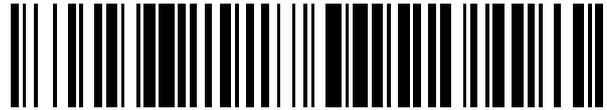


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 930**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2009 E 09738186 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 2282779**

54 Título: **Nuevos enfoques terapéuticos para tratar la enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados mediante la modulación de la respuesta de estrés celular**

30 Prioridad:

29.04.2008 US 48585 P

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

03.07.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**COHEN, DANIEL;
CHUMAKOV, ILYA;
NABIROCHKIN, SERGUEI y
GUERASSIMENKO, OXANA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 410 930 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

Nuevos enfoques terapéuticos para tratar la enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados mediante la modulación de la respuesta de estrés celular

5 La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA) y trastornos relacionados.

10 La EA es el prototipo de demencia cortical que se caracteriza por un déficit de memoria junto con disfasia (trastorno del lenguaje en el que existe un deterioro del habla y de la comprensión del habla), dispraxia (incapacidad para coordinar y realizar ciertos movimientos y gestos intencionados en ausencia de alteraciones motoras o sensoriales) y agnosia (capacidad para reconocer objetos, personas, sonidos, formas u olores) atribuible a la afectación de áreas de asociación corticales. También pueden estar implicados síntomas especiales, tales como paraparesia espástica (debilidad que afecta a las extremidades inferiores) (1-4).

15 La incidencia de la enfermedad de Alzheimer aumenta espectacularmente con la edad. La EA es, en la actualidad, la causa más habitual de demencia. Clínicamente se caracteriza por una disminución global de la función cognitiva que progresa lentamente y deja a los pacientes terminales confinados a la cama, incontinentes y dependientes de custodia. La muerte se produce, de media, 9 años después del diagnóstico (5).

20 La tasa de incidencia de la EA aumenta espectacularmente con la edad. Las proyecciones sobre la población de las Naciones Unidas estiman que el número de personas mayores de 80 años se acercará a los 370 millones en el año 2050. Actualmente, se ha estimado que el 50 % de las personas mayores de 85 años están afectadas por EA. Por tanto, más de 100 millones de personas de todo el mundo sufrirán demencia en 50 años. El gran número de personas que requiere atención constante y otros servicios afectará gravemente a los recursos médicos, monetarios y humanos (6).

25 La alteración de la memoria es el primer signo característico de la enfermedad e implica a la memoria episódica (memoria relacionada con los acontecimientos cotidianos). La memoria semántica (memoria relacionada con los significados verbales y visuales) se ve afectada en etapas posteriores de la enfermedad. Por el contrario, la memoria operativa (memoria a corto plazo que afecta a las estructuras y procesos usados para el almacenamiento temporal y la manipulación de la información) y la memoria procedimental (memoria inconsciente que es la memoria a largo plazo de las capacidades y los procedimientos) se conservan hasta tarde. A medida que la enfermedad progresa aparecen síntomas adicionales como la alteración del lenguaje, deficiencias visuales, tanto perceptuales como espaciales, agnosias y apraxias.

30 El cuadro clásico de la enfermedad de Alzheimer es suficientemente característico para permitir su identificación en aproximadamente el 80 % de los casos (7). Sin embargo, la heterogeneidad clínica que presenta no sólo es importante para su diagnóstico y tratamiento sino que además implica tratamientos farmacológicos específicos para formas funcionalmente diferentes. (8).

35 Las características patológicas de la EA incluyen las placas de amiloide que contienen beta amiloide (Abeta), los ovillos neurofibrilares (ONF) que contienen Tau, y la pérdida y disfunción neuronal y sináptica (9-11). Durante la última década se han propuesto dos hipótesis principales sobre la causa de la EA: La "hipótesis de la cascada de amiloide", que afirma que el proceso neurodegenerativo es una serie de acontecimientos desencadenados por el procesamiento anómalo de la proteína precursora del amiloide (APP) (12) y la "hipótesis de la degeneración del citoesqueleto neuronal" (13), que propone que los eventos desencadenantes son los cambios en el citoesqueleto. La teoría más aceptada que explica la progresión de la EA sigue siendo la hipótesis de la cascada de amiloide (14-16) y los investigadores de la EA se han centrado principalmente en la determinación del mecanismo subyacente a la toxicidad asociada con las proteínas Abeta. Por el contrario, la proteína Tau ha recibido mucha menos atención de la industria farmacéutica que la proteína amiloide, por motivos tanto fundamentales como prácticos. Además, los cambios de densidad sináptica son el daño patológico que mejor se correlaciona con la alteración cognitiva si se compara con los otros dos. Los estudios han revelado que la patología amiloide parece progresar de un modo específico con los neurotransmisores, de modo que los terminales colinérgicos parecen más vulnerables, seguidos por los terminales glutamatérgicos y, por último, los terminales GABAérgicos (11).

Sumario de la invención

50 El propósito de la presente invención es proporcionar nuevos enfoques terapéuticos para tratar la EA y trastornos relacionados.

Los inventores han identificado una ruta molecular que está implicada en la génesis de la EA y ofrece nuevas dianas para el desarrollo de nuevos tratamientos para atenuar la EA y los trastornos relacionados, particularmente

para el desarrollo de terapias de combinación usando moléculas nuevas o existentes previamente usadas en otras indicaciones. Más particularmente, los inventores han identificado varios fármacos que, solos o en combinación(ciones), pueden afectar de forma eficaz a dicha ruta y representan una terapia nueva y eficaz para el tratamiento de la EA y trastornos relacionados.

- 5 Por tanto, la invención proporciona nuevas composiciones y procedimientos para tratar la EA y los trastornos relacionados. El objeto de esta invención se refiere a una composición como se define en las reivindicaciones.

Más particularmente, la invención se refiere a composiciones adecuadas para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado en un enfermo que lo necesita, donde dichas composiciones comprenden un fármaco que inhibe la respuesta de estrés celular, el sulfisoxazol.

- 10 Esta invención también describe composiciones adecuadas para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado en un enfermo que lo necesita, donde dichas composiciones comprenden una combinación de al menos dos fármacos que inhiben la respuesta de estrés celular para administración combinada, por separado o secuencial.

- 15 Esta invención también describe el fármaco o los fármacos que inhiben la respuesta de estrés celular y que se unen a, o modulan la actividad de, una proteína codificada por un gen seleccionado de ACCN1, ADRA1A, ADRB2, AFADINA, AKT, ALDH2, ALOX12, AMPK, APBA1, APBA2BP, APG1, APG12, APOER2, ATG5, ATG7, ATM, ATP1A1, ATP2A3, ATP2B1, ATP6V1C1, ATR, BACE1, BAD, BAX, BCAR1, BCL2, BECLIN1, canales de BK (KCNMA1, KCNMB1), BRCA1, CACNA1C, CALCINEURINA, CD36, CD44, CDH1, CDH2, CDK5, CDKN1A, CHK1, CHRM1, CHRM2, CHRM3, CHRM4, CHRM5, CK1, CTNNA2, CTNNB1, CULLIN1, CICLINA, DCC, DGKB, DGKH, 20 DNAJB9, DOCK3, DRD2, EDNRA, ELAVL2, ERK1, ERK2, EZRINA, FAS, FKBP12, FKBP12.6, FOXO3A, FZ2, GADD45, GNPTAB, GPC5, GRK2, GRK5, GRP170, GRIN2B, GRIN3A, GSK3B, HAS1, HAS2, HAS3, HIPK2, HSPAS, HSP90B1, HSPA5, HTR1A, IDE, IMPDH1, IMPDH2, INS, INSR, IRF1, ITB1, ITGA1, ITGB1, ITPR1, JNK1, LAMA1, MAD1L1, MAO, MCC1, MDM1, MME, MOESIN, MTOR, NADPH OXIDASA, NEDD9, NETRIN1, NFKB1, NHERF, NOS1, NOS2A, NOS3, PAELR, PAK1, PARK2, PCAF, PDE11A, PDE3A, PDE4D, PDE5, PDE6D, PI3K, 25 PIK3C3, PKCA, PLCB1, PLD2, PLN, PML, POP2, PRDX5, PRDX6, PRKG1, PTPRG, PTPRM, PVRL1, RAC1, RACK1, RADIXINA, RHOA, ROR2, RTN1, RYR3, SAPK3, SCN1A, SCN1B, SCNN1D, SCNN1G, SH3BP5, SIL1, SLC8A1, SLC8A2, SLC8A3, SLN, SNCA, SNCAIP, SORBS2, SORCS2, SRC, SYN1, THBS2, TP53, TP63, TRPC3, TRPC4, TRPC5, UNC5C, VPS15, WNT1A, WNT5A, WWOX, XANTINA OXIDASA, y YES1.

- 30 La invención también describe ejemplos de dichos fármacos, que incluyen, sin limitaciones, compuestos seleccionados de acamprosato, albuterol, alendronato, amlodipino, arabitól, cilostazol, dasatinib, fosfenitoína, leflunomida, manitol, metaraminol, metimazol, milrinona, nitroprusida, omeprazol, fenformina, fenilbutirato sódico, prilocaína, rapamicina, rifabutina, sulfisoxazol, tadalafilo, terbinafina, tioguanina, trehalosa, vidarabina y zonisamida, o una combinación de los mismos.

- 35 La invención también describe composiciones que comprenden además al menos un fármaco que modula angiogénesis para el uso combinado, por separado o secuencial.

La presente invención también describe composiciones que comprenden además al menos un fármaco que modula la función sináptica para el uso combinado, por separado o secuencial.

Normalmente, las composiciones de la presente invención comprenden además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 40 La presente invención también describe en un procedimiento de producir un fármaco para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, en donde el procedimiento comprende una etapa de someter a ensayo un fármaco candidato para determinar la actividad sobre la respuesta de estrés celular y seleccionar los fármacos candidatos que inhiben la respuesta de estrés celular.

- 45 La invención también describe un procedimiento para producir una composición para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, en donde el procedimiento comprende preparar una combinación de un fármaco que inhibe la respuesta de estrés celular y un fármaco que modula la angiogénesis o la función sináptica, y formular dicha combinación de fármacos para la administración simultánea, por separado o secuencial a un enfermo que lo necesita.

- 50 La invención se refiere además a un procedimiento de tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, en donde el procedimiento comprende administrar de forma simultánea, por separado o secuencialmente a un enfermo que lo necesita un fármaco o una combinación de fármacos que inhiben la

respuesta de estrés celular.

La invención describe además un procedimiento de tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, en donde el procedimiento comprende administrar de forma simultánea, por separado o secuencialmente a un enfermo que lo necesita un fármaco que inhibe la respuesta de estrés celular y un fármaco que modula la angiogénesis y/o un fármaco que modula la función sináptica.

La invención describe el uso de un fármaco que inhibe la respuesta de estrés celular para la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado.

La invención además describe el uso de una combinación de al menos dos fármacos que inhiben la respuesta de estrés celular para la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, en donde dichos al menos dos fármacos se administran juntos, por separado o secuencialmente.

Tal como se trata en la presente solicitud, las terapias anteriores y las terapias de combinación proporcionan nuevos y eficaces enfoques para tratar la EA en sujetos humanos.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Efecto de los fármacos seleccionados sobre la viabilidad de PC12 diferenciadas por NGF tras intoxicación con beta amiloide. $\diamond\diamond\diamond\diamond$: $p < 0,00001$; significativamente diferente del vehículo. **: $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$; significativamente diferente de $A\beta_{25-35}$. Prueba bilateral t de Student. Una $A\beta_{25-35}$ 10 μM produce una intoxicación significativa, por encima del 25 %, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo (Fig 1-A y B, en rojo). Esta intoxicación se previene con eficacia. Esta intoxicación se previene significativamente con prilocaína (Fig 1A) o amlodipino (Fig 1B).

Figura 2: Efecto de determinados fármacos sobre la liberación de LDH en cultivo de neuronas corticales primarias de rata intoxicadas con beta-amiloide. $\diamond\diamond\diamond\diamond$: $p < 0,000001$; significativamente diferente del vehículo, *. $P < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ **** $p < 0,00001$; significativamente diferente de $A\beta_{25-35}$. Prueba bilateral t de Student. La $A\beta_{25-35}$ 20 μM produce una intoxicación significativa, por encima del 25 %, en comparación con las neuronas tratadas con vehículo (Fig. 2A y B, en rojo). Esta intoxicación se previene con eficacia con BDNF a 10 ng/ml, que se considera un control positivo para neuroprotección. Esta intoxicación también se previene significativamente con los fármacos zonisamida (Fig. 2A) o sulfisoxazol (Fig 2B) o leflunomida (Fig, 2C) .

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos enfoques terapéuticos para tratar la EA o trastornos relacionados. La invención da a conocer nuevos usos de fármacos o combinaciones de fármacos que permiten una corrección eficaz de dichas enfermedades y que pueden usarse para el tratamiento de pacientes.

El término "trastorno relacionado con la AE" designa enfermedad de Alzheimer (EA), demencia senil de tipo EA (DSTE), enfermedad de Parkinson, demencia de cuerpos de Lewis, demencia vascular, alteración cognitiva leve (Mel), alteración de la memoria asociada con la edad (AMAE) y problemas asociados con el envejecimiento, parkinsonismo postencefalitis, ALS y síndrome de Down.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "tratamiento" de un trastorno incluye la terapia, la prevención, la profilaxis, el retraso o la reducción de los síntomas provocados por el trastorno. El término tratamiento incluye, en particular, el control de la progresión de la enfermedad y de los síntomas asociados.

El término "inhibe", en referencia a la respuesta de estrés celular ("REC"), incluye cualquier reducción en la REC en comparación con la actividad existente en el enfermo. Dicha reducción puede incluir una disminución parcial, por ejemplo de 5-20 %, que es suficiente para mejorar el estado del paciente, así como reducciones más sustanciales, por ejemplo de 20-50 % o más de inhibición completa, por ejemplo por encima del 50 %. La inhibición se puede evaluar o verificar usando pruebas biológicas conocidas, tales como las descritas en la sección experimental.

Asimismo, con la designación de compuestos específicos dentro del contexto de la presente invención se pretende incluir no sólo las moléculas específicamente citadas, sino también cualquier sal, hidrato, éster, éter, isómeros, racemato, conjugados o profármacos de los mismos.

El término "combinación" designa un tratamiento en el que al menos dos o más fármacos se administran de manera conjunta a un enfermo para producir un efecto biológico. En una terapia combinada de acuerdo con la presente invención, los al menos dos fármacos pueden administrarse juntos o por separado, al mismo tiempo o secuencialmente. Asimismo, los al menos dos fármacos pueden administrarse a través de diferentes rutas y protocolos. Como resultado, aunque pueden formularse juntos, los fármacos de una combinación también se

pueden formular por separado.

Tal como se ha tratado en párrafos anteriores, la invención se refiere a composiciones para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado en un enfermo que lo necesita, usando un fármaco o una combinación de fármacos que inhibe la respuesta de estrés celular.

5 Mediante una integración exhaustiva de los datos experimentales que cubren los resultados de estudios de biología celular, experimentos de perfiles de expresión y estudios de asociación genética, que describen diferentes aspectos de la enfermedad de Alzheimer y vínculos existentes en la señalización celular y las rutas funcionales, los inventores han descubierto que la respuesta de estrés celular representa un mecanismo importante que está alterado en los sujetos con EA. Los genes localizados en dicha red funcional e implicados en la enfermedad de
10 Alzheimer se seleccionaron mediante los criterios siguientes:

- 1) interacción directa con los genes causantes responsables de casos familiares de la enfermedad de Alzheimer (APP, ApoE, presenilinas, proteína tau),
- 2) copartícipes funcionales de los genes seleccionados mediante el criterio (1),
- 3) copartícipes funcionales más cercanos de los genes seleccionados mediante el criterio (2),

15 A través de este procedimiento, los inventores pudieron establecer que la red responsable de la respuesta al estrés celular es una red funcional fundamental afectada en la enfermedad de Alzheimer.

Los inventores han establecido más específicamente que la respuesta de estrés celular es un rasgo fundamental funcionalmente relevante de la enfermedad de Alzheimer. Tal como se trata más adelante, los inventores han identificado tres familias de proteínas den la red de respuesta de estrés celular, que son funcionalmente relevantes
20 para la génesis y el control de la enfermedad de Alzheimer y representan dianas valiosas para las terapias (de combinación). Estos grupos de proteínas son, más específicamente, proteínas participantes en la homeostasis del calcio, en el plegamiento de las proteínas y en la ejecución de la apoptosis.

En una forma de realización concreta, la presente invención se refiere más específicamente a composiciones y procedimientos que usan un fármaco o una combinación de fármacos que modulan la actividad de una proteína
25 implicada en la homeostasis del calcio.

El calcio, uno de los mensajeros intracelulares más importantes, media en una serie de procesos celulares en células neuronales y endoteliales, incluidas la plasticidad sináptica, la angiogénesis y la apoptosis. Las mutaciones, los plegamientos anormales o la hiperfosforilación de la presenilina, las proteínas AP y tau afectan a la homeostasis del calcio. De forma recíproca, la alteración de la señalización del calcio intracelular exacerba las lesiones
30 características de la enfermedad de Alzheimer que conducen a una acumulación acelerada de agregaciones amiloides e hiperfosforilación de la proteína tau, lo que indica la existencia de una retroalimentación reguladora entre la homeostasis del calcio y la patología celular específica de la EA.

Los niveles intracelulares de calcio están regulados con precisión mediante la acción colaboradora de una serie de canales permeables al calcio, bombas de calcio e intercambiadores de calcio en la membrana plasmática y el
35 retículo endoplasmático. Por ejemplo, el calcio se almacena dinámicamente en el retículo endoplasmático (RE), que puede acumular niveles de Ca^{2+} muy elevados debido a la actividad de las bombas SERCA de Ca^{2+} , alcanzando concentraciones milimolares (17). La liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático está controlada por dos tipos de canales de liberación de Ca^{2+} , los receptores de rianodina (RYR) y los receptores de IP3 (ITPR). Pueden estar directamente activados por múltiples mensajeros de señalización, incluida la fluctuación citoplásmica local de
40 las concentraciones Ca^{2+} o IP3 y están funcionalmente modulados por varias proteínas reguladoras como PKA, PRKG1, mTOR, calcineurina, FKBP, fosfolambano etc. (18). Las bombas SERCA pueden estar reguladas por concentraciones de Ca^{2+} dentro del RE, en el que la reducción del contenido de calcio en el RE aumenta la actividad de SERCA. A nivel de membrana plasmática, la homeostasis del calcio está regulada principalmente por canales de calcio activados en función de las reservas y dependientes de voltaje, que son responsables de la
45 entrada de Ca^{2+} , por bombas ATPasa de salida de calcio, por intercambiadores de Na^{+}/Ca^{2+} y por canales de Na^{+} dependientes de voltaje.

Los inventores han identificado una red de genes implicados en la ruta de la homeostasis del calcio, cuya función podría modificarse por las proteínas mutantes de presenilina o por el β -amiloide tóxico. Entre ellos, son de particular interés los receptores IP3R (ITPR1) y RYR3, ATP2A3 (SERCA3 Ca^{2+} ATPasa) que regula la homeostasis del
50 calcio a nivel del RE, la ATPasa ATP2B1 de membrana plasmática, que produce la salida de iones calcio de las células eucarióticas en contra de gradiente de concentración y los canales de Na^{+} dependientes de voltaje. Se ha demostrado que APP, A β 42 y PS1 mutada son capaces de modular la actividad de los receptores de rianodina y las

bombas SERCA. A β 42 y la variante FAD de PS1 aumentan la expresión de RYR3 y su actividad (19-21), lo que conduce a una mayor vulnerabilidad neuronal a las agresiones excitotóxicas de glutamato (22). Además, la inhibición de la recaptación de calcio a través de la bomba SERCA se correlaciona con una disminución de la liberación de Abeta, mientras que la estimulación de la actividad de SERCA potencia la producción de Abeta (23).
 5 Adicionalmente, a nivel de la membrana plasmática, presenilina y BACE-1 están implicadas en el procesamiento de subunidades β de los canales de sodio dependientes de voltaje, que modulan y podrían, en condiciones patológicas, invertir la actividad de los intercambiadores de Na⁺/Ca²⁺ y provocar una excesiva acumulación de calcio intracelular (24).

La presente invención también describe composiciones y procedimientos que usan un fármaco o una combinación de fármacos que modulan la actividad de una proteína implicada en el plegamiento o la agregación de proteínas.

La agregación de proteínas es un fenómeno citopatológico crucial en la EA. Dos características fundamentales de la enfermedad de Alzheimer consisten en el desarrollo de ovillos neurofibrilares (ONF), compuestos por proteína tau hiperfosforilada agregada, y en el depósito de placas de amiloide, compuestas por fragmentos de A β de la proteína APP. No obstante, otra proteína propensa a la agregación, la α -sinucleína, reconocida como una característica bastante específica de la enfermedad de Parkinson, puede detectarse en placas de amiloide en la mayoría de los casos de formas esporádicas y familiares de la enfermedad de Alzheimer (25-26).

Los inventores han identificado varios genes implicados en la modulación del plegamiento, la modificación postraduccional y el procesamiento de cada constituyente principal de las agregaciones proteicas asociadas con la enfermedad de Alzheimer. Este hallazgo subraya la importancia del efecto patológico combinado de las proteínas tau, Abeta y sinucleína plegadas de forma errónea para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, los inventores han identificado la enzima de degradación de la insulina IDE, que también está implicada en la proteólisis de las proteínas Abeta, (27) y APBA1 y APBA2BP que interactúan con la APP y regulan su estabilidad y funciones (28-29). Asimismo, el análisis de datos reveló que la α -sinucleína (SNCA), su copartícipe de interacción sinfilina (SNCAIP) y PARK2, una ubiquitin-protrina ligasa implicada en el aclaramiento de SNCA y la protección de las neuronas contra la toxicidad por la α -sinucleína, son factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (30).

El desequilibrio en la actividad de las quinasas, tales como las GSK3 β , CDK5 y MARK (31-32) y las fosfatasa que regulan el nivel de fosforilación de la proteína tau podrían contribuir e intensificar la agregación de tau. Dado que la presenilina también está regulada funcionalmente por la fosforilación dependiente de GSK-3 β , la GSK-3 β podría desempeñar un papel particularmente importante en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer. Esta conclusión se ve reforzada por el hallazgo de los inventores de que algunos módulos de señalización que regulan la actividad GSK-3 β quinasa o su interacción directa con la proteína tau, WWOX (33), receptor de hialuronano CD44, los receptores Wnt Fz2/ROR2 y el complejo receptor de la insulina/PTPRG (34), podrían asociarse con la génesis de la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención también describe composiciones y procedimientos que usan un fármaco o combinación de fármacos que inhibe la apoptosis.

La apoptosis, reconocida como un mecanismo celular fundamental responsable de la pérdida de células en la enfermedad de Alzheimer, puede ser desencadenada con eficacia por agresiones celulares que normalmente se asocian con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, alteración de la homeostasis del calcio e incremento de la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) estimuladas por agregados tóxicos del péptido β -amiloide (Abeta).

Como se identifica en el análisis de los inventores, la apoptosis en el caso de la enfermedad de Alzheimer, muy probablemente, se ejecuta a través de rutas canónicas dependientes de p53. La p53 es una proteína de unión a ADN y funciona como factor de transcripción que controla la expresión de los genes diana que inhiben el crecimiento y la invasión de células tumorales. Por tanto, la p53 se reconoce como una proteína de supresión tumoral y desempeña un papel esencial en la regulación de la progresión del ciclo celular, específicamente en la transición de G0 a G1 y en el punto de control de daño en el ADN en la transición G2/M, y en la inducción de la apoptosis. Esto último parece estar mediado por la estimulación de la expresión de proteínas pro-apoptóticas, tales como Bax, o por la represión de la expresión de proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2.

La proteína p53 se puede regular a través de modificaciones postraduccionales y mediante interacciones con factores reguladores positivos y negativos. Los inventores han identificado varias proteínas reguladoras, WWOX, MDMI, HIPK2 y PML, que confirman la propuesta sobre el papel fundamental de la proteína p53 en la ejecución de la muerte celular en la enfermedad de Alzheimer. Una oxidoreductasa (WOXW) que contiene un dominio WW que interactúa con p53 es un mediador esencial de la citotoxicidad por TNF α y media en la apoptosis sinérgicamente con la p53 (35). La serina/treonina proteína quinasa-2 nuclear que interactúa con homeodominio (HIPK2) fosforila

la p53 en la Ser 46 y coopera con la p53 en la activación de las rutas de transcripción y apoptóticas dependientes de p53 (36). Por último, la proteína PML antagoniza el efecto de la proteína MDM2, que estimula la degradación de p53 por el proteasoma y activa la p53 mediante reclutamiento en complejos multiproteicos denominados cuerpos nucleares de PML (37).

- 5 Entre los sistemas receptores que podrían estar directa y específicamente implicados en la inducción de la apoptosis en el contexto de la enfermedad de Alzheimer, los receptores de netrina UNC5C (Unc-5 Homólogo C) y DCC (suprimido en el carcinoma colorrectal), que afectan a las guías axónicas y la angiogénesis, representan intereses concretos. Estos receptores son supresores tumorales condicionales putativos designados, ya que se comportan como receptores dependientes de netrina que inducen apoptosis en ausencia de su ligando (38). La
 10 unión de netrina-1 a estos receptores inhibe la apoptosis dependiente de p53 supresora de tumor y la p53 está directamente implicada en la regulación transcripcional de la netrina-1 y sus receptores (39). Además, el receptor de DCC es procesado por la presenilina para generar el dominio del receptor intracelular que posee actividad transcripcional (40). Por tanto, los análisis de datos de los inventores han sugerido que la apoptosis mediada por receptores de netrina y dependiente de p53 podría ser una de las rutas proapoptóticas específicas implicadas en la
 15 pérdida celular patológica en el contexto de la enfermedad de Alzheimer, además de programas pro-apoptóticos bastante inespecíficos estimulados por la alteración de la homeostasis de calcio y excesiva producción de ROS.

La presente invención también describe composiciones y procedimientos que usan una combinación de fármacos que inhibe la actividad de al menos dos proteínas distintas implicadas en la homeostasis del calcio, en el plegamiento de proteínas, y en la ejecución de la apoptosis.

- 20 En la presente invención, los inventores proponen nuevas composiciones que se pueden usar para inhibir la respuesta de estrés celular inducida en la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos.

Así, la invención también describe composiciones y procedimientos que usan uno o más fármacos que inhiben la respuesta de estrés celular través de la unión a, o modulación de la actividad de una proteína codificada por un gen seleccionado de ACCN1, ADRA1A, ADRB2, AFADIN, AKT, ALDH2, ALOX12, AMPK, APBA1, APBA2BP, APG1,
 25 APG12, APOER2, ATG5, ATG7, ATM, ATP1A1, ATP2A3, ATP2B1, ATP6V1C1, ATR, BACE1, BAD, BAX, BCAR1, BCL2, BECLIN1, canales de BK (KCNMA1, KCNMB1), BRCA1, CACNA1C, CALCINEURIN, CD36, CD44, CDH1, CDH2, CDK5, CDKN1A, CHK1, CHRM1, CHRM2, CHRM3, CHRM4, CHRM5, CK1, CTNNA2, CTNNB1, CULLINI, CICLINA, DCC, DGKB, DGKH, DNAJB9, DOCK3, DRD2, EDNRA, ELAVL2, ERK1, ERK2, EZRIN, FAS, FKBP12, FKBP12.6, FOXO3A, FZ2, GADD45, GNPTAB, GPC5, GRK2, GRK5, GRP170, GRIN2B, GRIN3A, GSK3B, HAS1,
 30 HAS2, HAS3, HIPK2, HSPAS, HSP90B1, HSPA5, HTR1A, IDE, IMPDH1, IMPDH2, INS, INSR, IRF1, ITB1, ITGA1, ITGB1, ITPR1, JNK1, LAMA1, MAD1L1, MAO, MCC1, MDM1, MME, MOESIN, MTOR, NADPH OXIDASE, NEDD9, NETRIN1, NFKB1, NHERF, NOS1, NOS2A, NOS3, PAELR, PAK1, PARK2, PCAF, PDE11A, PDE3A, PDE4D, PDE5, PDE6D, PI3K, PIK3C3, PKCA, PLCB1, PLD2, PLN, PML, POP2, PRDX5, PRDX6, PRKG1, PTPRG, PTPRM, PVRL1, RAC1, RACK1, RADIXIN, RHOA, ROR2, RTNI, RYR3, SAPK3, SCN1A, SCN1B, SCNN1D, SCNN1G,
 35 SH3BP5, SILI, SLC8A1, SLC8A2, SLC8A3, SLN, SNCA, SNCAIP, SORBS2, SORCS2, SRC, SYN1, THBS2, TP53, TP63, TRPC3, TRPC4, TRPC5, UNC5C, VPS15, WNT1A, WNT5A, WWOX, XANTINA OXIDASA, y YESI.

Las secuencias de todos los genes y proteínas indicados anteriormente están disponibles en genotecas y se pueden aislar mediante técnicas conocidas en la técnica. Además, la actividad de estos genes y proteínas se puede evaluar mediante técnicas conocidas per se en la técnica, tal como se trata en la sección experimental.

- 40 La invención describe además fármacos que se pueden usar para modular estos genes y proteínas diana. La invención describe la identificación y la actividad de fármacos concretos que, bien solos pero, preferentemente en combinación(es), modulan la ruta anterior y pueden usarse para tratar dichas enfermedades. En particular, los inventores han identificado moléculas pequeñas que ya existen en la literatura pero que están siendo usados para tratar enfermedades distintas en sujetos humanos.

45 A este respecto, la invención describe composiciones que comprenden al menos un modulador de AMPK (preferentemente seleccionado de fenformina y vidarabina), un inhibidor de ATP1A1 (preferentemente omeprazol), un inhibidor de CACNA1C (preferentemente amlodipino), un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferentemente sulfisoxazol), un modulador de los receptores GABAérgicos y glutamatérgicos GRIN2B y GRIN3A (preferentemente acamprosato), un inhibidor de la actividad de GSK3B (preferentemente seleccionado de albuterol y metamamol), un modulador de hialuronano sintasas HAS1-3 (preferentemente leflunomida), un inhibidor de IMPDH1 e IMPDH2 (preferentemente tioguanina), un inhibidor de MTOR (preferentemente rapamicina), un inhibidor de las fosfodiesterasas PDE11A, PDE4A y PDE5A (preferentemente tadalafilo), un inhibidor de PDE3A (preferentemente cilostazol), un inhibidor de PDE4D (preferentemente milrinona), un modulador de PRDX5 y PRDX6 (preferentemente metimazol), un activador de PRKG1 (preferentemente seleccionado de nitroprusida, tadalafilo y cilostazol), un modulador de RHOA (preferentemente seleccionado de alendronato y terbinafina), un

5 modulator de RYR3 (preferentemente prilocaína), un inhibidor de SCN1A y un activador de los canales de BK (preferentemente zonisamida), un inhibidor de SCN1A/B (preferentemente seleccionado de zonisamida y fosfenitoína), un inhibidor de YES1 y SRC (preferentemente dasatinib), un activador de la autofagia (preferentemente trehalosa), y/o chaperonas químicas (preferentemente seleccionadas de fenilbutirato sódico, rifabutina, arabitol y manitol).

Tal como se ha mencionado en párrafos anteriores, la invención propone particularmente diseñar terapias de combinación para abordar los mecanismos de la EA y trastornos relacionados. A este respecto, la invención describe una composición que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, para administración combinada, por separado o secuencial:

- 10 - un modulator de AMPK (preferentemente fenformina) y un inhibidor de los canales de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferentemente zonisamida),
- un modulator de los receptores GABAérgicos y glutamatérgicos (preferentemente acamprosato) y un modulator de RHOA (preferentemente terbinafina).
- 15 - un inhibidor de los canales de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferentemente zonisamida) y un modulator del receptor de rianodina RYR3 (preferentemente prilocaína),
- un modulator de AMPK (preferentemente fenformina) y un modulator del receptor de rianodina RYR3 (preferentemente prilocaína),
- un modulator de AMPK (preferentemente fenformina) y un modulator de RHOA (preferentemente terbinafina),
- 20 - un inhibidor de los canales de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferentemente zonisamida) y un modulator de RHOA (preferentemente terbinafina),
- un modulator del receptor de rianodina RYR3 (preferentemente prilocaína) y un modulator de RHOA (preferentemente terbinafina).
- un modulator de AMPK (preferentemente terbinafina) y una chaperona química (preferentemente rifabutina),
- 25 - un inhibidor de los canales de sodio SCN1A y un activador de los canales de BK (preferentemente zonisamida) y una chaperona química (preferentemente rifabutina),
- un modulator del receptor de rianodina RYR3 (preferentemente prilocaína) y una chaperona química (preferentemente rifabutina).
- un modulator de RHOA (preferentemente terbinafina) y una chaperona química (preferentemente rifabutina), o
- 30 - un modulator de AMPK (preferentemente fenformina) y un inhibidor de las fosfodiesterasas PDE11A y PDE4A, PDE5A (preferentemente tadalafilo).

35 La presente invención también describe composiciones que comprenden un compuesto seleccionado de acamprosato, albuterol, alendronato, amlodipino, arabitol, cilostazol, dasatinib, fosfenitoína, leflunomida, manitol, metaraminol, metimazol, milrinona, nitroprusida, omeprazol, fenformina, fenilbutirato sódico, prilocaína, rapamicina, rifabutina, sulfisoxazol, tadalafilo, terbinafina, tioguanina, trehalosa, vidarabina y zonisamida, o una combinación de los mismos.

La invención describe composiciones que comprenden al menos un compuesto escogido del grupo constituido por acamprosato, cilostazol, metimazol, fenformina, prilocaína, tadalafilo, terbinafina, zonisamida y rifabutina, o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para administración simultánea, por separado o secuencial.

40 La invención también describe composiciones que comprenden una combinación de al menos dos compuestos escogidos del grupo constituido por acamprosato, cilostazol, metimazol, fenformina, prilocaína, tadalafilo, terbinafina, zonisamida y rifabutina, o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para administración simultánea, por separado o secuencial.

45 La presente invención también describe composiciones que comprenden una combinación de al menos dos compuestos escogidos del grupo constituido por acamprosato, cilostazol, metimazol, fenformina, prilocaína, tadalafilo, terbinafina, zonisamida y rifabutina, o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, donde dicha composición inhibe la respuesta de estrés celular inducido en trastornos neurodegenerativos seleccionados del grupo constituido por la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de

Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y esclerosis múltiple (EM).

Esta invención también describe composiciones que comprenden una combinación de al menos dos compuestos escogidos del grupo constituido por acamprosato, cilostazol, metimazol, fenformina, prilocaína, tadalafilo, 5 terbinafina, zonisamida y rifabutina, o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para tratar la enfermedad de Alzheimer (EA).

La invención describe, por ejemplo, composiciones para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado en un enfermo que lo necesita, que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos para administración combinada, por separado o secuencial:

- fenformina y zonisamida,
- 10 - acamprosato y terbinafina,
- zonisamida y prilocaína,
- fenformina y prilocaína,
- fenformina y terbinafina,
- zonisamida y terbinafina,
- 15 - prilocaína y terbinafina,
- fenformina y rifabutina,
- zonisamida y rifabutina,
- prilocaína y rifabutina,
- terbinafina y rifabutina, o
- 20 - fenformina y tadalafilo,

Otra composición descrita en la invención comprende al menos amlodipino y prilocaína, o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para administración simultánea, por separado o secuencial.

Otra composición descrita en la invención comprende al menos amlodipino y/o prilocaína, o sales o profármacos o 25 derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado.

Otra composición descrita en la invención comprende además al menos un fármaco que inhibe la respuesta de estrés celular para el uso combinado, por separado o secuencial.

Por ejemplo, el fármaco adicional que inhibe la respuesta de estrés celular se selecciona de un modulador de 30 AMPK (preferentemente vidarabina), un inhibidor de ATP1A1 (preferentemente omeprazol), un inhibidor de la actividad de GSK3B (preferentemente seleccionado de albuterol y metaraminol), un inhibidor de IMPDH1 e IMPDH2 (preferentemente tioguanina), un inhibidor de MTOR (preferentemente rapamicina), un inhibidor de PDE4D (preferentemente milrinona), un activador de PRKG1 (preferentemente cilostazol), un modulador de RHOA (preferentemente alendronato), un inhibidor de SCN1A/B (preferentemente fosfenitoína), un inhibidor de YES1 y 35 SRC (preferentemente dasatinib), un activador de la autofagia (preferentemente trehalosa), y/o chaperonas químicas (preferentemente seleccionadas de fenilbutirato sódico, arabitol y manitol).

La invención también describe que el fármaco adicional que inhibe la respuesta de estrés celular se puede 40 seleccionar del fármaco o fármacos que se unen o modulan la actividad de una proteína codificada por un gen seleccionado de ACCN1, ADRA1A, ADRB2, AFADIN, AKT, ALDH2, ALOX12, AMPK, APBA1, APBA2BP, APG1, APG12, APOER2, ATG5, ATG7, ATM, ATP1A1, ATP2A3, ATP2B1, ATP6V1C1, ATR, BACE1, BAD, BAX, BCAR1, BCL2, BECLIN1, canales de BK (KCNMA1, KCNMB1), BRCA1, CACNA1C, CALCINEURINA, CD36, CD44, CDH1, CDH2, CDK5, CDKN1A, CHK1, CHRM1, CHRM2, CHRM3, CHRM4, CHRM5, CK1, CTNNA2, CTNNB1, CULLIN1, CICLINA, DCC, DGKB, DGKH, DNAJB9, DOCK3, DRD2, EDNRA, ELAVL2, ERK1, ERK2, EZRINA, FAS, FKBP12, FKBP12.6, FOXO3A, FZ2, GADD45, GNPTAB, GPC5, GRK2, GRK5, GRP170, GRIN2B, GRIN3A, GSK3B, HAS1, 45 HAS2, HAS3, HIPK2, HSPAS, HSP90B1, HSPA5, HTR1A, IDE, IMPDH1, IMPDH2, INS, INSR, IRF1, ITB1, ITGA1, ITGB1, ITPR1, JNK1, LAMA1, MAD1L1, MAO, MCC1, MDM1, MME, MOESIN, MTOR, NADPH OXIDASA, NEDD9,

ES 2 410 930 T3

NETRIN1, NFKB1, NHERF, NOS1, NOS2A, NOS3, PAELR, PAK1, PARK2, PCAF, PDE11A, PDE3A, PDE4D, PDE5, PDE6D, PI3K, PIK3C3, PKCA, PLCB1, PLD2, PLN, PML, POP2, PRDX5, PRDX6, PRKG1, PTPRG, PTPRM, PVRL1, RAC1, RACK1, RADIXIN, RHOA, ROR2, RTN1, RYR3, SAPK3, SCN1A, SCN1B, SCNN1D, SCNN1G, SH3BP5, SIL1, SLC8A1, SLC8A2, SLC8A3, SLN, SNCA, SNCAIP, SORBS2, SORCS2, SRC, SYN1, THBS2, TP53, TP63, TRPC3, TRPC4, TRPC5, UNC5C, VPS15, WNTIA, WNT5A, WWOX, XANTINA OXIDASA, y YES1.

Los compuestos citados con anterioridad se enumeran en la tabla 1 siguiente, junto con su número CAS. La invención también describe el uso de los compuestos anteriores, así como cualquier sal, hidrato, éster, éter, isómeros, racemato, conjugados o profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los profármacos se pueden preparar (p. ej., mediante acoplamiento del fármaco a un vehículo adecuado) para ofrecer un control mejor sobre los parámetros farmacocinéticos del tratamiento.

Tabla 1

NOMBRE DEL FÁRMACO	NÚMERO CAS
Acamprosato	77337-76-9
Albuterol	18559-94-9
Alendronato	66376-36-1
Amlodipino	88150-42-9
Arabitol	488-82-4, 7643-75-6, 6018-27-5
Cilostazol	73963-72-1
Dasanitib	302962-49-8
Fosfenitoína	93390-81-9
Leflunomida	75706-12-6
Manitol	69-65-8
Metaraminol	54-49-9
Metimazol	60-56-0
Milrinona	78415-72-2
Nitroprusida	15078-28-1
Omeprazol	73590-58-6
Fenformina	114-86-3
Fenilbutirato sódico	1716-12-7
Prilocaina	721-50-6
Rapamicina	53123-88-9
Rifabutina	72559-06-9
Sulfisoxazol	127-69-5
Tadalafilo	171596-29-5
Terbinafina	91161-71-6
Tioguanina	154-42-7
Trehalosa	99-20-7

Vidarabina	24356-66-9
Zonisamida	68291-97-4

5 Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables, sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables, sales metálicas farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y de amonio alquilado. Las sales de adición de ácido incluyen sales de ácidos inorgánicos, así como ácidos orgánicos. Ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico, sulfúrico, nítrico y similares. Ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen los ácidos fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinnámico, cítrico, fumárico, glicólico, láctico, maleico, málico, malónico, mandélico, oxálico, pícrico, pirúvico, salicílico, succínico, metanosulfónico etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamoico, bismetilensalicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, o-toluenosulfónico, sulfatos, nitratos, fosfatos, percloratos, boratos, acetatos, benzoatos, hidroxinaftoatos, glicerofosfatos, cetoglutaratos y similares. Ejemplos adicionales de sales de adición de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables se enumeran en, por ejemplo, J. Pharm. Sci. 1977, 66, 2, que se incorpora en la presente memoria por referencia. Ejemplos de sales de metales incluyen sales de litio, sodio, potasio, magnesio y similares. Ejemplos de sales de amonio y de amonio alquilado incluyen sales de amonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, hidroxietilamonio, dietilamonio, butilamonio, tetrametilamonio y similares. Ejemplos de bases orgánicas incluyen lisina, arginina, guanidina, dietanolamina, clona y similares.

20 La terapia de acuerdo con la invención se puede realizar sola o como combinación de fármacos y/o junto con cualquier otra terapia, dirigida a la misma ruta o que tienen distintos modos de acción. Se puede proporcionar en el domicilio, la consulta del médico, una clínica, el departamento ambulatorio de un hospital o un hospital, de modo que el médico pueda observar estrechamente los efectos de la terapia y realizar los ajustes que sean necesarios.

25 La invención también describe composiciones que comprenden además al menos un fármaco que modula la angiogénesis, preferentemente que incrementa la angiogénesis, para el uso combinado, por separado o secuencial. seleccionados del grupo constituido por ambrisentan, ácido aminocaproico, argatrobán, balsalazida, beclaplermin, cabergolina, clopidogrel, desirudina, dihidroergotamina, eplerenona, fenoldopam, fludrocortisona, gemfibrozilo, hesperetina, leflunomida, L-histidina, liotironina, marimastat, meloxicam, mepacrina, metazolamida, montelukast, netilmicina, nitroglicerina, pirimetamina, sulfisoxazol, sunitinib, tietilperazina, tirofibán, topotecán y warfarina (véase la tabla 2 a continuación).

30

Tabla 2

NOMBRE DEL FÁRMACO	NÚMERO CAS
Ambrisentan	177036-94-1
Ácido aminocaproico	60-32-2
Argatrobán	74863-84-6
Balsalazida	80573-04-2
Beclaplermin	165101-51-9
Carbegolina	81409-90-7
Clopidogrel	113665-84-2
Desirudina	120993-53-5
Dihidroergotamina	6190-39-2
Eplerenona	107724-20-9

ES 2 410 930 T3

Fenoldopam	67227-57-0
Fludrocortisona	127-31-1
Gemfibrozilo	25812-30-0
Hesperetina	520-33-2
Leflunomida	75706-12-6
L-histidina	71-00-1
Liotironina	6893-02-3
Marimastat	154039-60-8
Meloxicam	71125-38-7
Mepacrina	83-89-6
Metazolamida	554-57-4
Montelukast	158966-92-8
Netilmicina	56391-56-1
Nitroglicerina	55-63-0
Pirimetamina	58-4-0
Sulfisoxazol	127-69-5
Sunitinib	557795-19-4
Tietilperacina	1420-55-9
Tirofibán	144494-65-5
Topotecán	119413-54-6
Warfarina	81-81-2

5 Esta invención también describe composiciones que comprenden además al menos un fármaco que modula la función sináptica, preferentemente que mejora la función sináptica para el uso combinado, por separado o secuencial, seleccionado de alfentanilo, amilorida, amlodipino, aztreonam, baclofeno, buclizina, numetanida, buprenorfina, lidocaína, clorzoxazon, cinacalcet, difilina, eletriptán, ergotamina, flunitrazepam, imatinib, ketotifeno, pegaptanib, pentazocina, fenofarbital, pregabalina, propiltiouracilo, temazepam, tiagabina, topiramato, triamtireno y vidarabina (véase la tabla 3 a continuación).

Tabla 3

NOMBRE DEL FÁRMACO	NÚMERO CAS
Alfentanilo	71195-58-9
Amilorida	2016-88-8
Amlodipino	88150-42-9
Aztreonam	78110-38-0

Baclofeno	1134-47-0
Buclizina	82-95-1
Bumetanida	28395-03-1
Buprenorfina	52485-79-7
Clorzoxazoa	95-25-0
Cinacalcet	226256-56-0
Difilina	479-18-5
Eletriptán	143322-58-1
Ergotamina	113-15-5
Flunitrazepam	1622-62-4
Imatinib	152459-95-5
Ketotifeno	34580-14-8
Lidocaína	137-58-6
Pegaptanib	222716-86-1
Pentazocina	359-83-1
Fenobarbital	50-06-6
Pregabalina	148553-50-8
Propiltiouracilo	51-52-5
Temazepam	846-50-4
Tiagabina	115103-54-3
Topiramato	97240-79-4
Triamtireno	396-01-0
Vigabatrina	60643-86-9

La invención describe una composición que comprende un fármaco que incrementa la angiogénesis, un fármaco que inhibe la respuesta de estrés celular y un fármaco que mejora la función sináptica para administración simultánea, por separado o secuencial.

- 5 La invención también describe una composición que usa un fármaco que exhibe al menos dos de las actividades enumeradas en lo que antecede. De hecho, los fármacos que inhiben la respuesta de estrés celular y que también incrementan la angiogénesis o mejoran la función sináptica también se describen en la presente invención.

Normalmente, las composiciones de la invención comprenden uno o varios vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. La duración de la terapia depende del estadio de la enfermedad que se está tratando, la combinación usada, la edad y estado del paciente y cómo responde el paciente al tratamiento.

- 10

La dosificación, frecuencia y modo de administración de cada componente de la combinación se puede controlar de forma independiente. Por ejemplo, se puede administrar un fármaco por ruta oral, mientras que el segundo fármaco se puede administrar por ruta intramuscular. La terapia de combinación se puede administrar en ciclos de terapia y descanso, que incluyen periodos de descanso de modo que el cuerpo del paciente tenga la posibilidad de

recuperarse de cualquiera de los efectos secundarios todavía sin predecir. Los fármacos también se pueden formular juntos de modo que una administración libere todos los fármacos.

5 La administración de cada fármaco de la combinación puede ser por cualquier medio adecuado que tenga como resultado una concentración del fármaco que, combinada con el otro componente, sea capaz de corregir el funcionamiento de las rutas implicadas en la EA.

Aunque es posible administrar los ingredientes activos de la combinación en forma del producto químico puro, es preferible presentarlos como una composición farmacéutica, también denominada en este contexto formulación farmacéutica. Las posibles composiciones incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, tópica (incluidas transdérmica, bucal y sublingual) o parenteral (incluidas subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica).

10 Más habitualmente, estas formulaciones farmacéuticas se prescriben a los enfermos en "paquetes personalizados" que contienen, en un envase único, normalmente un envase blíster, varias unidades de dosificación u otros medios para la administración de las dosis unitarias medidas que se van a usar durante un periodo de tratamiento determinado. Los paquetes personalizados presentan ventajas si se comparan con las prescripciones tradicionales, ya que a diferencia de estas últimas en las que el farmacéutico toma una parte de una provisión global de producto farmacéutico para suministrarla a un paciente, el paciente siempre va a tener acceso al prospecto contenido en el paquete personalizado, que normalmente no está disponible en las prescripciones tradicionales. Se ha demostrado que la inclusión de un prospecto mejora el cumplimiento del paciente con las instrucciones del médico. Por tanto, la invención además incluye una formulación farmacéutica, como se ha descrito antes en la presente memoria, en combinación con un envase adecuado para dichas formulaciones. En dicho paquete personalizado, el uso al que se destina una formulación para el tratamiento de combinación se puede deducir mediante instrucciones, instalaciones, condiciones, adaptaciones y/u otros medios auxiliares usando la formulación más adecuada para el tratamiento. Dichas medidas convierten un paquete personalizado en específicamente adecuado y adaptado para usar en el tratamiento con la combinación de la presente invención.

25 El fármaco puede estar contenido en cualquier cantidad adecuada y cualquier sustancia vehículo adecuada y puede estar presente en una cantidad de 1-99 % en peso del peso total de la composición. La composición puede proporcionarse en una forma de dosificación que sea adecuada para la ruta de administración oral, parenteral (p. ej., intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhalatoria, cutánea (parche) y ocular. Por tanto, la composición puede estar en forma de, por ejemplo comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles, incluidos hidrogeles, pastas, ungüentos, cremas, yesos, vendajes, dispositivos de liberación osmótica, supositorios, enemas, inyectables, implantes, aerosoles o aerosoles.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (véase, p. ej., Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. 1. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

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

40 Las formulaciones de liberación controlada incluyen (i) formulaciones que crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado; (ii) formulaciones que después de un periodo de demora predeterminado crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado; (iii) formulaciones que sostienen la acción del fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado manteniendo un nivel eficaz relativamente constante de fármaco en el cuerpo, con minimización concomitante de efectos secundarios indeseables asociados con fluctuaciones a nivel plasmático de la sustancia farmacológica activa; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco mediante, p. ej., colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente a o en el tejido u órgano enfermo; y (v) formulaciones dirigidas a la acción del fármaco mediante el uso de vehículos o derivados químicos para liberar el fármaco en un tipo de célula diana concreto.

50 Especialmente se prefiere la administración de fármacos en forma de una formulación de liberación controlada en los casos en los que el fármaco, bien solo o en combinación, tiene (i) un estrecho índice terapéutico (Es decir, la diferencia entre la concentración en plasma que da lugar a efectos secundarios dañinos o reacciones tóxicas y la concentración en plasma que producir un efecto terapéutico es pequeña; en general, el índice terapéutico, IT, se define como la proporción entre la mediana de la dosis letal (DL50) y la mediana de la dosis efectiva (DE50)); (ii) un margen de absorción estrecho en el tracto gastrointestinal; o (iii) una semivida biológica muy corta de modo que durante un día se requiere dosificación frecuente con el fin de mantener el nivel plasmático en un nivel terapéutico.

Se puede ejercer una serie de estrategias con el fin de obtener liberación controlada en la que la velocidad de liberación supera a la velocidad del metabolismo del fármaco en cuestión. La liberación controlada se puede obtener mediante la selección adecuada de varios parámetros e ingredientes de formulación, incluidas, por ejemplo, varios tipos de composiciones y revestimientos de liberación controlada. Por tanto, el fármaco se formula con excipientes adecuados en una composición farmacéutica que, tras la administración, libera el fármaco de forma controlada (composiciones en comprimidos o cápsulas de una o múltiples unidades, soluciones de aceite, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches y liposomas).

Formas de dosificación sólida para uso oral

Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el(los) ingrediente(s) activo(s) en una mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o cargas inertes (p. ej., sacarosa, celulosa microcristalina, almidones, incluidos almidón de patata, carbonato cálcico, cloruro sódico, fosfato cálcico, sulfato cálcico o fosfato sódico); agentes de granulación y disgregantes (p. ej., derivados de celulosa, incluidas celulosa microcristalina, almidones, incluidos almidón de patata, croscarmelosa sódica, alginatos o ácido algínico); agentes aglutinantes (p. ej., goma arábiga, ácido algínico, alginato sódico, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, Hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol; y agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (p. ej., ácido esteárico, sílices o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes aromatizantes, plastificantes, humectantes, agentes tampón y similares.

Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y, de este modo, proporcionar una acción sostenida durante un periodo de tiempo largo. El revestimiento puede adaptarse para liberar la sustancia farmacológica activa en un patrón predeterminado (p. ej., para conseguir una formulación de liberación controlada) o pueden adaptarse para no liberar la sustancia farmacológica activa hasta después de haber pasado el estómago (revestimiento entérico). El revestimiento puede ser un revestimiento de azúcar, un revestimiento pelicular (p. ej., basado en hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona) o un revestimiento entérico (p. ej., basado en copolímero de ácido metacrílico, acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato ftalato de polivinilo, goma laca y/o etilcelulosa). Se puede usar un material retardador tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones sólidas pueden incluir un revestimiento adaptado para proteger la composición de cambios químicos no deseados (p. ej., degradación química antes de la liberación de la sustancia farmacológica activa). El revestimiento puede aplicarse sobre la forma de dosificación sólida de un modo similar al descrito en Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

Varios fármacos se pueden mezclar en el comprimido o se pueden dividir. Por ejemplo, el primer fármaco está contenido en el interior del comprimido y el segundo fármaco está fuera, de modo que una porción sustancial del segundo fármaco se libera antes de la liberación del primer fármaco.

Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar en forma de comprimidos masticables o en forma de cápsulas de gelatina dura, en los que el ingrediente activo está mezclado con un diluyente sólido inerte (p. ej., almidón de maíz, celulosa microcristalina, carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín) o como cápsulas de gelatina blanda, en las que el ingrediente activo está mezclado con agua o con un medio oleoso, por ejemplo parafina líquida o aceite de oliva. Los polvos y granulados se pueden preparar usando los ingredientes mencionados en lo que antes en comprimidos y cápsulas de un modo convencional.

Se pueden construir composiciones de liberación controlada para uso oral para, por ejemplo, liberar el fármaco activo mediante el control de la disolución y/o la difusión de la sustancia farmacológica.

La disolución o difusión de liberación controlada se puede conseguir mediante el revestimiento adecuado de una formulación en comprimido, cápsula, pastilla o granulado de fármacos o mediante la incorporación del fármaco en una matriz adecuada. Un revestimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de revestimiento mencionadas en lo que antecede y/o, por ejemplo, goma shellac, cera de abeja, cera de glucosa, cera de ricino, cera carnauba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido dl-poliláctico, acetato butirato de celulosa, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, pirrolidona de vinilo, polietileno, polimetacrilato, metilmetacrilato, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3-butilenglicol, metacrilato de etilenglicol y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de la matriz también puede incluir, por ejemplo, metilcelulosa hidratada, cera de carnauba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, acrilato de metilo-metacrilato de

metilo, cloruro de polivinilo, polietileno y/o fluorocarbono hidrogenado.

Una composición de liberación controlada que contiene uno o más de los fármacos de las combinaciones reivindicadas también puede estar en forma de un comprimido o cápsula flotante (es decir, un comprimido o cápsula que, tras la administración oral, flota encima del contenido gástrico durante un periodo de tiempo determinado). Una composición de comprimido flotante del(los) fármaco(s) se pueden preparar mediante granulación de una mezcla del(los) fármaco(s) con excipientes y 20-75 % p/p de hidrocoloides, tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. A continuación, los gránulos obtenidos se pueden comprimir para formas comprimidos. Tras el contacto con el jugo gástrico, el comprimido forma una barrera en gel impermeable al agua alrededor de su superficie. Esta barrera en gel toma parte en el mantenimiento de una densidad inferior a uno, de modo que se permite que el comprimido permanezca flotando en el jugo gástrico.

Líquidos para administración oral

Polvos, polvos dispersables o gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua son formas de dosificación conveniente para administración oral. La formulación en forma de suspensión proporciona el ingrediente activo en una mezcla con un agente de dispersión o humectación, agente de suspensión y uno o más conservantes. Agentes de suspensión adecuados son, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato sódico y similares.

Composiciones parenterales

La composición farmacéutica también se puede administrar por ruta parenteral mediante inyección, infusión o implantación (intravenosa, intramuscular, subcutánea o similar) en formas de dosificación, formulaciones o mediante dispositivos de liberación adecuados o implantes que contienen vehículos y adyuvantes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. La formulación y preparación de dichas composiciones son bien conocidas para los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica.

Las composiciones para uso parenteral se pueden proporcionar en formas de dosificación unitaria (p. ej., en ampollas de una única dosis) o en viales que contienen varias dosis y en los que se puede añadir un conservante adecuado (véase más adelante). La composición puede estar en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión o un dispositivo de liberación para implantar, o se puede presentar en forma de un polvo seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de usar. Aparte del(los) ingrediente(s) activo(s), la composición puede incluir vehículos y/o excipientes adecuados parenteralmente aceptables. El(los) fármaco(s) activo(s) se pueden incorporar en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas o similares para liberación controlada. La composición puede incluir agentes de suspensión, solubilización, estabilización, de ajuste de pH y/o agentes de dispersión.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden estar en forma adecuada para inyección estéril. Para preparar dicha composición, el(los) fármaco(s) activo(s) adecuado(s) se disuelven o suspenden en un vehículo líquido parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar están agua, agua ajustada hasta un pH adecuado mediante la adición de una cantidad adecuada de ácido clorhídrico, hidróxido sódico o un tampón adecuado, 1-3-butanodiol, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónico. La formulación acuosa puede también contener uno o más conservantes (p. ej., p-hidroxibenzoato de metilo, etilo o n-propilo). En los casos en los que uno de los fármacos es poco o ligeramente soluble en agua se puede añadir una disolución de potenciación o un agente solubilizante, o el disolvente puede incluir 10-60 % p/p de propilenglicol o similares.

Las composiciones parenterales de liberación controlada pueden estar en forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, soluciones oleosas, suspensiones oleosas o emulsiones. Como alternativa, el(los) fármaco(s) activo(s) pueden incorporarse en vehículos biocompatibles, liposomas, nanopartículas, implantes o dispositivos de infusión. Materiales para usar en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, por ejemplo, polímeros biodegradables/bioerosionables tales como poligalactina, poli(cianoacrilato de isobutilo), poli(2-hidroxietil-L-glutamina). Vehículos biocompatibles que se pueden usar al formular una formulación parenteral de liberación controlada son hidratos de carbono (p. ej., dextranos), proteínas (p. ej., albúmina), lipoproteínas o anticuerpos. Materiales para usar en implantes pueden ser no biodegradables (p. ej., polidimetilsiloxano) o biodegradables (p. ej., poli(caprolactona), poli(ácido glicólico) o poli(ortoésteres)).

Composiciones rectales

Para aplicación rectal, formas de dosificación adecuadas para una composición incluyen supositorios (de tipo emulsión o suspensión) y cápsulas de gelatina rectal (soluciones o suspensiones). En una formulación de supositorio típica, el(los) fármaco(s) activo(s) se combinan con una base de supositorio adecuada

farmacéuticamente aceptable, tal como manteca de cacao, ácidos grasos esterificados, gelatina glicerizada y varias bases hidrosolubles o dispersables como polietilenglicoles. Se pueden incorporar varios aditivos, potenciadores o tensioactivos.

Composiciones percutáneas y tópicas

- 5 Las composiciones farmacéuticas pueden también administrarse tópicamente sobre la piel para absorción percutánea en formas de dosificación o formulaciones que contienen vehículos y excipientes farmacéuticos convencionalmente no tóxicos, incluidas microesferas y liposomas. Las formulaciones incluyen cremas, ungüentos, lociones, linimentos, geles, hidrogeles, soluciones, suspensiones, barras, aerosoles, pastas, yesos y otros tipos de sistemas de liberación transdérmica del fármaco. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables puede
- 10 incluir agentes emulsionantes, antioxidantes, agentes tampón, conservantes, humectantes, potenciadores de la penetración, agentes quelantes, agentes formadores de gel, bases de ungüento, perfumes y agentes protectores de piel.

Los agentes emulsionantes pueden ser gomas naturales (p. ej., goma arábiga o goma de tragacanto)

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

Las composiciones farmacéuticas descritas en párrafos anteriores para administración tópica sobre la piel pueden también usarse en relación con la administración tópica o cerca de la parte del cuerpo que se va a tratar. Las composiciones se pueden adaptar para aplicación directa o para aplicación por medio de dispositivos de liberación de fármaco especiales, tales como vendajes o, como alternativa, yesos, compresas, esponjas, tiras u otras formas

20 de material flexible adecuado.

Dosificaciones y duración del tratamiento

Debe entenderse que los fármacos de la combinación se pueden administrar de forma concomitante, bien en la misma o en diferente formulación farmacéutica, o secuencialmente. Si hay administración secuencial, el retraso en la administración del segundo (o adicional) ingrediente activo no debe ser tal que se pierdan los beneficios del

25 efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. Un requisito mínimo para una combinación de acuerdo con esta descripción es que la combinación debe estar destinada al uso combinado con el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. El uso pretendido de una combinación se puede deducir mediante instalaciones, condiciones, adaptaciones y/u otros medios auxiliares usando la combinación de acuerdo con la invención.

- 30 Aunque los fármacos activos de la presente invención se pueden administrar en dosis divididas, por ejemplo dos o tres veces al día, se prefiere una única dosis diaria de cada fármaco en la combinación, siendo más preferida una única dosis diaria de todos los fármacos en una única composición farmacéutica (forma de dosificación unitaria).

La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente pequeñas (tales como cápsulas, comprimidos o cilindros de jeringuilla cargados) adecuados como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y

35 otros mamíferos, de modo que cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material o materiales activos calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con un vehículo farmacéutico requerido.

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

- 40 Adicionalmente, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo sobre el perfil farmacocinético, farmacodinámico o de eficacia de una sustancia terapéutica) sobre un paciente concreto puede afectar a la dosificación usada.

Excepto cuando se responde a casos de enfermedad de EA especialmente deteriorantes, en donde se pueden requerir dosificaciones más altas, la dosificación referida de cada fármaco en la combinación normalmente residirá

45 dentro del intervalo de dosis no superiores a la prescrita normalmente para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo o cuando se ha demostrado que son seguras en estudios clínicos de tamaño grande de fase 3.

Por ejemplo, la dosificación más preferida corresponderá a cantidades del 1 % hasta el 10 % de las normalmente prescritas para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo.

- fenformina por ruta oral de aproximadamente 0,5 a 5 mg al día y rifabutina por ruta oral de aproximadamente 6 a

60 mg al día

- fenformina por ruta oral de aproximadamente 0,5 a 5 mg al día y arabitol por ruta oral de aproximadamente 50 a 500 mg al día.

5 - tadafilo por ruta oral de aproximadamente 0,05 a 0,5 mg al día y omeprazol por ruta oral de aproximadamente 0,4 a 4 mg al día.

- cilostazol por ruta oral de aproximadamente 1 a 10 mg al día y omeprazol por ruta oral de aproximadamente 0,4 a 4 mg al día.

- fenformina por ruta oral de aproximadamente 0,5 a 5 mg al día y dasatinib por ruta oral de aproximadamente 1 a 10 mg al día

10 - dasatinib por ruta oral de aproximadamente 1 a 10 mg al día y acamprosato por ruta oral de aproximadamente 7 a 70 mg tres veces al día

- dasatinib por ruta oral de aproximadamente 1 a 10 mg al día y terbinafina por ruta oral de aproximadamente 2,5 a 25 mg una o dos veces al día

15 Debe entenderse que la cantidad del fármaco administrado en realidad deberá determinarla un médico a la luz de circunstancias relevantes, incluida la afección o afecciones a tratar, la composición exacta que se va a administrar, la edad, el peso y la respuesta de cada paciente individual y la gravedad de los síntomas del paciente y la ruta de administración elegida. Por tanto, con los intervalos de dosificación anteriores se pretende dar unas directrices generales y un soporte para las enseñanzas de la presente memoria, pero no están destinados a limitar el alcance de la invención.

20 Ejemplos

Validación del fármaco usando ensayos *in vitro*

25 Los ensayos *in vitro* son una potente herramienta para mejorar los fármacos y sus combinaciones que actúan sobre las rutas implicadas en la EA. Los fármacos de la presente invención, y sus combinaciones, se optimizan mediante la acción en ensayos *in vitro* específicos adaptados de acuerdo con la red de EA identificada en la presente invención. Posteriormente, estas moléculas o sus combinaciones podrían analizarse en un modelo *in vivo* de EA.

30 Estos ensayos *in vitro* se inicial con el estudio del nivel de expresión del gen de APP, seguido por los ensayos del potencial neuroprotector de los fármacos sobre las células expuestas al efecto tóxico de la proteína Abeta. Los fármacos en las rutas implicadas podrían analizarse individualmente, seguido por ensayos de su acción en combinación. En la etapa posterior, las combinaciones más eficaces que actúan sobre las dianas en rutas individuales se combinan y someten a ensayo en los ensayos neuroprotectores.

La regulación de la expresión de APP representa un importante punto de entrada para el tratamiento de la EA, ya que está situado antes de la generación de fragmentos tóxicos concretos y su acción sobre múltiples sistemas cerebrales, que, en última instancia, tienen como resultado la destrucción de funciones cognitivas.

35 En la EA, la proteína forma agregados de láminas β de la proteína Abeta fibrilar (amiloide). El cambio conformacional de la forma soluble a fibrilar parece ser un acontecimiento espontáneo que aumenta con las concentraciones crecientes de Abeta, por lo que cualquier producción de mayores cantidades de Abeta con respecto a lo normal (o la producción de formas más grandes, menos solubles de Abeta) tenderá a incrementar la formación de placas. Una vez que la placa Abeta ha comenzado a formarse, otras moléculas pueden interaccionar con la placa naciente para producir, al final, la placa madura con sus áreas asociadas de muerte celular neuronal.

40 Considerando este hecho, los inventores han dado prioridad a los ensayos de los efectos de los fármacos sobre la viabilidad de las células expuestas a la proteína β amiloide.

Cultivo de células PC12

45 Células PC12 (feocromocitoma de rata, ATCC ref: CRL-1721) de la ATCC (ATCC CRL1721) se descongelaron rápidamente en agua a 37 °C. El sobrenadante se introdujo inmediatamente en 9 ml de un "medio de proliferación de PC12" que contienen medio Eagle modificado de Dulbecco DMEM-F12 (Pan Biotech ref: P04-41450) con 15 % de suero de caballo inactivado con calor (Invitrogen ref: 16050-130), 2,5 % de suero bovino fetal (FBS; Invitrogen ref: 16000036), 1 % de penicilina 10.000 U/ml y estreptomycin 10mg/ml (PS ; Pan Biotech ref: P06-07100) y 1 % de L-glutamina 200mM (Pan Biotech ref: P04-80100).

ES 2 410 930 T3

Las células se centrifugaron (800 ciclos/min, 4 °C durante 5 min) y se añadieron en 5 ml de “medio de proliferación de PC12”, se contaron las células viables con una celda Malassez usando el ensayo de exclusión por rojo neutro (Sigma).

5 A continuación, las células se sembraron a $3 \cdot 10^4$ células por cm^2 en “medio de proliferación de PC12” en matraces de plástico de 75 cm^2 (Greiner Ref: 658175) revestidos con poli-L-lisina (10 $\mu\text{g/ml}$, Sigma Ref: P2636).

10 El medio se cambió en días alternos. Tras 3 días de cultivo, cuando las células alcanzaron un 80 % de confluencia, se lavaron en HBSS sin calcio y magnesio (Pan Biotech Ref: P06-33500) y se incubaron con tripsina EDTA, (0,05 %, Pan Biotech Ref: P10-023100). La reacción enzimática se detuvo con medio de proliferación de PC12 añadido por 0,5 mg/ml de ADNasa 1 de grado 2 (Pan Biotech Ref: T60-37780100). Después, las células PC12 se centrifugaron (800 ciclos/min a 4 °C durante 10 min) y las células se sembraron a la densidad de $2,9 \cdot 10^4$ por cm^2 en matraces de cultivo de 175 cm^2 (Greiner Ref: 661195) pre-revestidos con poli-L-lisina.

Intoxicación y ensayo de viabilidad MTT

15 Las células PC12 (pase nº 2) se siembran a razón de 3300 células por cm^2 en placas de 96 pocillos (Greiner Ref: 655 180) pre-revestidos con poli-L-Lisina (Sigma) en medio neurobasal (Invitrogen, Ref: 211 03049) que contiene B27 (2 %, Invitrogen, Ref: 211 03049), penicilina (50 U/ml)-estreptomycin (50 $\mu\text{g/ml}$) y glutamina (1 %) y 50 ng/ml de NGF (Sigma Ref: N1408). NGF permite que las PC12 se diferencien en células similares a las neuronas simpáticas.

20 Tras 5 días de cultivo, el medio se cambia con neurobasal que contiene NGF (50 ng/ml), B27 sin antioxidante, glutamina y antibióticos. Tras 24 horas, las células se incuban durante 1 hora con fármacos a 5 concentraciones, 6 pocillos por condición. Tras 1 hora de pre-incubación, las células se intoxican con 10 μM de beta-amiloide (25-35; Sigma) junto con fármacos en el medio de cultivo celular. 24 horas después, se lavan las células una vez con PSB (Pan Biotech, Ref: P04-36100) y se evalúa la supervivencia de las células PC12 mediante el ensayo de viabilidad con MTT (3,[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazoliubromuro).

Cultivo de células neuronales corticales

25 Neuronas corticales primarias de rata se cultivan tal como han descrito Singer et al., 1999. Brevemente, mediante dislocación cervical se sacrifica a las ratas hembra preñadas de 15 días de gestación (ratas Wistar Janvier) y se extraen los fetos de útero. Se retira la corteza y se coloca en medio helado de Leibovitz (L15; Invitrogen) que contiene 1 % de Penicilina-estreptomycin (PS; Invitrogen) y 1 % de seroalbúmina bovina (BSA; Sigma). La corteza se disocia mediante tripsinización durante 20 min a 37 °C (Tripsina EDTA IX; Invitrogen) diluidas en PBS sin calcio y sin magnesio. La reacción se detiene mediante la adición de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Invitrogen) que contiene ADNasa I de grado II (0,1 mg/ml Roche Diagnostic) y 10 % de suero bovino fetal (FCS; Invitrogen). Después, las células se disocian mecánicamente mediante 3 pases a través de una pipeta de 10 ml. Después, las células se centrifugan a $180 \times g$ 10 min a 10 °C. Se desecha el sobrenadante y las células del sedimento se resuspenden en un medio de cultivo definido constituido por Neurobasal (Invitrogen) enriquecido con B27 (2 %; Invitrogen), L-glutamina (0,2 mM; Invitrogen), 1 % de solución PS y 10 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, Pan Biotech). Las células viables se cuentan en un citómetro de Neubauer usando el ensayo de exclusión con azul tripán. Las células se siembran a una densidad de 30.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (los pocillos se pre-revistan con poli-L-lisina (10 $\mu\text{g/ml}$; sigma) y se cultivan a 37 °C en una atmósfera de aire humidificado (95 %)/CO₂ (5 %).

40 Tras 6 días de cultivo, las células se incuban con fármacos (5 concentraciones). Tras 1 hora, las células se intoxican con 20 μM del β -amiloide (25-35; Sigma) en medio definido sin BDNF pero junto con los fármacos. Las neuronas corticales se intoxican durante 2 días. El BDNF (10 ng/ml) se usa como control positivo (neuroprotector).

Ensayo de actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH)

45 Tras 2 días de cultivo, se recoge el sobrenadante y se analiza con el kit de detección de citotoxicidad (LDH, Roche Applied Sciences). Este ensayo colorimétrico para la cuantificación de la muerte celular se basa en la medición de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada del citosol de células dañadas al sobrenadante. La densidad óptica (DO) se evalúa mediante espectrofotometría a 492 nm de longitud de onda mediante un aparato multiscan (Thermo, Ref Ascent). Los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad celular en comparación con el control negativo (vehículo).

50 Resultados

Los resultados presentados en las Figura 1 y 2 se extraen de dos cultivos independientes, 6 pocillos por afección.

Todos los valores se expresan en forma de la media \pm e.e.m.. Con los datos brutos se realiza un análisis con la prueba bilateral t de Student. Los resultados se expresan en porcentaje de la longitud de las neuritas en comparación con el control (vehículo).

5 Las células PC12 diferenciadas con NGF se incuban con fármacos una hora antes de intoxicar con $A\beta_{25-35}$ 10 μ M durante 24 horas.

Un día después de esta incubación se cuantifica la viabilidad de PC12 diferenciadas con NGF usando un ensayo MTT. Los inventores han observado que 2 fármacos ejercen claramente un efecto protector contra esta intoxicación por $A\beta_{25-35}$ (Fig. 1).

10 Las neuronas corticales primarias de rata se incuban con fármacos una hora antes de la intoxicación con $A\beta_{25-35}$ 20 μ M durante 2 días. Dos días después de esta incubación se cuantifica la liberación de LDH en el medio de cultivo, lo que refleja el nivel de muerte celular. Los inventores han observado que 3 fármacos ejercen claramente un efecto protector contra esta intoxicación por $A\beta_{25-35}$ (Fig. 2).

Ensayos in vivo

15 Los compuestos y sus combinaciones activas en los ensayos in vitro se han analizado en un modelo in vivo de enfermedad de Alzheimer. La sobreexpresión de los transgenes de la proteína precursora de beta amiloide (APP) humana mutante vinculada con la enfermedad de Alzheimer ha sido el medio más fiable de estimular el depósito de Abeta en los cerebros de ratones transgénicos que sirvieron como modelos de enfermedad EA en numerosos estudios. A medida que envejecen, estos ratones con APP mutante desarrollan una patología amiloide sólida y otras características similares a la EA, incluidos disminución de la densidad sináptica, gliosis reactiva y algunos déficit cognitivos. Muchos modelos de ratones con APP mutante muestran pocas pruebas de pérdida neuronal franca y patología de ovillos neurofibrilares (ONF). Los ratones hemicigotos para este transgen BRI-Abeta42 son viables y fértiles con un ciclo de vida normal. El ARNm de BRI-Abeta42 transgénico se expresa en un patrón característico de, promotor de la proteína prión de ratón; mayores niveles de expresión del transgen se detectan en las células del gránulo cerebelar y el hipocampo, seguidos por la corteza, el puente troncocéfálico, el tálamo y el mesencéfalo. En la proteína de fusión transgénica, Abeta1-42 se condensa con el extremo C de a proteína BRI en el sitio de escisión de tipo furina, de modo que la escisión tiene como resultado una eficiente secreción de Abeta1-42 en la luz del espacio extracelular. Por tanto, estos ratones expresan de forma específica la isoforma de Abeta1-42. Los ratones BRI-Abeta42 hemicigóticos acumulan beta amiloide insoluble en detergente con la edad y desarrollan placas nucleadas en el cerebelo ya a los 3 meses de edad. El desarrollo de patología del prosencéfalo se produce más tarde, las placas Abeta extracelulares no están presentes de forma consistente en el hipocampo y las cortezas entorina/piriforme hasta los 12 meses de edad. Los depósitos de beta amiloide (placas nucleadas) se pueden observar ya a los 3 meses en la capa molecular del cerebelo de ratones transgénicos y se convierte en más pronunciado con la edad; se observan placas extracelulares ocasionales en las cortezas entorina/piriforme y el hipocampo a los 6 meses de edad, pero no se encuentran de forma consistente hasta > 12 meses de edad. Los ratones más viejos muestran una patología más extendida con placas nucleadas y difusas en el cerebelo, la corteza, el hipocampo y el bulbo olfatorio. Las placas de amiloide extracelulares muestran densos núcleos amiloides con fibrillas irradiantes; muchos haces de neuronas distróficas se observan en la periferia de estas placas. La gliosis reactiva se asocia con las placas.

Tratamientos farmacológicos

40 Los ratones Tg (Pmp-ITM2B /APP695*42) A12E mc transgénicos (43) se han obtenido en Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org/strain/007002.html>). Los ratones con los niveles en plasma más elevados de Abeta42, línea BRI-Abeta42A (12e), se han mantenido en un fondo mixto con B6C3. Los ratones transgénicos machos adultos tienen acceso libre a alimento y agua. De acuerdo con un protocolo aprobado por el Institutional Animal Care and Use Committee, los ratones se pesaron y se les inyectó i.p. o se alimentaron a la fuerza una vez al día durante de 45 10 a 20 semanas consecutivas con una solución control (placebo) o fármacos PXT, preparados a dosis diferentes.

Análisis de la supervivencia

50 Las tasas de supervivencia se han analizado usando procedimientos de Kaplan-Meier. Se han usado procedimientos de Holm-Sidak (post hoc) para todos los ensayos pareados de comparación múltiple. Las muertes extrañas se censuran. Todas las comparaciones se han realizado entre camadas para limitar cualquier efecto potencialmente confuso a partir de diferencias básicas en las cepas.

Ensayos conductuales

Los ensayos conductuales se diseñaron y realizaron de acuerdo con los procedimientos publicados por varios

autores (44-47).

Aprendizaje y memoria espacial en el laberinto de Morris Water (MWM)

Este experimento se realiza en una piscina circular, de 90 cm de diámetro, hecha de plástico blanco y llena con agua de color lechoso. Una plataforma de escape de 8 cm de diámetro, hecha de plástico transparente, se sumergió 0,5 cm debajo del nivel de agua. Se proporcionan pistas visuales mediante diferentes formas geométricas impresas en letras de tamaño A4 y se colocan en las 4 paredes adyacentes (la distancia desde la piscina era de 50 a 70 cm). En cada ratón se realizaron cuatro ensayos diariamente (intervalo de 5 a 7 minutos entre ensayos, un total de 16 ensayos) durante 4 días. Cada ensayo se realizó desde uno de cuatro puntos de partida diferentes. El movimiento de los ratones se vigila usando Videotrack Software (View Point). Se ha determinado el tiempo necesario para colocar la plataforma de escape (latencia de escape; hasta 60 segundos). Después de colocar la plataforma, se permitió al ratón sentarse en ella durante 15 segundos. Los ratones que no encontraron la plataforma en 60 segundos fueron guiados a ella y se les dejó estar en ella durante 15 segundos. En el registro se introdujo una latencia de 60 segundos para este caso. Se realizó la media de los cuatro ensayos al día para el análisis estadístico, excepto por el primer ensayo el día 1. El día 9 (5 días después del último entrenamiento), los ratones se han sometido a un ensayo sonda de 60 segundos en el que se retira la plataforma y se deja que los ratones la busquen. El tiempo que cada animal tarda en cada cuadrante se registra (tiempo de búsqueda por cuadrante). Se han usado varios grupos de ratones macho a 3, 7, 10 y 12 meses.

Unos pocos ratones han mostrado un comportamiento de inmovilidad (p. ej., se quedan inmóviles en el agua y rechazan nadar) que interfirió considerablemente en el ensayo; se excluyó a estos animales del análisis de datos.

Todos los ensayos conductuales se realizan en un ambiente tranquilo y con reducción de luz.

Ensayo de la memoria de trabajo en el laberinto de agua con brazos radiales

Esta medida sensible basada en la cognición de la memoria de trabajo se ha obtenido con ayuda del aparato constituido por una piscina llena de agua de 100 cm de diámetro (también usada para el laberinto de agua de Morris y las tareas de reconocimiento de plataforma) equipada con un inserto de aluminio para crear seis brazos de nado distribuidos radialmente. Los ensayos constan de cinco ensayos de 1 minuto por sesión diaria, durante 9-12 días consecutivos. Al principio de cada sesión, se coloca una plataforma transparente sumergida en el extremo de uno de los seis brazos (seleccionado al azar, cambiado a diario). Para cada uno de los primeros cuatro ensayos de adquisición, se introduce al animal en uno de los brazos que no contienen la plataforma (secuencia aleatorizada) y se les deja buscar la plataforma. Durante el ensayo de 60 s, cada vez que el animal entra en otro brazo que no contiene la plataforma, se le devuelve suavemente a su lugar de partida y se registra un error. Después del cuarto ensayo, se deja descansar al animal durante 30 minutos, seguido por un quinto ensayo (retención), que se inicia en el último brazo de nado que contiene la plataforma. El número de errores (elecciones incorrectas del brazo) y la latencia de escape (tiempo para llegar hasta la plataforma, máximo 60 s) se registran para cada ensayo.

Aprendizaje y memoria de referencia espacial en el ensayo de la plataforma circular

Este ensayo de tareas basado en la cognición se realiza con la ayuda del aparato constituido por una plataforma circular de 69 cm que tiene 16 orificios de "escape" espaciados de forma equidistante alrededor de la circunferencia. Se instala un refugio de escape debajo de uno de los agujeros y rodeando a la plataforma una cortina negra, sobre la cual se colocan varias pistas visuales. El animal se coloca en el centro de la plataforma al principio de un único ensayo de 5 minutos y se presentan estímulos de aversión (luces brillantes, aire con ventilador). Se registra el número total de errores (husmeos en los agujeros sin escape) y la latencia del escape (tiempo hasta alcanzar el agujero de escape).

Capacidad de reconocimiento en el ensayo de reconocimiento de la plataforma

Esta tarea de búsqueda basada en la cognición evalúa la capacidad de reconocimiento y de identificación de objetos. El objeto diana consiste en una plataforma circular de 9 cm de diámetro equipada con una enseña negra de 10 cm x 40 cm, que se coloca a 0,8 cm por encima de la superficie del agua en una piscina circular de 100 cm de diámetro. El ensayo consta de cuatro ensayos de 60 s al día en cada uno de cuatro días consecutivos. Cada día, el objeto diana se coloca en un cuadrante diferente de la piscina para cada ensayo y el animal se libera en el mismo lugar a lo largo de la circunferencia de la piscina para los cuatro ensayos. La latencia total (máximo 60 s) se registra para cada ensayo.

Examen de Irwin modificado

Se usa un filtro exhaustivo, modificado de Irwin, para determinar si alguno de los ratones exhibía deterioros

fisiológicos, conductuales o sensorimotoreos relacionado con su genotipo. Para explorar las capacidades motoras, la coordinación y la fuerza muscular, los ratones se colocan en un alambre tensado entre dos columnas de 30 cm de altura y se evalúa su capacidad para mantener el equilibrio sobre el alambre. Además, se determina su capacidad para agarrarse y colgarse del alambre con las cuatro patas durante al menos 5 segundos y de volver a escalar al alambre.

5

Cuantificación del depósito amiloide vascular

Para cuantificar la angiopatía amiloide cerebral (AAC), secciones de 5 μm incluidas en parafina a intervalos de 30 μm a través de las leptomeninges de la corteza cerebelar o parietal se someten a inmunotinción con anticuerpo Ab9 biotinilado (anti-A β 1-16, 1:500) durante la noche a 4 °C (n= 5-7 ratones por genotipo en cada grupo de edad, n= 6 secciones por ratón). Los vasos sanguíneos cargados positivamente se evalúan visualmente usando el sistema de puntuación modificada de Vonsattel (48). La puntuación de la gravedad de AAC se calcula multiplicando el número de vasos AAC con el grado de gravedad de la AAC.

10

Histología: Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia

Ratones Tg y WT de 3 a 12 meses de vida se anestesian y perfunden transcárdialmente de modo secuencial con un 0,9 % de NaCl y un 4 % de paraformaldehído en 0,1 mol/l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,4) o un 10 % de formalina y un 4 % de paraformaldehído en 0,1 mol/l de PBS (pH 7,4). Se extraen los cerebros y las médulas espinales y se almacenan en paraformaldehído al 4 %. Algunas muestras se incluyen en parafina y se cortan en un microtomo de deslizamiento a un espesor de 10 μm . Se cortan criosecciones (14 μm) en un criostat y se montan en portas recubiertos con aluminio—cromo. La peroxidasa endógena se inactiva tratando la sección con metanol que contiene un 0,3 % de H₂O₂ durante 30 minutos. Las secciones se bloquean en un 10 % de suero de caballo. Se usan anticuerpos primarios y se incuban durante la noche a 4 °C en presencia de un 1 % de suero de caballo. Todos los anticuerpos biotinilados o acoplados a fluoresceína, rojo Texas y AMCA, fluorocromos, kit ABC y 3,3'-diaminobencidina como cromógeno para la actividad peroxidasa proceden de Vector Laboratories La incubación con el anticuerpo secundario se realiza a temperatura ambiente durante 1 hora. Todas las etapas de lavado (3-10 minutos) y la dilución del anticuerpo se realizan usando solución salina tamponadas con fosfato (0,1 ml/l de PBS, Ph 7,4) o solución salina tamponada con Tris (0,01 mol/l de Tris, 0,15 mol/l de NaCl, pH 7,4). La incubación con el complejo ABC y la detección con 3,3'-diaminobencidina se llevan a cabo de acuerdo con el manual del fabricante. Se realiza contratinción con hematoxilina de acuerdo con procedimientos convencionales. Para cada determinación se usa un mínimo de tres ratones por genotipo, edad y sexo (49).

15

20

25

30

Preparación de extractos cerebrales

Los cerebros se extraen rápidamente en hielo entre 90 y 120 minutos después de la última inyección y se congelan hasta -80 °C. El hemisferio cerebral derecho de cada ratón se pesa después de congelar. El análisis de la masa del hemisferio por mediana de la desviación absoluta permite a los inventores excluir las muestras con más de 4 desviaciones absolutas con respecto al resto del grupo. Los hemisferios cerebrales se homogeneizan y los lisados cerebrales que contienen la proteína total se preparan de acuerdo con las instrucciones del fabricante para los kits de ensayo enzimático (R&D Systems, Inc.). En resumen, las cortezas cerebrales se homogeneizan en 800 μl de tampón de extracción 1x con bajo contenido en sales (kit de R&D) y se incuban en hielo durante 10 min. Los homogeneizados se centrifugan a 13.000 g durante 15 min a 4 °C. La concentración de proteínas en cada muestra se estima de acuerdo con un ensayo derivado de biuret (Pierce). Los niveles de APP, A β 40 y A β 42 se miden mediante inmunotransferencia de tipo western y técnicas de ELISA de tipo sándwich, respectivamente, como se ha descrito (41). De forma adicional, las actividades de las α -, β - y γ -secretasas se pueden medir en los mismos extractos.

35

40

Ensayo de los niveles de APP total en extractos de corteza cerebral de ratón

Una cantidad de extractos cerebrales con igual proteína se carga en cada gel, 30 μg por calle por muestra. Cada gen contenía ocho tratamientos: control; fármaco 1 dosis de 7,5 mg/kg; y fármaco 2 en varias dosis. Para minimizar la variación intra-gel, cada gel contenía tres grupos de todos los grupos de tratamiento. Cada transferencia se sonda con anticuerpo 22C11. Asimismo, cada transferencia se sonda con el anticuerpo de β -actina para la normalización de la eficiencia de la transferencia. La intensidad de la señal de la banda de APP se normaliza con la de la β -actina. Se cargan dos "controles" de muestra en cada gel/transferencia para someter a ensayo la variación de una transferencia a otra. El análisis de tras transferencias se realiza de dos formas: Por transferencia (n= 3) para analizar la variación de un gel a otro; y transferencias combinadas (n = 9 ó 10) como se ha descrito (50-51). El análisis por transferencia con n= 3 muestra la misma tendencia que el análisis final con n= 9 ó 10. Se presentan los resultados del análisis combinado.

45

50

ELISA de tipo sándwich de A β

Para los ELISAS de A β en el cerebro, se determinan los niveles de A β en el prosencéfalo y el romboencéfalo de forma independiente, el bulbo olfatorio se excluye del análisis. Para el análisis de A β en plasma se obtiene sangre en tubos revestidos con EDTA tras punción cardíaca. Las muestras de sangre se centrifugan a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C y el plasma se alícuota y almacena a -80 °C hasta que se usa. Los niveles de A β se determinan mediante ELISA de tipo sándwich terminal específico usando Ab9 (ab anti-A β 1-16) como el Ab de captura para A β 40, 13.1.1-HRP (Ab anti-AB35-40) como Ab de detección para A β 40, 2.1.3 (Ab anti-A β 35-42) como Ab de captura para A β 42 y Ab9-HRP como Ab de detección para A β 42 (n = 5-7 ratones por genotipo en cada grupo de edad) Los niveles de A β se normalizan a los resultados previos usando los mismos grupos de ratones como controles internos para minimizar la potencial variabilidad del ELISA, como se ha descrito (41).

Transferencia de tipo western

Muestras de prosencéfalo ultracongelado se homogeneizan en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) Boston BioProducts, Worcester, MA) con 1 % de mezcla de inhibidor de la proteasa (Roche). EL homogeneizado se centrifuga a 100.000 x g durante 1 hora a 4 °C. La concentración de proteínas en los sobrenadantes se determina usando el ensayo proteico BCA (Pierce). Las muestras de proteína (20 μ g) se pasan a geles Bis-Tris 12 % XT o geles Bis-Tris 4-12 % XT (Bio-Rad, Hercules, CA) y se transfieren a membranas de nitrocelulosa de 0,2 μ m. Las transferencias se someten a microondas durante 2 min en PBS 0,1M dos veces y se sondan con Ab 82E1 (anti-A β -16, 1:1000; IBL, Gunma, Japón) y 20 aminoácidos en C terminal anti-APP (1:1000) como se ha descrito (41). 1000; IBL, Gunma, Japan) and anti-APP C-terminal 20 amino acids (1: 1000) as described (41). Las transferencias se extraen y se vuelven a sondar con anti- β -actina (1:1000; Sigma) como control de carga. La intensidad relativa de la banda se mide usando el software ImageJ.

Cuantificación del depósito amiloide parenquimatoso

Hemicerebros se fijan en inmersión en 10 % de formalina y se procesan para incluir en parafina. Las secciones de tejido cerebral (5 μ m) se inmunotiñeron con anticuerpo (Ab) anti-A β total. Las secciones se someten a contratinción con hematoxilina. Seis secciones por cerebro desde el hipocampo, la corteza piriforme (bregma, -1,70 a -2,80 mm), o cerebelo (parafloclulo, cruz ansiforme y lóbulos simples; bregma -5,40 a -6,36 mm) se usan para cuantificación (n = 5-7 ratones por genotipo en cada grupo de edad). La carga de la placa de A β se determina usando el software MetaMorph (Molecular Devices, Palo Alto, CA). Para la cuantificación de las placas nucleadas se tiñen secciones seriadas de las analizadas para la carga de A β con tioflavina S (TioS) y se cuenta el número de placas positivas pata TioS en el hipocampo, corteza entorina/piriforme o el cerebelo. Todos los análisis anteriores se realizan de forma enmascarada.

Análisis estadístico de los datos in vivo.

Los resultados de todos los experimentos se analizan con STATISTICA 8.0 (Statsoft).

Los niveles de A β , la carga de la placa amiloide y la gravedad de AAC se analizaron usando un ANOVA con el ensayo post hoc de comparación múltiple de Holm-Sidak o dos pruebas t de Student. Si el conjunto de datos no cumple las suposiciones del ensayo paramétrico, se realiza bien el ensayo de Kruskal-Wallis, seguido por la comparación múltiple post hoc de Duna o la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Para analizar si los niveles de A β en los ratones bitransgénicos eran consistentes con una suma aditiva de los niveles de A β en los hermanos transgénicos se usa un ensayo de regresión lineal múltiple sin intersección. Todas las comparaciones se realizan entre hermanos de camada.

La modelización de la respuesta al fármaco se realiza excluyendo las muestras control (0 mg/kg). La DE50 corresponde a la dosis requerida (mg/kg) para inducir un 50 % de la respuesta máxima inducida por fármaco en los experimentos. Se calcula usando el modelo de ecuación de Hill para el log de la DE50.

Bibliografía

1. Crook R., Verkoniemi A, y col. (1998). A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med.* 4(4): 452-5.
- 5 2. Houlden H., Baker M., y col. (2000). Variant Alzheimer's disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques is caused by PS-1 mutations that lead to exceptionally high amyloid-beta concentrations. *Ann Neural.* 48(5): 806-8.
- 10 3. Kwok J.B., Taddei K., y col. (1997). Two novel (M233T and R278T) presenilin-1 mutations in early-onset Alzheimer's disease pedigrees and preliminary evidence for association of presenilin-1 mutations with a novel phenotype. *Neurarepart.* 8(6): 1537-42.
4. Verkoniemi A, Kalimo H., y col. (2001). Variant Alzheimer disease with spastic paraparesis: neuropathological phenotype. *J Neurapathol Exp Neural.* 60(5): 483-92.
5. Citron M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5(9): 677-85.
- 15 6. Suh Y.H. and Checler F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev.* 54(3): 469-525.
7. Blacker D., Albert M.S., y col. (1994). Reliability and validity of NINCDS-ADRDA criteria for Alzheimer's disease. The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Arch Neural.* 51(12): 1198-204.
8. Rossor M.N., Fox N.C., y col. (1996). Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neuradegeneration.* 5(4): 393-7.
- 20 9. Glenner G.G., Wong C.W., y col. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol.* 2(6): 357-69.
10. Ballatore C., Lee V.M., y col. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8(9): 663-72.
- 25 11. Bell K.F. and Claudio Cuello A (2006). Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 545(1): 11-21.
12. Hardy J.A. and Higgins G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256(5054): 184-5.
13. Braak H. and Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neurapathol.* 82(4): 239-59.
- 30 14. Golde T.E. (2005). The Abeta hypothesis: leading us to rationally-designed therapeutic strategies for the treatment or prevention of Alzheimer disease. *Brain Pathol.* 15(1): 84-7.
15. Hardy and Selkoe D.J (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297(5580): 353-6.
- 35 16. Selkoe D.J. (2000). The genetics and molecular pathology of Alzheimer's disease: roles of amyloid and the presenilins. *Neural Clin.* 18(4): 903-22.
17. Gorlach A, Klappa P., et al. (2006). The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal.* 8(9-10): 1391-418.
18. Verkhratsky A (2004). Endoplasmic reticulum calcium signaling in nerve cells. *Biol Res.* 37(4): 693-9.
- 40 19. Copanaki E., Schiirmann T., et al. (2007). The amyloid precursor protein potentiates CHOP induction and cell death in response to ER Ca²⁺ depletion. *Biochim Biophys Acta.* 1773(2):157-65.
20. Chan S.L., Mayne M., et al. (2000). Presenilin-1 mutations Increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J Biol Chem.* 275(24): 18195-200.
21. Supnet c., Grant 1., et al. (2006). Amyloid-beta-(1-42) increases ryanodine receptor-3 expression and function

- in neurons of TgCRND8 mice. *J Biol Chem.* 281(50): 38440-7.
22. Guo Q., Fu W., et al. (1999). Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nat Med.* 5(1):101-6.
- 5 23. LaFerla F.M. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling III Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 3(11): 862-72.
24. Wong H.K., Sakurai T., et al. (2005). α -Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE1) and γ -secretase. *J Biol Chem.* 280(24):23009-17.
- 10 25. Lippa C.F., Schmidt M.L., et al. (1999). Antibodies to alpha-synuclein detect Lewy bodies in many Down's syndrome brains with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 45(3) 353-7.
26. Hamilton R.L. (2000). Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain Pathol.* 10(3): 378-84.
27. Morelli L., Llovera R., et al. (2003). Differential degradation of amyloid beta genetic variants associated with hereditary dementia or stroke by insulin degrading enzyme. *J Biol Chem.* 278(26):23221-6
- 15 28. Lee D.S., Tomita S., et al. (2000). Regulation of X11L-dependent amyloid precursor protein metabolism by XB51, a novel X11L-binding protein. *J Biol Chem.* 275(30): 23134-8.
29. Mueller H.T., Borg J.P., et al. (2000). Modulation of amyloid precursor protein metabolism by X11alpha /Mint-I. A deletion analysis of protein-protein interaction domains. *J Biol Chem.* 275(50): 39302-6.
- 20 30. Cookson M.R. (2003). Neurodegeneration: how does parkin prevent Parkinson's disease? *Curr Biol.* 13(13): R522-4.
31. Mazanetz M.P. and Fischer P.M. (2007). Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 6(6): 464-79.
32. Churcher I. (2006). Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem.* 6(6): 579-95.
- 25 33. Sze C.I., Su M., et al. (2004). Down-regulation of WW domain-containing oxidoreductase induces Tau phosphorylation in vitro. A potential role in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 279(29): 30498-506.
34. Walchli S., Curchod M.L., et al. (2000). Identification of tyrosine phosphatases that dephosphorylate the insulin receptor. A brute force approach based on "substratetrapping" mutants. *J Biol Chem.* 275(13):9792-6.
- 30 35. Chang N.S., Doherty J., et al. (2003). JNK1 physically interacts with WW domaincontaining oxidoreductase (WOX1) and inhibits WOX1-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 278(11):9195-202.
36. D'Orazi G., Cecchinelli S., et al. (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol.* 4(1): 11-9.
37. Zhu H., Wu L., et al. (2003). MDM2 and promyelocytic leukemia antagonize each other through their direct interaction with p53. *J Biol Chem.* 278(49):49286-92.
- 35 38. Rodrigues S., De Wever O., et al. (2007). Opposing roles of netrin-1 and the dependence receptor DCC in cancer cell invasion, tumor growth and metastasis. *Oncogene.* 26(38):5615-25.
39. Arakawa H. (2004). Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 4(12):978-87.
- 40 40. Taniguchi Y, Kim S.H., et al. (2003). Presenilin-dependent "gamma secretase" processing of deleted in colorectal cancer (DcC). *J Biol Chem.* 278(33):30425-8.
41. Lahiri D.K. et al. (2007) Experimental Alzheimer's Disease Drug Posiphen[(Phenserine] Lowers Amyloid-betaPeptide Levels in Cell Culture and Mice. *Journal of Pharmacology and experimental therapeutics* 320: 386-396.
42. Sang Tae KIM, et al. (2006) Neuroprotective Effect of Some Plant Extracts in Culture Cn05-Induced PC12 Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29(10) 2021-2024

43. McGowan E., et al. (2005) A β 42 Is Essential for Parenchymal and Vascular Amyloid Deposition in Mice. *Neuron* 47: 191-199.
44. Leighty R.E. et al. (2008) Use of artificial neural networks to determine cognitive impairment and therapeutic effectiveness in Alzheimer's transgenic mice. *Journal of Neuroscience Methods* 167: 358-366
- 5 45. Ashe KH (2001) Learning and memory in transgenic mice modelling Alzheimer's disease. *Learning and Memory* 8: 301-308.
46. Carlson GA, et al. (1997) Genetic modification of the phenotypes produced by amyloid precursor protein overexpression in transgenic mice. *Human Molecular Genetics* 6:1951-1959.
- 10 47. Hsiao K, et al. (1996) Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 99-102.
48. Greenberg S.M." and Vonsattel J.P. (1997) Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy. Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke* 28(7): 1418-22
- 15 49. Schindowski K. et al. (2006) Alzheimer's Disease-Like Tau Neuropathology Leads to Memory Deficits and Loss of Functional Synapses in a Novel Mutated Tau Transgenic Mouse without Any Motor Deficits. *Am J Pathol.* 169: 599-616.
50. Lahiri DK, et al. (2004) Dietary supplementation with melatonin reduces levels of amyloid beta-peptides in the murine cerebral cortex. *Journal of Pineal Research* 36:224-231.
51. Basha MR, et al. (2005) The fetal basis of amyloidogenesis: exposure to lead and latent overexpression of amyloid precursor protein and beta amyloid in the aging brain. *Journal of Neuroscience* 25: 823-829.

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende sulfisoxazol, o sal, o una formulación de liberación sostenida del mismo, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 5 2. La composición para uso de la reivindicación 1, que comprende además al menos un compuesto escogido del grupo constituido por acamprosato, amlodipino, cilostazol, leflunomida, metimazol, fenformina, prilocaína, tadalafilo, terbinafina, zonisamida y rifabutina, sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para administración combinada, por separado o secuencial de sulfisoxazol.
3. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 4. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha composición se administra repetidamente al enfermo.
5. Una composición que comprende sulfisoxazol, o una sal, o una formulación de liberación sostenida del mismo, para uso para proteger las neuronas contra el efecto tóxico de péptido Abeta en un enfermo que tiene enfermedad de Alzheimer.

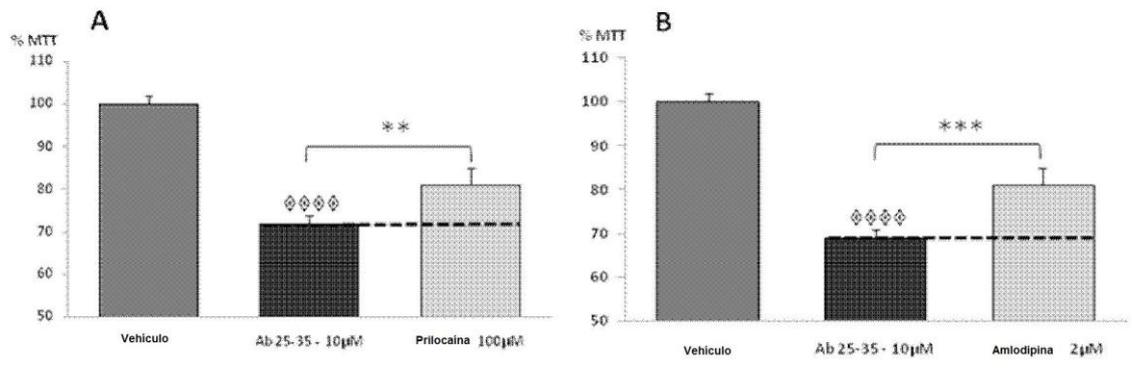


FIGURA 1

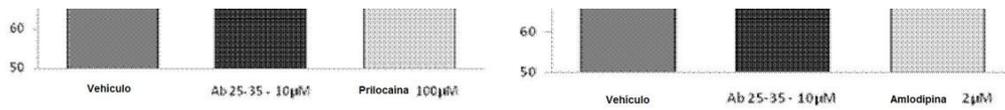


FIGURA 1

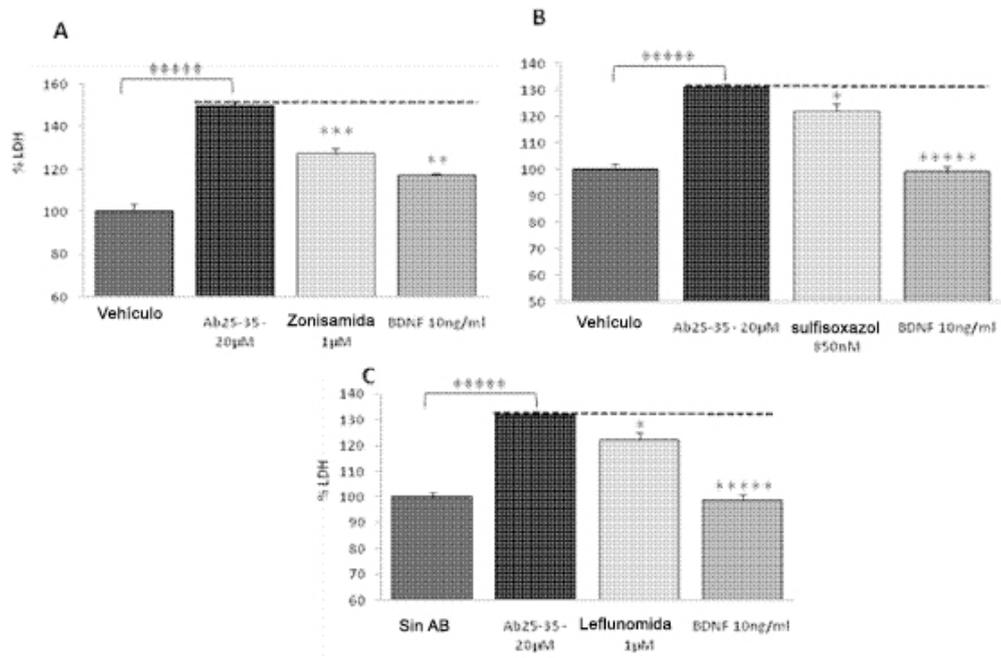


FIGURA 2