presente memoria en su totalidad.

En otra realización, la presente invención emplea hidrocloreto de 1-bencil-4-((5,6-dimetoxi-1-indanon)-2-il)metilpiperidina, que también es conocido como hidrocloreto de donepezilo, y que está representado por la fórmula (B1):

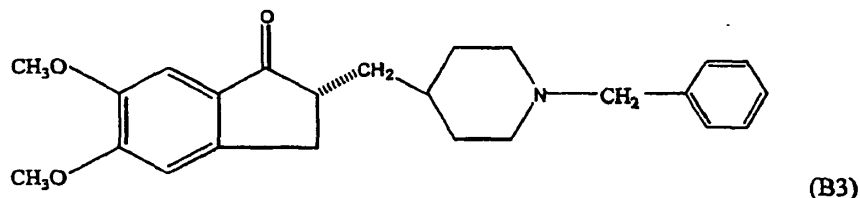


15 Los compuestos de la invención pueden tener uno o varios átomos de carbono asimétricos, dependiendo de los sustituyentes, y pueden tener estereoisómeros, que están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, el donepezilo o sus sales farmacéuticamente aceptables pueden estar en las formas descritas en las Solicitudes de Patente Japonesa Núms. 4-187674 y 4-21670.

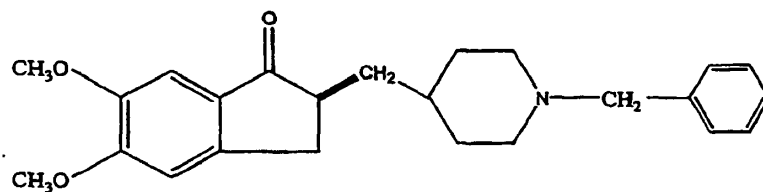
La Solicitud de Patente Japonesa Núm. 4-187674 describe un compuesto de formula (B2):



25 que puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, tal como una sal hidrocloreto. La Solicitud de Patente Japonesa Núm. 4-21670 describe compuestos de formula (B3):

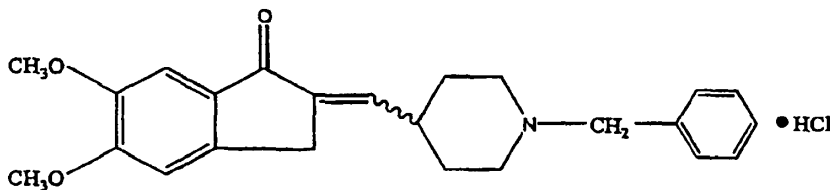


que pueden estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, tal como una sal hidrocloreto; y compuestos de formula (B4):



(B4)

que pueden estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, tal como una sal hidrocioruro; y compuestos de formula (B5):



(B5).

- 5
- A lo largo de la memoria, se pretende que los términos "donepezilo" y "1-bencil-4-((5,6-dimetoxi-1-indanon)-2-il)metilpiperidina" incluyan uno o más de los siguientes (p. ej., combinaciones de dos o más de los mismos): las sales farmacéuticamente aceptables; los estereoisómeros; las formas polimórficas y los cristales polimórficos.
- 10 El donepezilo descrito en la presente memoria es asequible comercialmente o se puede preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.895.841, 5.985.864, 6.140.321 y 6.245.911; el documento WO 98/39000, y las Solicitudes de Patente Japonesa Núms. 4-187674 y 4-21670.
- 15 También se describen en la presente memoria composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de: (i) al menos un antagonista del receptor de AMPA; (ii) al menos un nootrópico; y (iii) un excipiente farmacéuticamente aceptable. El antagonista del receptor de AMPA es el compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria. El nootrópico es el inhibidor de colinesterasa donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables descritos en la presente memoria.
- 20 También se describe en la presente memoria combinaciones de uso que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de (i) al menos un antagonista del receptor de AMPA y (ii) al menos un nootrópico. La combinación se puede administrar separadamente (p. ej., simultáneamente, sucesivamente) a un paciente para el tratamiento las enfermedades o trastornos descritos en la presente memoria (p. ej., los deterioros cognitivos, la demencia y similares). El antagonista del receptor de AMPA es el compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria. El nootrópico es el inhibidor de colinesterasa donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables descritos en la presente memoria.
- 25 También se describen en la presente memoria envases comerciales (p. ej., kits) que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de: (i) al menos un antagonista del receptor de AMPA y (ii) al menos un nootrópico; y (iii) instrucciones para su uso simultáneo, separado o sucesivo en el tratamiento de la enfermedades y trastornos descritos en la presente memoria. El antagonista del receptor de AMPA es el compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria. El nootrópico es el inhibidor de colinesterasa donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables descritos en la presente memoria.
- 30 También se describen en la presente memoria composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de: (i) el compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria (ii) donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables inhibidor, y (iii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Se describen adicionalmente en la presente memoria combinaciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de: (i) el compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria y (ii) donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; donde los compuestos se puede administrar separadamente (p. ej., simultáneamente, sucesivamente) a un paciente para el tratamiento las enfermedades o los trastornos descritos. También se describen en la presente memoria envases comerciales (p. ej., kits) que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de: (i) el compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria (ii) donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables; y (iii) instrucciones para el uso simultáneo, separado o sucesivo de (i) y (ii) en el tratamiento de la enfermedades y trastornos descritos en la presente memoria. El compuesto de 1,2-dihidropiridina puede ser cualquiera de los descritos en la presente memoria. Las composiciones farmacéuticas
- 35
- 40
- 45

pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de: (i) donepezilo; (ii) 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona; y (iii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se describen adicionalmente en la presente memoria (i) métodos para el tratamiento de uno o más deterioros cognitivos en un paciente que lo necesite; (ii) métodos para el tratamiento de la demencia en un paciente que lo necesite; y (iii) métodos para retrasar el comienzo de la demencia o uno más deterioros cognitivos en un paciente que lo necesite mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de: (a) el compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria y (b) donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. El compuesto de 1,2-dihidropiridina y donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar separadamente o se pueden administrar forma de una composición.

Los métodos para el tratamiento de la demencia incluyen métodos para el tratamiento de las alteraciones del comportamiento asociadas con la demencia. Las alteraciones del comportamiento ilustrativas incluyen la desinhibición sexual, los cambios en la actividad, los cambios en las relaciones interpersonales, la agresividad física, la no agresividad física (p. ej., deambulación errática), agresividad verbal, y la no agresividad verbal (p. ej., vocalización repetitiva).

La causa o las causas del deterioro o los deterioros cognitivos o la demencia pueden ser conocidas o desconocidas. Por ejemplo, la demencia y el deterioro o los deterioros cognitivos pueden estar ocasionados por la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Pick, la enfermedad con cuerpos de Lewy, las enfermedades vasculares (p. ej., enfermedades cerebrovasculares), el VIH, el SIDA, la epilepsia, los tumores cerebrales, las lesiones cerebrales, la esclerosis múltiple, el síndrome de Down, el síndrome de Rett, la parálisis supranuclear progresiva, el síndrome del lóbulo frontal, la esquizofrenia, las lesiones cerebrales traumáticas (p. ej., lesiones cerradas de la cabeza), la post-cirugía de injerto de bypass arterial coronario, la terapia con choques electroconvulsivos, la quimioterapia, la terapia de radiación, la exposición a radiación, la encefalitis, la meningitis, el síndrome alcohólico fetal, el síndrome de Korsakoff, la lesión cerebral anóxica, la resucitación cardiopulmonar, la diabetes, la menopausia, los ictus, los altos niveles de colesterol, o los trastornos de la médula espinal (p. ej., lesión en la médula espinal, isquemia de la médula espinal, infarto de la médula espinal, convulsiones de la médula espinal). En una realización, los deterioros cognitivos pueden ser deterioros cognitivos leves o deterioros cognitivos asociados con la edad. Para descripciones adicionales de los deterioros cognitivos, la demencia, y las causas de los deterioros cognitivos y la demencia, las descripciones de la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.458.807, la Publicación de los Estados Unidos Núm. 2006/0018839, y el documento WO 2005/074535 se incorporan como referencia en la presente memoria en su totalidad.

Los deterioros cognitivos pueden ser deterioros cognitivos o disfunciones caninas (CCD), que son los deterioros de las capacidades cognitivas relacionados con la edad de los perros caracterizados por cambios en el comportamiento que no pueden ser atribuidos completamente a las condiciones médicas generales. Cuando se preparan composiciones veterinarias, un experto en la técnica apreciaría que la composición podría contener una cantidad terapéuticamente eficaz de: (a) el compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria (p. ej., 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona), (b) donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y (c) un portador aceptable desde el punto de vista veterinario. La cantidad de dosificación para un perro se puede lograr fácilmente basándose en las dosificaciones que son aceptables para seres humanos y el tamaño y el peso del perro.

También se describen en la presente memoria (i) métodos para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa; y (ii) métodos para retrasar el comienzo de una enfermedad neurodegenerativa en un paciente que lo necesite mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de: (a) el compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria y (b) donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. El compuesto de 1,2-dihidropiridina y donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar separadamente o se pueden administrar en forma de una composición. La enfermedad neurodegenerativa puede ser cualquiera conocida en la técnica. Las enfermedades neurodegenerativas ilustrativas incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Pick, la enfermedad con cuerpos de Lewy, las enfermedades priónicas (p. ej., enfermedad de Creutzfeldt-Jakob), la esclerosis múltiple, la epilepsia, los ictus, y similares.

También se describen en la presente memoria (i) métodos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer; y (ii) métodos para retrasar el comienzo de la enfermedad de Alzheimer en un paciente que lo necesite mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de: (a) el compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria y (b) donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. La enfermedad de Alzheimer puede ser leve, moderada, o grave. El compuesto de 1,2-dihidropiridina y donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar separadamente o se pueden administrar en forma de una composición.

También se describen en la presente memoria (i) métodos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson; y (ii) métodos para retrasar el comienzo de la enfermedad de Parkinson en un paciente que lo necesite mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de: (a) el compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria y (b) donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. El compuesto de 1,2-dihidropiridina y donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar separadamente o se pueden administrar en forma de una composición.

También se describe en la presente memoria el uso de (i) métodos para el tratamiento de la enfermedad de Huntington; y (ii) métodos para retrasar el comienzo de la enfermedad de Huntington en un paciente que lo necesite mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de: (a) el compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria y (b) donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. El compuesto de 1,2-dihidropiridina y donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar separadamente o se pueden administrar en forma de una composición.

También se describen en la presente memoria (i) métodos para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica; y (ii) métodos para retrasar el comienzo de la esclerosis lateral amiotrófica en un paciente que lo necesite mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de: (a) el compuesto de 1,2-dihidropiridina descrito en la presente memoria y (b) donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. El compuesto de 1,2-dihidropiridina y donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar separadamente o se pueden administrar en forma de una composición.

Los compuestos de 1,2-dihidropiridina descritos en la presente memoria, y el donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar oralmente, tópicamente, parenteralmente, mediante inhalación (nasal u oral), o rectalmente en formulaciones de dosificación unitaria que contienen portadores, coadyuvantes, y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales según se desee. El término parenteral incluye la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraesternal, o técnicas de infusión.

La dosis diaria de los compuestos de 1,2-dihidropiridina de la invención (3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona) es usualmente de alrededor de 30 µg a 10 gramos, preferiblemente, de 100 µg a 5 gramos o, más preferiblemente, de 100 µg a 100 mg en el caso de la administración oral. Para la administración mediante inyectable, la dosis diaria es usualmente de alrededor de 30 µg a 1 gramo, preferiblemente de 100 µg a 500 mg o, más preferiblemente, de 100 µg a 30 mg. El compuesto se administra una vez al día o en varias porciones al día. Cuando se utiliza en el contexto de una cantidad de dosificación, el peso numérico hace referencia al peso del compuesto de 1,2-dihidropiridina de la invención, excluyendo cualquier sal, contraión, hidrato, y similares. Por lo tanto para obtener el equivalente a 500 miligramos de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, sería necesario utilizar más de 500 miligramos de una y/o hidrato sal farmacéuticamente aceptables del compuesto, debido al peso adicional de la sal y/o hidrato farmacéuticamente aceptable.

La dosis diaria de donepezilo es usualmente de alrededor de 0,1 miligramos a 100 miligramos, preferiblemente de 1 miligramo a 50 miligramos, más preferiblemente de 5 miligramos a 25 miligramos. En otra realización, la dosis diaria es de 10 miligramos a 20 miligramos; o de 5 miligramos a 10 miligramos. Los compuestos se administran una vez al día o en varias porciones a día. Cuando se utilizan en el contexto de una cantidad de dosificación, el peso numérico hace referencia al peso del donepezilo, excluyendo cualquier sal, contraión, y similares. Por lo tanto para obtener el equivalente a 10 miligramos de donepezilo, sería necesario utilizar más de 10 miligramos del hidrocloreto de donepezilo, debido al peso adicional del hidrocloreto.

En una realización, el modo de administración es por medio de inyección, tal como inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa, o inyección intra-arterial. Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles se pueden formular de acuerdo con la técnica utilizando agentes dispersantes o humectantes adecuados, agentes suspensores (p. ej., metilcelulosa, Polisorbato 80, hidroximetil-celulosa, acacia, tragacanto en polvo, carboximetilcelulosa sódica, monolaurato de polioxietilensorbitán y similares), modificadores del pH, tampones, agentes solubilizantes (p. ej., aceite de ricino hidrogenado polioxietileno, Polisorbato 80, nicotinamida, monolaurato polioxietilensorbitán, Macrogol, un ácido grado del éster étilico de aceite de ricino, y similares) y conservantes. La preparación inyectable estéril también puede ser solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden utilizar se encuentran el agua, la solución de Ringer, y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se utilizan convencionalmente aceites fijados, estériles como medio disolvente o suspensor. Para este fin se puede utilizar cualquier aceite fijado blando incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos, además se pueden utilizar, ácidos grasos, tales como ácido oleico, en la preparación de inyectables. Las preparaciones se pueden liofilizar por medio de los métodos conocidos en la técnica.

Las formas de dosificación sólidas para su administración oral pueden incluir goma de mascar, cápsulas, comprimidos, comprimidos sublinguales, polvos, gránulos, y geles. En tales formas de dosificación sólidas, el

compuesto activo se puede mezclar con uno o más diluyentes inertes tales como lactosa o almidón. Como es práctica normal, tales formas de dosificación pueden comprender también otras sustancias incluyendo agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. En el caso de las cápsulas, los comprimidos, y las píldoras, las formas de dosificación pueden comprender también agentes tamponadores. Los comprimidos se pueden preparar con recubrimientos entéricos o peliculares, preferiblemente recubrimientos peliculares.

Para elaborar comprimidos, los compuestos se pueden mezclar con portadores farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, vehículos (p. ej., lactosa, azúcar blanco, manitol, glucosa, almidones, carbonato de calcio, celulosa cristalina, ácido silícico, y similares), aglutinantes (p. ej., agua, etanol, miranol, solución de glucosa, solución de almidón, solución de gelatina, polivinilpirrolidona, y similares), disgregantes (p. ej., almidón seco, alginato de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, carbonato de calcio, ésteres de ácidos grasos y polioxietilensorbitán, laurilsulfato de sodio, monoglicérido de ácido esteárico, almidones, lactosa, y similares), promotores de la absorción (p. ej., base de amonio cuaternario, laurilsulfato de sodio, y similares), agentes humectantes (p. ej. glicerina, almidones, y similares), lubricantes (p. ej., estearatos, polietilenglicol, y similares), y agentes aromatizantes (p. ej., edulcorantes). Los comprimidos pueden estar en forma de un comprimido convencional, un comprimido moldeado, una oblea y similares.

La administración sublingual hace referencia a la administración en la boca (p. ej., debajo de la lengua, entre la mejilla y la encía, entre la lengua y el paladar). El revestimiento de la mucosa altamente vascular en la boca es una localización conveniente para administrar los compuestos en el organismo.

En otras realizaciones, la forma de dosificación sólida se puede empaquetar en forma de gránulos o polvo en un portador farmacéuticamente aceptable, donde los gránulos o el polvo se retiran del envase y se espolvorean sobre el alimento o se mezclan con un líquido, tal como agua o zumo, o en el que los gránulos se insertan en cápsulas. En esta realización, los compuestos descritos en la presente memoria se pueden mezclar con agentes aromatizantes o edulcorantes. El material de envasado puede ser plástico, papel revestido, o cualquier material que evite que el agua o la humedad alcancen los gránulos y/o el polvo.

Las formas de dosificación líquidas para su administración oral pueden incluir emulsiones, soluciones, soluciones sublinguales, suspensiones, y jarabes farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica, tales como el agua. Tales composiciones pueden comprender también coadyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes suspensores, y agentes edulcorantes, aromatizantes, y perfumantes. Para elaborar soluciones sublinguales, los compuestos se pueden mezclar con diversos portadores, excipientes, agentes para el ajuste del pH, y similares (p. ej., agua, azúcar, ácido láctico, ácido acético, fructosa, glucosa, sacarina, polietilenglicol, propilenglicol, alcohol, bentonita, tragacanto, gelatina, alginatos, aspartamo, sorbitol, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio, aromas artificiales y agentes colorantes).

Para la administración mediante inhalación, los compuestos pueden ser liberados a partir de un insuflador, un nebulizador o un envase presurizado u otro modo conveniente de liberación de una pulverización mediante aerosol. Los envases presurizados pueden incluir un propelente adecuado. Alternativamente, para su administración mediante inhalación, los compuestos se pueden administrar en forma de una composición de polvo seco o en forma de una pulverización líquida.

Los supositorios para la administración rectal se pueden preparar mezclando los compuestos activos con excipientes no irritantes adecuados tales como manteca de cacao y polietilenglicoles que son sólidos a la temperatura ambiente y líquidos a la temperatura corporal. Alternativamente, se puede preparar un enema para la administración rectal de los compuestos descritos en la presente memoria.

Para la administración tópica a la epidermis, los compuestos se pueden formular en forma de pomadas, cremas o lociones, o en forma del ingrediente activo de un parche transdérmico. Los compuestos se pueden administrar también vía iontoforesis o bomba osmótica. Las pomadas, cremas y lociones se pueden formular con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Alternativamente, las pomadas, cremas y lociones se pueden formular con una base acuosa u oleosa y pueden contener también uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes suspensores, agentes espesantes, y/o agentes colorantes. En cuanto a las cremas o lociones, los compuestos se pueden mezclar para formar una crema o loción homogénea, suave, por ejemplo, con uno o más conservantes (p. ej., alcohol bencílico al 1% o 2% (p/p)), ceras emulsionantes, glicerina, palmitato de isopropilo, ácido láctico, agua purificada, solución de sorbitol. Tales composiciones administrables tópicamente pueden contener polietilenglicol 400. Para formar pomadas, los compuestos se pueden mezclar con uno o más conservantes (p. ej., alcohol bencílico al 2% (p/p)), petrolato, cera emulsionante, y Tenox (II) (p. ej., hidroxianisol butilado, galato de propilo, ácido cítrico, propilenglicol). Las compresas tejidas o los rollos de material para vendajes, p. ej., gasa, se pueden impregnar con las composiciones administrables transdérmicamente para la aplicación tópica.

Los compuestos se pueden aplicar también tópicamente utilizando un sistema transdérmico, tal como uno de un polímero adhesivo con una base acrílica con un agente de entrecruzamiento resinoso impregnado con los compuestos descritos en la presente memoria y laminado a un soporte impermeable. Por ejemplo, los compuestos se pueden administrar en forma de un parche transdérmico, tal como un parche transdérmico de liberación sostenida. Los parches transdérmicos pueden incluir cualquier forma convencional tal como, por ejemplo, una matriz adhesiva, una matriz polimérica, un parche reservorio, una estructura laminada de tipo matriz o monolítica, y comprenden generalmente una o más capas de soporte, adhesivos, potenciadores de la penetración, y/o membranas para el control de la velocidad. Los parches transdérmicos tienen generalmente a un forro de liberación que se retira para exponer el adhesivo/ingrediente o ingredientes activos antes de su aplicación. Los parches transdérmicos se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.262.165, 5.948.433, 6.010.715 y 6.071.531, cuyas descripciones se incorporan como referencia en la presente memoria en su totalidad.

La invención proporciona los compuestos que se van a administrar nasalmente a un paciente para el tratamiento de las enfermedades y trastornos descritos en la presente memoria. Se pretende que "administrado nasalmente" o "administración nasal" signifiquen que al menos un compuesto se combina con un sistema de liberación adecuado para la absorción a través de la mucosa nasal de un paciente. Generalmente, se pueden utilizar dosis menores del compuesto para la administración nasal cuando se compara, por ejemplo, con la dosis requerida para la administración oral.

Los compuestos se pueden administrar, por ejemplo, en forma de pulverizaciones nasales, gotas nasales, suspensiones nasales, geles nasales, pomadas nasales, cremas nasales o polvos nasales. Los compuestos se pueden administrar también utilizando tampones nasales o esponjas nasales. Los compuestos se pueden llevar a una base viscosa a través de sistemas utilizados convencionalmente, por ejemplo, gomas naturales, metilcelulosa y derivados, polímeros acrílicos (carbopol) y polímeros vinílicos (polivinilpirrolidona). A las composiciones, se les pueden añadir muchos otros excipientes conocidos en la técnica tales como agua, conservantes, tensioactivos, disolventes, adhesivos, antioxidantes, tampones, bio-adhesivos, agentes aumentadores de la viscosidad y agentes para el ajuste del pH y la osmolaridad.

Los sistemas de liberación nasal pueden adoptar diversas formas incluyendo disoluciones acuosas, disoluciones no acuosas y combinaciones de las mismas. Las disoluciones acuosas incluyen, por ejemplo, geles acuosos, suspensiones acuosas, dispersiones liposomales acuosas, emulsiones acuosas, microemulsiones acuosas y combinaciones de las mismas. Las disoluciones no acuosas incluyen, por ejemplo, geles no acuosos, suspensiones no acuosas, dispersiones liposomales no acuosas, emulsiones no acuosas, microemulsiones no acuosas y combinaciones de las mismas.

En otras realizaciones, el sistema de liberación nasal puede ser una formulación de polvo. Las formulaciones de polvo incluyen, por ejemplo, mezclas de polvo, microesferas de polvo, microesferas de polvo revestidas, dispersiones liposomales y combinaciones de las mismas. Preferiblemente, la formulación de polvo son microesferas de polvo. Las microesferas de polvo se forman preferiblemente a partir de varios polisacáridos y celulosas seleccionados entre almidón, metilcelulosa, goma xantana, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero, alginato, poli(alcohol vinílico), acacia, quitosanas, y mezclas de dos o más de los mismos.

En ciertas realizaciones, el tamaño de partícula de las gotitas de la disolución acuosa y/o no acuosa o de los polvos liberados a la mucosa nasal puede ser, por ejemplo, de alrededor de 0,1 micra a alrededor de 100 micras; de alrededor de 1 micra a alrededor de 70 micras; de alrededor de 5 micras a alrededor de 50 micras; o de alrededor de 10 micras a alrededor de 20 micras. Los tamaños de partícula se pueden obtener utilizando recipientes adecuados o dispositivos de medición conocidos en la técnica. Los dispositivos ilustrativos incluyen bombas mecánicas en las que la liberación se realiza por medio del movimiento de un pistón; mecanismos de aire comprimido en los que la liberación se realiza por medio de aire bombeado a mano en el recipiente, técnicas con gas comprimido (p. ej., nitrógeno) en las que la liberación se realiza por medio de la liberación controlada de un gas comprimido en el contenedor sellado; técnicas con propelentes licuados en las que un hidrocarburo líquido de bajo punto de ebullición (p. ej., butano) se vaporiza para ejercer una presión y fuerza la composición a través de una válvula de dosis fija; y similares. Los polvos se pueden administrar, por ejemplo, de tal manera que se encapsulan en una cápsula que a continuación se coloca en un dispositivo de inhalación o insuflación. Una aguja penetra a través de la cápsula para realizar poros en la parte superior e inferior la cápsula y se envía aire para expulsar las partículas de polvo. La formulación de polvo se puede administrar también en una pulverización a chorro de un gas inerte o suspendida en fluidos orgánicos líquidos.

También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica administrable nasalmente que comprende al menos un compuesto dispersado en un sistema de liberación nasal que mejora la solubilidad del compuesto. El sistema de liberación nasal que mejora la solubilidad puede incluir uno de los siguientes o combinaciones de los mismos: (i) un derivado de glicol (p. ej., propilenglicol, polietilenglicol, mezclas de los mismos); (ii) un alcohol de azúcar (p. ej., manitol, xilitol, mezclas de los mismos); (iii) glicerina; (iv) un derivado de glicol (p. ej.,

propilenglicol, polietilenglicol o mezclas de los mismos) y glicerina; (v) ácido ascórbico y agua, (vi) ascorbato de sodio y agua; o (vii) metabisulfito de sodio y agua.

5 También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica administrable nasalmente que comprende al menos un compuesto descrito en la presente memoria y un sistema de liberación nasal, donde el sistema de liberación nasal comprende al menos un tampón para mantener el pH del compuesto descrito en la presente memoria, al menos un agente espesante farmacéuticamente aceptable y al menos un humectante. El sistema de liberación nasal puede comprender adicionalmente de manera opcional tensioactivos, conservantes, antioxidantes, bio-adhesivos, agentes para el ajuste del pH, agentes isotónicos, agentes solubilizantes, y/u otros excipientes farmacéuticamente aceptables. El compuesto descrito en la presente memoria se puede dispersar opcionalmente en un sistema de liberación nasal que mejora su solubilidad.

15 También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica administrable nasalmente que comprende al menos un compuesto descrito en la presente memoria y un sistema de liberación nasal, donde el sistema de liberación nasal comprende al menos un agente solubilizante, al menos un agente espesante farmacéuticamente aceptable y al menos un humectante. El sistema de liberación nasal puede comprender adicionalmente de manera opcional tampones, agentes para el ajuste del pH, agentes isotónicos, tensioactivos, conservantes, antioxidantes, bio-adhesivos, y/o otros excipientes farmacéuticamente aceptables. El compuesto descrito en la presente memoria se puede dispersar opcionalmente en un sistema de liberación nasal que mejora su solubilidad.

25 También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica administrable nasalmente que comprende al menos un compuesto descrito en la presente memoria y un sistema de liberación nasal, donde el sistema de liberación nasal comprende al menos un tampón para mantener el pH del compuesto, al menos un agente espesante farmacéuticamente aceptable, al menos un humectante, y al menos un tensioactivo. El sistema de liberación nasal puede comprender adicionalmente de manera opcional agentes para el ajuste del pH, agentes isotónicos, agente solubilizantes, conservantes, antioxidantes, bio-adhesivos, y/o otros excipientes farmacéuticamente aceptables. El compuesto descrito en la presente memoria puede ser dispersado opcionalmente en un sistema de liberación nasal que mejora su solubilidad.

30 También se describe en la presente memoria es una composición farmacéutica administrable nasalmente que comprende al menos un compuesto descrito en la presente memoria y un sistema de liberación nasal, donde el sistema de liberación nasal comprende al menos un agente espesante farmacéuticamente aceptable, al menos un humectante, al menos un tensioactivo, y al menos un agente solubilizante. El sistema de liberación nasal puede comprender adicionalmente de manera opcional tampones, agentes para el ajuste del pH, agentes isotónicos, conservantes, antioxidantes, bio-adhesivos, y/o otros excipientes farmacéuticamente aceptables. El compuesto puede ser dispersado opcionalmente en un sistema de liberación nasal que mejora su solubilidad.

40 También se describe en la presente memoria es una composición farmacéutica administrable nasalmente que comprende al menos un compuesto descrito en la presente memoria y un sistema de liberación nasal, donde el sistema de liberación nasal comprende al menos un tampón para mantener el pH del compuesto, al menos un agente espesante farmacéuticamente aceptable, al menos un humectante, al menos un tensioactivo, y al menos un agente solubilizante. El sistema de liberación nasal puede comprender adicionalmente de manera opcional tampones, agentes para el ajuste del pH, agentes isotónicos, conservantes, antioxidantes, bio-adhesivos, y/o otros excipientes farmacéuticamente aceptables. El compuesto descrito en la presente memoria se puede dispersar opcionalmente en un sistema de liberación nasal que mejora su solubilidad.

50 El tampón tiene un pH que se selecciona para optimizar la absorción del compuesto de 1,2-dihidropiridina través de la mucosa nasal. El pH concreto del tampón puede variar dependiendo de la formulación de liberación nasal concreta así como del compuesto específico seleccionado. Los tampones que son adecuados para su uso en la invención incluyen acetato (p. ej., acetato de sodio), citrato (p. ej., citrato de sodio dihidratado), ftalato, borato, prolamina, trolamina, carbonato, fosfato (p. ej., fosfato monopotásico, fosfato disódico), y mezclas de dos o más de los mismos.

55 El pH de las composiciones se debe mantener de alrededor de 3,0 a alrededor de 10,0. Las composiciones que tienen un pH de menos de alrededor de 3,0 o de más de alrededor de 10,0 pueden aumentar el riesgo de irritación de la mucosa nasal del paciente. Adicionalmente, es preferible que el pH de las composiciones se mantenga de alrededor de 3,0 a alrededor de 9,0. Con respecto a las formulaciones nasales no acuosas, las formas adecuadas de los agentes tamponadores se pueden seleccionar de manera que cuando la formulación se libera en la cavidad nasal de un mamífero, se alcanzan allí intervalos de pH seleccionados después del contacto con, p. ej., una mucosa nasal.

60 El agente solubilizante para su uso en las composiciones de la invención puede ser cualquiera de los conocidos en la técnica, tal como ácidos carboxílicos y sales de los mismos. Las sales de ácidos carboxílicos ilustrativas incluyen

acetato, gluconato, ascorbato, citrato, fumarato, lactato, tartrato, maleato, maleato, succinato, o mezclas de dos o más de los mismos.

La viscosidad de las composiciones de la presente invención se puede mantener a un nivel deseado utilizando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la viscosidad puede ser de al menos 1000 cps; de alrededor de 1000 a alrededor de 10.000 cps; de alrededor de 2000 cps a alrededor de 6500 cps; o de alrededor de 2500 cps a alrededor de 5000 cps. Los agentes espesantes que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, metilcelulosa, goma xantana, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero, poli(alcohol vinílico), alginatos, acacia, quitosanas, y mezclas de dos o más de los mismos. La concentración del agente espesante dependerá del agente seleccionado y de la viscosidad deseada. Tales agentes se pueden utilizar también en una formulación de polvo.

Las composiciones administrables nasalmente pueden incluir también un humectante para reducir o prevenir la sequedad de las membranas mucosas y para prevenir su irritación. Los humectantes adecuados que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, sorbitol, aceite mineral, aceite vegetal y glicerol; agentes analgésicos; acondicionadores de la membrana; edulcorantes; y mezclas de dos o más de los mismos. La concentración del humectante variará dependiendo del agente seleccionado. En una realización, el humectante puede estar presente en el sistema de liberación nasal en una concentración que oscila de alrededor de 0,01% a alrededor de 20% en peso de las composiciones.

El sistema de liberación nasal puede comprender adicionalmente tensioactivos que aumentan la absorción del compuesto. Los tensioactivos adecuados incluyen tensioactivos no iónicos, aniónicos y catiónicos. Los tensioactivos ilustrativos incluyen ácido oleico, derivados de polioxietileno de ácidos grasos, ésteres parciales de anhídrido de sorbitol, tal como por ejemplo, Tweens (p. ej., Tween 80, Tween 40, Tween 20), Spans (p. ej., Span 40, Span 80, Span 20), estearato de polioxilo 40, estearato de polioxietileno 50, fusieatos, sales biliares, octoxinol, y mezclas de dos o más de los mismos. Los tensioactivos aniónicos ilustrativos incluyen sales de hidrocarburos de cadena larga (p. ej., C6-C30 o C10-C20) que tienen uno o más de los siguientes grupos funcionales: carboxilatos; sulfonatos; y sulfatos. Se prefieren las sales de hidrocarburos de cadena larga que tienen sulfato grupos funcionales, tales como cetostearilsulfato de sodio, dodecilsulfato de sodio y tetradecilsulfato de sodio. Un tensioactivo aniónico particularmente preferido es el laurilsulfato de sodio (esto es, dodecilsulfato de sodio). Los tensioactivos pueden estar presentes en una cantidad de alrededor de 0,001% a alrededor de 50% en peso, o de alrededor de 0,001% a alrededor de 20% en peso.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender adicionalmente un agente isotónico, tal como cloruro de sodio, dextrosa, ácido bórico, tartrato de sodio u otros solutos inorgánicos u orgánicos.

Las composiciones farmacéuticas nasales descritas en la presente memoria se pueden utilizar opcionalmente combinadas con un agente para el ajuste del pH. Los agentes para el ajuste del pH ilustrativos incluyen ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, y similares.

Para prolongar su vida útil, se pueden añadir conservantes a las composiciones administrables nasalmente. Los conservantes adecuados que se pueden utilizar incluyen alcohol bencílico, parabenos, timerosal, clorobutanol, cloruro de benzalconio, o mezclas de dos o más de los mismos. Se utiliza preferiblemente cloruro de benzalconio. Por lo general, el conservante estará presente a una concentración de hasta aproximadamente 2% en peso. La concentración exacta del conservante, no obstante, variará dependiendo del uso pretendido y puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica.

Se pueden añadir otros ingredientes que prolongan la vida útil tales como por ejemplo, antioxidantes. Algunos ejemplos de los antioxidantes incluyen metabisulfito de sodio, metabisulfito de potasio, palmitato de ascorbilo y similares. Por lo general, el antioxidante estará presente en las composiciones a una concentración de alrededor de 0,001 % hasta alrededor de 5% en peso de la composición total.

Los sistemas de liberación nasal se pueden elaborar siguiendo los procedimientos descritos, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.451.848, 6.436.950, y 5.874.450, y el documento WO 00/00199, cuyas descripciones se incorporan como referencia en la presente memoria en su totalidad.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos tienen únicamente fines ilustrativos y no se pretende que limiten el espíritu o el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1

Se ha estudiado el papel de la dopamina en la cognición, la emoción y el funcionamiento motor. Se informó de que había un vínculo entre el déficit dopaminérgico nigroestriatal relacionado con la edad y el déficit de la función cognitiva relacionado con la edad. Erixon-Lindroth et al, *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 138:1-12 (2005). También se informó de que la manipulación farmacológica de los sistemas de dopamina podría modificar el rendimiento cognitivo en seres humanos. Luciana et al, *Cereb. Cortex*, 8:218-226 (1998); Kimberg et al, *Neuropsychologia*, 41:1020-1027 (2003). La facilitación de la actividad dopaminérgica podría mejorar la función cognitiva en seres humanos.

A menudo se utilizan inhibidores de la acetilcolinesterasa para el tratamiento de la demencia. Se informó de que el donepezilo puede aumentar la liberación de dopamina en el cerebro, y también se informó de que la administración simultánea con el inhibidor de la MAO-B selegilina aumentó la capacidad de aprendizaje. Giacobini et al, *Neuropharmacology*, 35:205-211 (1996); Takahata et al, *Eur. J. Pharmacol.*, 518:140-144 (2005). También se informó de que otros fármacos para la enfermedad de Alzheimer (p. ej., memantina) tienen algún efecto sobre el recambio de dopamina y son eficaces combinados con el donepezilo. Bubser et al, *Eur. J. Pharmacol.*, 229:75-82 (1992); Tariot et al, *JAMA*, 291:317-324 (2004). Estos resultados indicaron que la mejora de la función cognitiva por los inhibidores de la acetilcolinesterasa puede ser aumentada por los compuestos que tienen efectos positivos sobre la actividad dopaminérgica.

Se utilizaron ratones C57BL/6 (SLC, Shizuoka, Japón) para el experimento. Se suspendieron o disolvieron 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona y donepezilo en una solución de metilcelulosa al 0,5%. Los dos fármacos se administraron oralmente por medio de gavage 1 hora antes de la toma de muestras. En el momento de sacrificar los ratones, se diseccionaron rápidamente ambos cuerpos estriados y se congelaron con nitrógeno líquido. Las muestras se sometieron a sonicación a continuación en 0,5 ml de ácido perclórico 0,5 M congelado que contenía EDTA 0,1 M, y se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min a 4°C. Los niveles de monoamina se midieron por medio de HPLC con detección electroquímica. Se separaron alícuotas de sobrenadante de 20 µl sobre una columna Eicompak SC5-ODS (3 x 150 mm; Eicom, Japón) con una fase móvil de 17% de metanol, 83% de tampón acetato/citrato 0,1M (pH 3,5) que contenía 190 mg/ml de 1-octanosulfonato de sodio y 50 mg/ml de EDTA, y una velocidad de flujo de 0,65 ml/min. Los picos de dopamina, DOPAC, HVA, 5-HT, y 5-HIAA se cuantificaron mediante integración del área con PowerChrom (eDAQ, Australia), y las concentraciones se expresaron en forma de nanogramos por miligramo de tejido estriatal.

Como se muestra en la Figura 1, 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona (esto es, el Compuesto A) elevó el contenido de HVA, que es un metabolito de la dopamina en el cuerpo estriado a 1 mg/kg.

Ejemplo 2

El donepezilo redujo el contenido de dopamina significativamente pero la elevación del metabolito de dopamina no alcanzó significación. La Figura 2 muestra que DPAC/DA y HVA/DA, que también indicaban el aumento del recambio de dopamina, aumentaron significativamente. Se observaron síntomas sobre el comportamiento del donepezilo en el experimento. Los ratones tratados con donepezilo mostraron efectos secundarios periféricos a 7,5 mg/kg y superior. Estos resultados indican que la monoterapia con 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona y la monoterapia con donepezilo modularon el recambio de dopamina pero ninguno alcanzó significación, sugiriendo un efecto modesto sobre el recambio de dopamina. La Figura 3, no obstante, muestra que la combinación de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona y donepezilo facilitaron inesperadamente un recambio de dopamina superior en ratones en comparación con la monoterapia con los compuestos individuales. Este experimento demuestra que la terapia combinada de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona y donepezilo (cuando se comparó con la monoterapia con 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona o donepezilo) se puede utilizar para el tratamiento disfunciones cognitivas, demencia, y enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 3

El Ejemplo 5 muestra los efectos neuroprotectores de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona y donepezilo. Una combinación de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona y donepezilo muestra claros efectos neuroprotectores de la excitotoxicidad; sin embargo, el perfil de ambos fármacos es diferente. Por lo tanto, se pueden requerir enfoques complementarios para maximizar los efectos neuroprotectores por medio de la combinación de fármacos para detener el progreso de las enfermedades neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y similares.

Se ha descrito que las enfermedades neurodegenerativas exhiben excitotoxicidad en el proceso de neurodegeneración. Rego et al, *Neurochemical Research*, 28:1563-1574 (2003). La 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-

fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona es un antagonista de AMPA. Los antagonistas de AMPA tienen un efecto sobre las condiciones endocitóticas inducidas por kainato y estrés metabólico. Ohno et al, JPET, 306:66-72 (2003); Matsuoka et al, Neuroreport, 6:2205-2208 (1995). Por otro lado, se sabe que los antagonistas de AMPA no muestran efectos protectores o los muestran de manera limitada contra la toxicidad inducida por NMDA. Kristensen, Brain Res., 917:21-44 (2001).

El donepezilo, asequible comercialmente como ARICEPT® (Eisai, Inc., Teaneck, NJ) se prescribe para la enfermedad de Alzheimer. El donepezilo mejora la cognición en pacientes con demencia, que está causada por la inhibición de la acetilcolinesterasa. El donepezilo exhibe efectos neuroprotectores contra la excitotoxicidad inducida por NMDA, pero no por kainato. Akasofu et al, Eur. J. Pharmacol., 530:215-222 (2006). Los efectos neuroprotectores del donepezilo están apoyados por descubrimientos clínicos en atrofia cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Hashimoto et al, Am J. Psychiatry, 162:676-682 (2005). El donepezilo podría ser un fármaco modificado de la enfermedad para las enfermedades neurodegenerativas; sin embargo, los efectos neuroprotectores del donepezilo son insuficientes para detener completamente el progreso de la enfermedad de Alzheimer.

La terapia combinada a veces es beneficiosa pero a veces es nociva. Por lo tanto es muy importante confirmar la seguridad y la eficacia de la combinación. La terapia combinada de los dos fármacos (3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona y donepezilo) en neuronas cultivadas potenció los efectos beneficiosos contra la neurodegeneración inducida por NMDA y kainato. No se observó neurodegeneración por la combinación de fármacos. Por lo tanto, la combinación de fármacos puede ser una opción favorable para el tratamiento de la neurodegeneración, que conduce a enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, y similares.

Se prepararon cultivos de células corticales a partir de ratas fetales de la cepa Wistar (edad gestacional de 17 - 19 días, Charles River Japón, Kanagawa, Japón). El córtex se diseccionó y se mantuvo en medio Neurobasal* ((medio Neurobasal (Gibco BRL) enfriado con hielo que contenía un suplemento de B27 al 2% ((Gibco BRL), L-glutamina 0,5 mM (Gibco BRL), líquido Antibiótico-Antimicótico al 2% (Gibco BRL), 2-mercaptoetanol 25 μ M)) y a continuación se incubó a 37°C durante 30 min en HBSS sin Ca^{2+}/Mg^{2+} que contenía tripsina al 0,25% (Gibco BRL) y 0,2 mg/ml de deoxirribonucleasa (ADNasa) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Los tejidos corticales se disociaron hasta células individuales por medio de trituración suave. La suspensión celular se mezcló con medio Neurobasal con suero de ternera fetal inactivado con calor al 10% (Gibco BRL). La suspensión celular se centrifugó a 3 10 x g durante 3 min y los sedimentos resultantes se volvieron a suspender en el medio descrito antes.

Las células se cultivaron en placa a una densidad celular inicial de $2,0 \times 10^5$ células/cm² en placas con pocillos revestidos con poli-L-lisina. Las células se cultivaron en una incubadora con CO₂ al 5% (v/v), a 37°C en medio Neurobasal que contenía suplemento de B27 al 2% durante 7 días.

Los cultivos se expusieron a NMDA 200 μ M (Sigma) o kainato 200 μ M en medio neurobasal que contenía suplemento de B27 al 2% (-AO) a lo largo de 24 h a 37°C. Las células se trataron con donepezilo y 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona a lo largo de 24 horas antes y durante la exposición de estos agonistas.

El flujo de LDH en el medio de cultivo se midió después del ataque con NMDA o kainato. La LDH restante en las células se midió después de lisar las células con tampón de fosfato 0,1 M (Na₂HPO₄ 0,1 M y KH₂PO₄ 0,1 M: pH 7,4) que contenía Triton X-100 al 0,5%. La liberación de LDH como un indicador de lesión neuronal se presentó como la pérdida de porcentaje de LDH en el medio de cultivo, con respecto a la actividad de LDH total por cultivo (eflujo de LDH/LDH total medido). El descenso de NADH se verificó espectrofotométricamente a 340 nm como una medida de la actividad de LDH.

En la toxicidad neuronal inducida por kainato, el donepezilo mostró un modesto efecto sobre la supervivencia neuronal. La Figura 4 muestra que la administración simultánea de donepezilo y 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona aumentó significativamente e inesperadamente la supervivencia neuronal en comparación con el donepezilo solo.

En el experimento con NMDA, 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona mostró efectos y alcanzó una meseta de 0,3 mM. Como se muestra en la Figura 5, la administración simultánea de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona y donepezilo aumentó inesperadamente y significativamente la supervivencia neuronal.

Ejemplo 4

Se prepararon cultivos de secciones de hipocampo organotípicas utilizando el método básico de Pringle et al, Brain Research, 755:36-46 (1997) modificado como sigue. Se decapitaron crías de rata Wistar (8-11 días de edad) y el hipocampo se diseccionó rápidamente en solución salina equilibrada de Gey enfriada con hielo con un suplemento de 4,5 mg/ml de glucosa. Se cortaron secciones transversales (400 μ m) con una cortadora de tejido McIlwain y se

volvieron a colocar en solución salina equilibrada de Gey enfriada con hielo. Las secciones se separaron y se colocaron en insertos de cultivo Millicell CM (4 por pocillo) y se mantuvieron a 37°C/CO₂ al 5% durante 14 días. El medio de mantenimiento consistió en suero óseo inactivado con calor al 25%, solución salina equilibrada de Hank al 25% (HBSS) y medio esencial mínimo al 50% con sales de Earle añadidas (MEM) con un suplemento de glutamina 1 mM y 4,5 mg/ml de glucosa. El medio se cambió cada 3 - 4 días.

Los cultivos se transfirieron a medio sin suero (SFM – MEM al 75%, HBSS al 25%) con un suplemento de glutamina 1 mM y 4,5 mg/ml de glucosa) que contenía 5 µg/ml del colorante de exclusión fluorescente yoduro de propidio (PI), y se dejó equilibrando durante 60 minutos antes de la formación de la imagen. La fluorescencia PI se detectó utilizando un microscopio invertido DMIL Leica equipado con un juego de filtros de rodamina. Cualquier cultivo en el que se detectó fluorescencia PI en esta fase se excluyó de su estudio adicional. Se añadieron 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona y/o donepezilo HCl al SFM y los cultivos se devolvieron a la incubadora durante 24 horas. Después de este tiempo, los cultivos se expusieron a un ataque neurotóxico (véase más abajo para los protocolos) en presencia de PI y 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona y/o donepezilo HCl antes de devolverlos al SFM que contenía 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona y/o donepezilo HCl. El deterioro neuronal se evaluó por medio de formación de imágenes mediante fluorescencia PI 24 horas después del comienzo del ataque neurotóxico. Los protocolos de neurotoxicidad se esbozan más abajo.

(1) AMPA: Los cultivos se transfirieron a SFM (+PI) de nueva aportación que contenía 30 J.1M S-AMPA durante 3 horas en condiciones de cultivo normales. Al final de este período, los cultivos se devolvieron a SFM de nueva aportación durante 21 horas antes de la determinación de la muerte neuronal por medio de la formación de imágenes con PI. Se utilizó GYKI52466 (30 µM) como control neuroprotector, positivo.

(2) Privación de Oxígeno-Glucosa (OGD): Se realizó una isquemia experimental por medio de la exposición de los cultivos a privación de oxígeno-glucosa (OGD) como se ha descrito previamente. Pringle et al, Brain Research, 755:36-46 (1997); Pringle et al, Stroke, 27:2124-2130 (1996); Morrison et al, Br. J. Pharmacol., 137:1255-1268 (2002). La OGD se indujo transfiriendo los cultivos a SFM (+PI) sin glucosa que se había saturado con N₂ al 95%/CO₂ al 5%. Las placas de cultivo (sin tapas) se sellaron a continuación en una cámara hermética en la que la atmósfera se saturó con N₂ al 95%/CO₂ al 5% haciendo pasar gas a través continuamente a 10 L/min durante diez minutos antes de sellarla y colocarla en la incubadora durante 50 min. (el tiempo total de OGD fue por lo tanto de 60 mins). Al final del período de OGD los cultivos se devolvieron a SFM normóxico que contenía PI y se volvió a colocar en la incubadora durante 23 horas.

(3) Hipoxia: La hipoxia se realizó exponiendo los cultivos a privación de oxígeno como se ha descrito previamente. Pringle et al, Brain Research, 755:36-46 (1997); Pringle et al, Stroke, 27:2124-2130 (1996). La hipoxia se indujo transfiriendo los cultivos a SFM (+PI) que había sido saturado con N₂ al 95%/CO₂ al 5%. Las placas de cultivo (sin tapas) se sellaron a continuación en una cámara hermética en la que la atmósfera se saturó con N₂ al 95%/CO₂ al 5% haciendo pasar gas a través continuamente a 10 L/min durante diez minutos antes de sellarla y colocarla en la incubadora durante 170 mins (el tiempo total de hipoxia fue por lo tanto de 180 mins). Al final del período de hipoxia, los cultivos se devolvieron a SFM normóxico (+PI) y se volvieron a colocar en la incubadora durante 21 horas. El captador de radicales libres MnTBAP (100 µM) se utilizó como control neuroprotector positivo.

(4) NMDA: Los cultivos se transfirieron a SFM (+PI) de nueva aportación que contenía NMDA 10 µM durante 3 horas en condiciones de cultivo normales. Al final de este período, los cultivos se devolvieron a SFM de nueva aportación durante 21 horas antes de la determinación de la muerte neuronal por medio de formación de imágenes con PI. Se utilizó MK801 (10 µM) como control neuroprotector, positivo.

(5) Toxicidad mediada por radicales libres (Duroquinona): La duroquinona produce neurotoxicidad mediada por superóxido produciendo una lesión neuronal selectiva en la región CA1. Wilde et al, J. Neurochem., 69(2):883-886 (1997). Los cultivos se transfirieron a SFM (+PI) de nueva aportación que contenía duroquinona 100 µM durante 3 horas en condiciones de cultivo normales. Al final de este período, los cultivos se devolvieron a SFM de nueva aportación durante 21 horas antes de la determinación de la muerte neuronal mediante formación de imágenes con PI. Se utilizó MnTBAP (100 µM) como control neuroprotector positivo.

El deterioro neuronal se evaluó utilizando soporte lógico ImageJ ejecutado en un PC. Las imágenes se capturaron utilizando una cámara CCD monocroma y se guardaron para el análisis Otlline. Las imágenes de transmisión de luz se capturaron antes de la adición de los fármacos, y las imágenes mediante fluorescencia PI se registraron al final del período de recuperación de 24 horas. El área de la región CA1 se determinó a partir de la imagen de transmisión. El área de fluorescencia PI en CA1 se midió utilizando la función umbral en ImageJ, y el deterioro neuronal se expresó como el porcentaje de CA1 donde se detectó fluorescencia PI por encima del fondo. Morrison et al, Br. J. Pharmacol., 137:1255-1268 (2002).

Se disolvieron MnTBAP y MK-801 en agua destilada a 10 mM. El NMDA se disolvió en agua destilada a 100 mM, y el AMPA se disolvió en agua destilada a 3 mM. GYKI52466 se disolvió en DMSO a 3 mM. Se prepararon soluciones de partida (1 mM) de donepezilo de nueva aportación cada día en agua destilada, y a continuación se diluyeron seriadamente en SFM. Se prepararon soluciones de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona (1 mM) de nueva aportación cada día en DMSO y se diluyeron adicionalmente en SFM.

Los materiales se obtuvieron de los siguientes proveedores: placas de cultivo de tejidos - Nunc (Fisher Scientific, Loughborough, UK); todos los demás plásticos de cultivo de tejidos se adquirieron de - Bibby Sterilin (Stone, UK); medios de cultivo - Invitrogen (Paisley, UK); PI - Molecular Probes (Leiden, Holland); S-AMPA, GYKI52466, NMDA, MK801 y MnTBAP - Tocris (Bristol, UK); 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, hidrocloreto de donepezilo (Eisai Co. Ltd).

El análisis de datos se realizó utilizando GraphPad Prism. Los datos se evaluaron inicialmente para determinar la normalidad después de lo cual se determinó la significación estadística utilizando un análisis de la varianza de una vía seguido de una prueba de Dunnett post-hoc. Todos los datos se expresan como la media \pm e.t.m. Los datos de partida y el análisis de los conjuntos de datos no se proporcionan junto a estos.

Se determinó la CE50 para 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona en toxicidad AMPA. No se observó fluorescencia PI en las secciones de cultivos mantenidas en SFM hasta durante 49 horas (controles simulados). En contraste, se observó una neurodegeneración significativa en la región CA1 de los cultivos expuestos a AMPA 30 μ M durante 3 horas (deterioro de $65,1 \pm 1,7\%$ en CA1, $n=104$, $p<0,001$ vs controles simulados). La neurodegeneración mediada por AMPA fue atenuada significativamente por el antagonista del receptor de AMPA no competitivo GYKI52466, que redujo la fluorescencia PI a un deterioro de $14,3 \pm 2,3\%$ ($n=60$, $p<0,001$ vs AMPA). La neurodegeneración inducida por AMPA se redujo de una manera dependiente de la concentración por medio de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona. A 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona 0,1 μ M, no se observó eficacia neuroprotectora (deterioro de $63,9 \pm 2,6\%$, $n=36$, $p=NS$ vs AMPA). Cuando la concentración de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona se incrementó a 0,3 μ M, se observó neuroprotección significativa, con una reducción del deterioro a $50,4 \pm 2,5\%$ ($n=60$, $p<0,01$ vs AMPA). A la concentración más alta de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona (3 μ M), la neuroprotección fue casi completa (deterioro de $0,1 \pm 0,1\%$, $n=36$, $p<0,001$ vs AMPA). Basándose en esta serie de experimentos, se determinó que la CE50 para 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona en este modelo de toxicidad por AMPA era 0,5 μ M.

Se determinó el efecto del donepezilo sobre la toxicidad mediada por AMPA. Inicialmente, una serie de cultivos (24 por grupo) se expuso a SFM o a donepezilo (0,1 a 10 μ M) durante 48 horas (las soluciones se cambiaron por las que contenían donepezilo de nueva aportación al cabo de 24 horas) para evaluar la toxicidad potencial del compuesto. No se observó fluorescencia PI en ningún cultivo en este experimento indicando que el compuesto era no tóxico en este paradigma (datos no mostrados).

Se realizó un conjunto de experimentos preliminares adicionales con el fin de determinar el efecto de incremento del tiempo de pre-incubación (4 a 48 horas) de donepezilo antes de la exposición de los cultivos a AMPA. Como antes, no se observó fluorescencia PI en los cultivos mantenidos en SFM a lo largo de la duración del experimento, pero se observó una toxicidad significativa en CA1 después de la exposición a AMPA (deterioro de $46,5 \pm 5,0\%$, $n=24$). Esta resultó atenuada significativamente por GYKI52466 30 μ M (deterioro de $21,7 \pm 2,7\%$, $n=24$, $p<0,001$ vs AMPA). No se observó efecto del donepezilo en los tiempos de pre-incubación más largos. PI $55,51 \pm 2,6\%$ de CA1 (24 horas de pre-incubación, $n=24$, $p=NS$), respectivamente. No obstante, cuando el tiempo de pre-incubación se rebajó a 4 horas, se observó un pequeño pero significativo incremento en la toxicidad mediada por AMPA, observándose fluorescencia PI en $57,4 \pm 2,3\%$ de CA1 ($n=24$, $p<0,05$ vs AMPA).

No se observó un efecto biológicamente significativo por la alteración del período de preincubación; por lo tanto, se eligió un período de preincubación convencional de 24 horas para el resto de los experimentos basándose en la evidencia publicada. Akasofu et al, Eur. J. Pharmacol., 472(1-2):57-63 (2003); Takada et al, Pharmacol. Exp. Ther., 306(2):772-777 (2003).

En una serie de experimentos adicionales, la exposición de cultivos a AMPA 30 μ M dio como resultado una fluorescencia PI que aparecía en $62,4 \pm 2,4\%$ de la región CA1 ($n=72$). Ésta resultó atenuada significativamente mediante 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona 0,5 μ M, reduciendo el área de fluorescencia PI a $33,6 \pm 4,0\%$ de CA1 ($n=24$, $p<0,001$ vs AMPA). No se observó efecto neuroprotector de donepezilo a ninguna de las concentraciones sometidas a ensayo (0,1 a 10 μ M). Como se ha observado previamente (Figuras 8 y 9), los autores de la presente invención observaron un aumento pequeño, pero no significativo de la toxicidad mediada por AMPA en presencia de las tres concentraciones de donepezilo (0,1 μ M: $69,5 \pm 2,4\%$ de CA1; 1 μ M: $70,7 \pm 2,4\%$ de CA1; 10 μ M: $70,9\% \pm 2,8\%$ de CA1; todos los grupos $n=36$, $p=NS$ vs AMPA). Si bien la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona 0,5 μ M fue significativamente neuroprotectora cuando estuvo presente sola, la eficacia de la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona se perdió cuando el compuesto se incubó simultáneamente con donepezilo. Esta pérdida de eficacia fue estadísticamente significativa a las tres concentraciones de donepezilo (donepezilo 0,1 μ M + 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona: $70,2 \pm 1,6\%$ de CA1; 1 μ M: $62,6 \pm 3,6\%$ de CA1; 10 μ M: $68,7\% \pm 2,4\%$ de CA1; todos los grupos $n=36$, $p<0,001$ vs AMPA).

Se indujo isquemia experimental por medio de la exposición de los cultivos a 60 minutos de privación de oxígeno-glucosa (OGD). Se llevaron a cabo un conjunto de experimentos iniciales para determinar la eficacia neuroprotectora de la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona frente a la neurotoxicidad inducida por OGD. La exposición de los cultivos a 60 minutos de OGD produjo una fluorescencia PI importante en la región CA1 (deterioro de $50,6 \pm 5,2\%$, $n=24$) y esto se evitó por medio del captador de radicales libres MnTBAP ($100 \mu\text{M}$) (deterioro de $0,1 \pm 0,0\%$, $n=24$, $p<0,001$ vs OGD). No se observó una neuroprotección significativa en cultivos tratados con el antagonista no competitivo del receptor de AMPA GYKI52466 ($30 \mu\text{M}$) ($36,9 \pm 3,6\%$, $n=24$, $p=NS$). Con el fin de evaluar la CE50 para 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, se generó una curva concentración-respuesta de seis puntos. Sorprendentemente, en cultivos tratados con la menor concentración de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona ($0,1 \mu\text{M}$), se observó un aumento significativo de la fluorescencia PI ($64,4 \pm 3,6\%$, $n=24$, $p<0,05$ vs OGD). No hubo un efecto significativo de la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona a ninguna otra concentración evaluada (hasta $3 \mu\text{M}$).

Puesto que no se pudo establecer una CE50 separada en este modelo, se realizaron experimentos similares utilizando 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona $0,5 \mu\text{M}$, la CE50 para el bloqueo de la toxicidad por AMPA.

En una segunda serie de experimentos, se investigaron los efectos de donepezilo sobre la neurotoxicidad inducida por OGD, y cómo ésta resultaba afectada por la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona. En cultivos expuestos a OGD sola, se produjo fluorescencia PI en $44,8 \pm 3,3\%$ de la región CA1 ($n=48$). Como antes, ésta resultó completamente atenuada por MnTBAP $100 \mu\text{M}$ (deterioro de $0,6 \pm 0,2\%$, $n=48$, $p<0,001$ vs OGD), pero no por 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona $0,5 \mu\text{M}$ (deterioro de $55,3 \pm 3,1\%$, $n=32$, $p=NS$). El pretratamiento con donepezilo ($0,1$ a $10 \mu\text{M}$) no tuvo ningún efecto sobre el deterioro neuronal ($0,1 \mu\text{M}$: deterioro de $49,4 \pm 2,7\%$; $1 \mu\text{M}$: deterioro $54,1 \pm 4,7\%$; $10 \mu\text{M}$: $45,3 \pm 3,3\%$; todos $n=48$, $p=NS$ vs OGD). En cultivos expuestos a OGD después de la aplicación simultánea de donepezilo $1 \mu\text{M}$ y 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona $0,5 \mu\text{M}$ hubo un aumento pequeño, pero significativo de la fluorescencia PI (deterioro $64,3 \pm 4,2\%$, $n=48$, $p<0,05$ vs OGD). No se observó ningún efecto a concentraciones de donepezilo más altas ($10 \mu\text{M}$) o más bajas ($0,1 \mu\text{M}$), sugiriendo que este efecto puede no ser biológicamente relevante.

Se determinó la lesión inducida por duroquinona. La lesión inducida por radicales libres se produjo por medio de la exposición de los cultivos a duroquinona $100 \mu\text{M}$ a lo largo de 3 horas seguido de un período de recuperación de 21 horas. Los cultivos que se expusieron a duroquinona $100 \mu\text{M}$ a lo largo de 3 horas desarrollaron neurodegeneración en la región CA1, dando como resultado una fluorescencia PI importante (deterioro de $51,0 \pm 3,4\%$, $n=72$). Como se esperaba, la lesión inducida por duroquinona fue abolida completamente por el captador de radicales libres MnTBAP ($100 \mu\text{M}$) (deterioro de $0,1 \pm 0,0\%$, $n=24$, $p<0,001$ vs duroquinona). La 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona ($0,5 \mu\text{M}$) no fue neuroprotectora en este modelo (deterioro de $69,1 \pm 4,0\%$, $n=24$, $p=NS$). El donepezilo no redujo el deterioro neuronal inducido por duroquinona ($0,1 \mu\text{M}$: deterioro de $56,4 \pm 4,4\%$; $1 \mu\text{M}$: deterioro de $53,2 \pm 4,9\%$; $10 \mu\text{M}$: deterioro de $56,6 \pm 4,4\%$, todos $n=36$, $p=NS$). De un modo similar, la incubación simultánea con 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona y donepezilo no afectó al deterioro neuronal.

Se investigó la neurotoxicidad inducida por NMDA. La exposición de cultivos a NMDA $10 \mu\text{M}$ a lo largo de 3 horas produjo neurodegeneración en la región CA1 según se determinó por medio de un incremento significativo de la fluorescencia PI (deterioro de $35,1 \pm 2,2\%$, $n=72$), y ésta resultó completamente atenuada por el antagonista del receptor no competitivo de NMDA MK-801 ($10 \mu\text{M}$) (deterioro de $0,0 \pm 0,0\%$, $n=36$, $p<0,001$ vs NMDA). En contraste, La toxicidad por NMDA no resultó afectada por la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona ($0,5 \mu\text{M}$) (deterioro de $29,1 \pm 2,9\%$, $n=36$, $p=NS$). El donepezilo fue significativamente neuroprotector a las tres concentraciones sometidas a ensayo de una manera dependiente de la concentración ($0,1 \mu\text{M}$: deterioro de $23,0 \pm 2,4\%$, $p<0,01$ vs NMDA; $1 \mu\text{M}$: deterioro de $25,2 \pm 2,3\%$, $p<0,05$ vs NMDA; $10 \mu\text{M}$: deterioro de $14,5 \pm 2,2\%$ $p<0,001$ vs NMDA; todos los grupos $n=36$). La eficacia neuroprotectora de bajas concentraciones de donepezilo fue atenuada por medio de la inclusión de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona $0,5 \mu\text{M}$ ($0,1 \mu\text{M}$ + 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona: deterioro de $27,9 \pm 2,6\%$; $1 \mu\text{M}$ + 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona: deterioro de $29,5 \pm 3,0\%$; ambos grupos $n=36$). El donepezilo $10 \mu\text{M}$ siguió siendo neuroprotector en presencia de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona (deterioro de $24,9 \pm 2,4\%$, $n=36$, $p<0,05$ vs NMDA).

Se examinó la neurodegeneración inducida por hipoxia. El deterioro neuronal mediado por hipoxia se produjo mediante la exposición de los cultivos a privación de oxígeno a lo largo de un período de 3 horas seguido de un período de recuperación de 21 horas. La hipoxia de 3 horas dio como resultado una lesión en CA1, como se define mediante la fluorescencia PI (deterioro de $45,1 \pm 3,5\%$, $n=96$). Esto fue evitado por el captador de radicales libres MnTBAP ($100 \mu\text{M}$) (deterioro $0,2 \pm 0,1\%$, $n=48$, $p<0,001$ vs hipoxia). El donepezilo ($0,1$ a $10 \mu\text{M}$) fue sumamente neuroprotector en este modelo produciendo una reducción significativa del deterioro neuronal a $0,1 \mu\text{M}$ (deterioro de $31,7 \pm 4,6\%$, $n=48$, $p<0,05$ vs hipoxia). La eficacia neuroprotectora aumentó cuando la concentración de donepezilo aumentó a $1 \mu\text{M}$ (deterioro de $14,9 \pm 3,2\%$, $n=48$, $p<0,001$ vs hipoxia). No se observó un aumento significativo de la

5 eficacia cuando la concentración de donepezilo se aumentó a 10 μM (deterioro de $12,9 \pm 2,9\%$, $n=48$, $p<0,001$ vs hipoxia). También se observó un efecto neuroprotector dependiente de la concentración de la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, observándose una eficacia significativa a 0,1 μM (deterioro de $24,8 \pm 6,3\%$, $n=24$, $p<0,001$ vs hipoxia). A la concentración más alta sometida a ensayo (3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona 5 μM), el compuesto fue casi tan eficaz como MnTBAP, reduciendo el deterioro a $3,9 \pm 1,8\%$ ($n=24$, $p<0,001$ vs hipoxia).

10 Se realizó un segundo grupo de experimentos para investigar si los efectos neuroprotectores del donepezilo y de la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona fueron sinérgicos o aditivos. Con el fin de someter a ensayo la hipótesis, se utilizaron las concentraciones eficaces más bajas (esto es, 0,1 μM) de cada uno de los dos compuestos). La hipoxia sola dio como resultado un deterioro de $36,4 \pm 3,9\%$ ($n=48$), y esto fue evitado por MnTBAP (100 μM) ($0,0 \pm 0,0\%$, $n=24$, $p<0,001$ vs hipoxia). Ni el donepezilo (0,1 μM : deterioro de $30,4 \pm 3,9\%$, $n=48$) ni la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona (0,1 μM : deterioro de $36,7 \pm 4,2\%$, $n=48$, $p=\text{NS}$) fueron neuroprotectores en esta serie de experimentos. De un modo similar, no se observó reducción de la fluorescencia PI en cultivos incubados con ambos compuestos juntos (deterioro de $33,8 \pm 4,1\%$, $n=48$, $p=\text{NS}$).

15 Es probable que 0,1 μM esté muy próxima a la concentración umbral de eficacia neuroprotectora para el donepezilo y la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona. Se repitió el experimento utilizando donepezilo 0,5 μM y 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona 0,5 μM . En este experimento, la exposición de los cultivos a hipoxia dio como resultado un deterioro de $36,9 \pm 4,4\%$ ($n=48$) y éste se bloqueó con MnTBAP 100 μM (deterioro de $0,8 \pm 0,4\%$, $n=24$, $p<0,001$ vs hipoxia). El donepezilo (0,5 μM) produjo un descenso significativo del deterioro neuronal (deterioro de $25,3 \pm 3,6\%$, $n=48$, $p<0,05$ vs hipoxia), un efecto de la misma índole que la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona (0,5 μM) (deterioro de $27,1 \pm 3,5\%$, $n=48$, $p<0,05$ vs hipoxia).
20 Se observó un nivel de neuroprotección similar cuando el donepezilo y la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona se utilizaron combinados (deterioro de $24,7 \pm 3,5\%$, $n=48$, $p<0,05$ vs hipoxia).
25

Cada una de las patentes, solicitudes de patente, y publicaciones citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en la presente memoria en su totalidad.

30 Resultará evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar diversas modificaciones en la invención sin apartarse del espíritu o el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto para su uso combinado con donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en el tratamiento de (i) la enfermedad de Alzheimer en un paciente o (ii) la demencia o uno o más deterioros cognitivos en un paciente; donde el compuesto es 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, una de sus sales farmacéuticamente aceptables, uno de sus hidratos o un hidrato de una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 10 2. Un compuesto para su uso combinado con 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, una de sus sales farmacéuticamente aceptables, uno de sus hidratos o un hidrato de una de sus sales farmacéuticamente aceptables en el tratamiento de (i) la enfermedad de Alzheimer en un paciente o (ii) la demencia o uno o más deterioros cognitivos en un paciente; donde el compuesto es donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 15 3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, donde el donepezilo o su sal farmacéuticamente aceptable, y la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, su sal farmacéuticamente aceptable, su hidrato o el hidrato de una de sus sales farmacéuticamente aceptables son (a) administrados separadamente al paciente o (b) administrados al paciente en forma de una composición farmacéutica.
- 20 4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la demencia está causada por la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, o la enfermedad de Huntington.
- 25 5. El uso de 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, una de sus sales farmacéuticamente aceptables, uno de sus hidratos o un hidrato de una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la fabricación de un medicamento para su uso combinado con donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en el tratamiento de (i) la enfermedad de Alzheimer en un paciente o (ii) la demencia o uno o más deterioros cognitivos en un paciente.
- 30 6. El uso de donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la fabricación de un medicamento para su uso combinado con 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, una de sus sales farmacéuticamente aceptables, uno de sus hidratos o un hidrato de una de sus sales farmacéuticamente aceptables en el tratamiento de (i) la enfermedad de Alzheimer en un paciente o (ii) la demencia o uno o más deterioros cognitivos en un paciente.
- 35 7. El uso de la reivindicación 5 o 6, donde el donepezilo o su sal farmacéuticamente aceptable, y la 3-(2-cianofenil)-5-(2-piridil)-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-ona, su sal farmacéuticamente aceptable, su hidrato o el hidrato de una de sus sales farmacéuticamente aceptables son (a) para su administración separadamente al paciente o (b) para su administración al paciente en forma de una composición farmacéutica.
- 40 8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la demencia está causada por la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, o la enfermedad de Huntington.

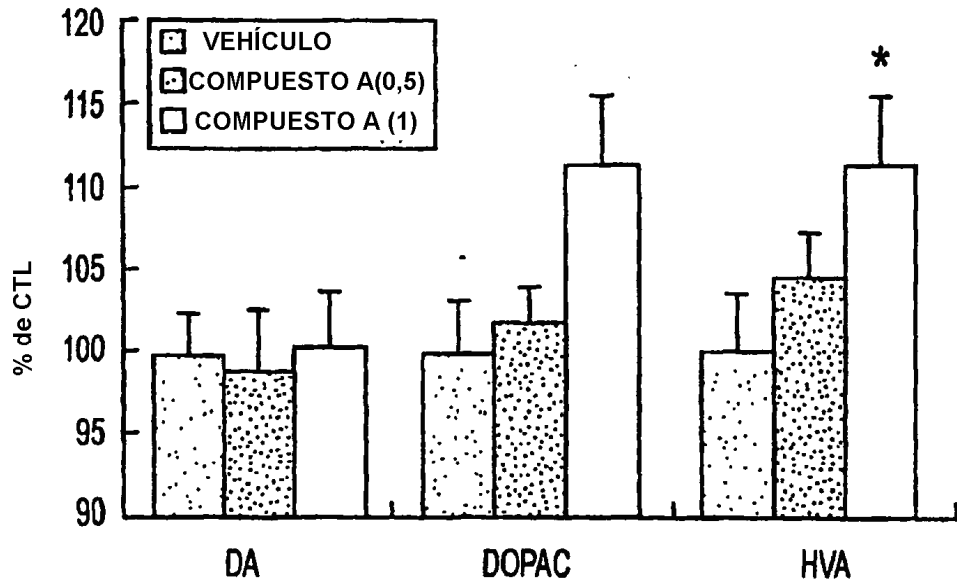


FIG. 1

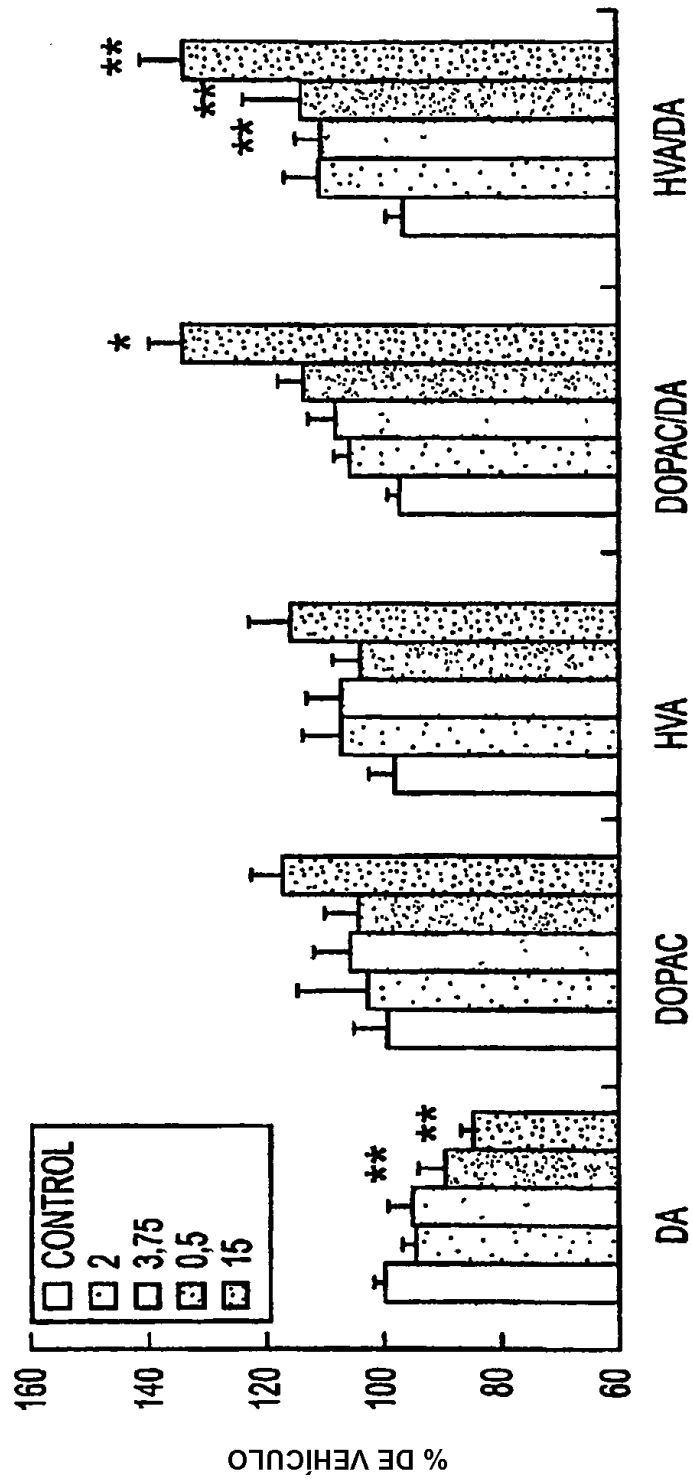


FIG. 2

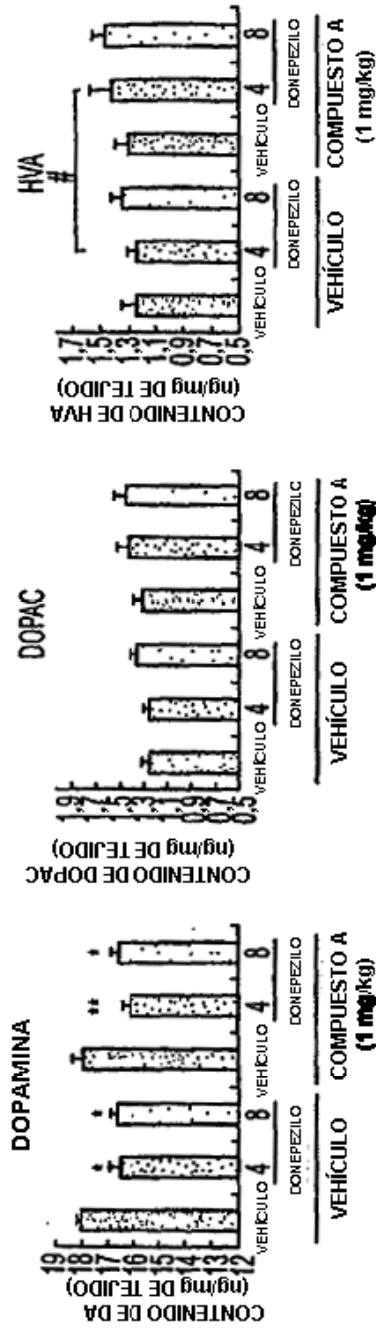


FIG. 3A

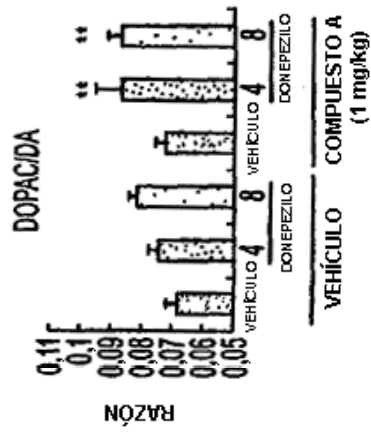


FIG. 3D

FIG. 3B

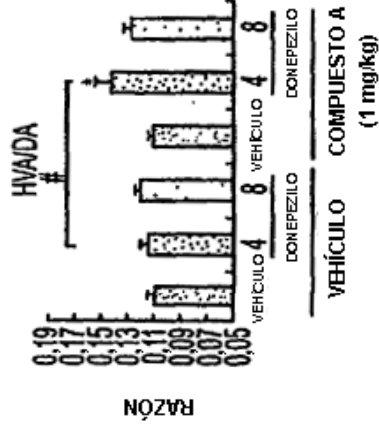


FIG. 3E

FIG. 3C

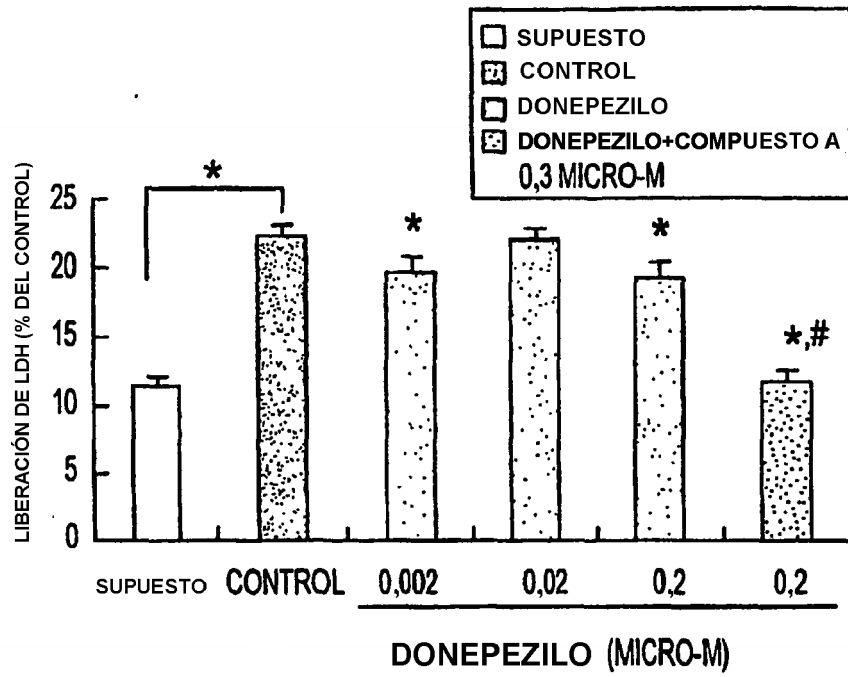


FIG. 4

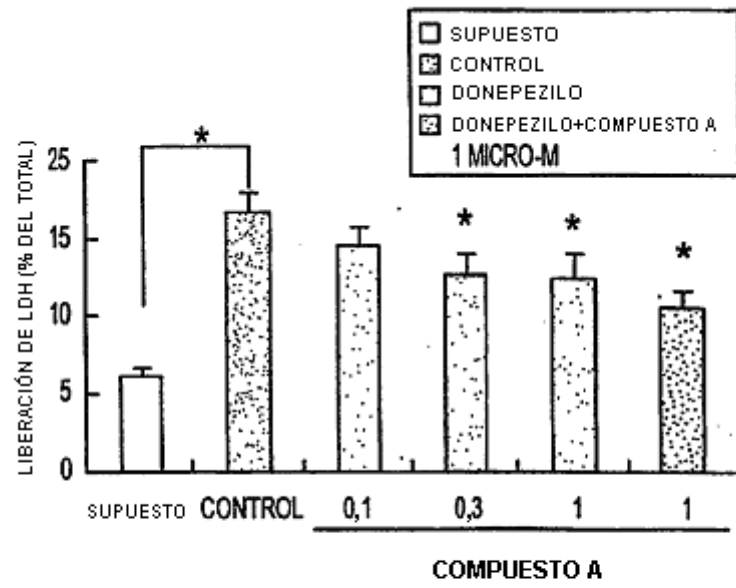


FIG. 5