

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 296**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/41** (2006.01)

**A61K 31/4178** (2006.01)

**A61K 31/4184** (2006.01)

**A61K 31/454** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2008 E 08765314 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2174666**

54 Título: **Agente medicinal para el tratamiento de trastornos de la circulación cerebral o del flujo sanguíneo cerebral inducidos por beta amiloide**

30 Prioridad:

**22.06.2007 JP 2007165071**

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

**07.03.2014**

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (50.0%)**  
**3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku**  
**Tokyo 103-8426, JP y**  
**OSAKA UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MORISHITA, RYUICHI;**  
**SATO, NAOYUKI y**  
**TAKEDA, SHUKO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 446 296 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

Agente medicinal para el tratamiento de trastornos de la circulación cerebral o del flujo sanguíneo cerebral inducidos por beta amiloide

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a un medicamento para el tratamiento de trastornos de la circulación cerebral o del flujo sanguíneo cerebral inducidos por el  $\beta$ -amiloide que comprende un bloqueador del receptor de angiotensina II como principio activo.

**Técnica Antecedente**

- 10 Todavía no se ha desarrollado un protocolo de tratamiento fundamental para la enfermedad de Alzheimer. Sólo se usan de forma paliativa inhibidores de la colinesterasa y similares. Además, todavía no se han descubierto medicamentos que parezcan ser eficaces en la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

- 15 Recientemente, se ha hecho evidente que los factores de riesgo vasculares están profundamente implicados en la patología subyacente no sólo de la demencia vascular, sino también de la enfermedad de Alzheimer; entre todos, la hipertensión es considerada como un factor crucial (Documento no de patente 1). Algunas pruebas clínicas han sugerido que en parte el antagonista de calcio y el inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ambos son fármacos antihipertensivos) pueden ser capaces de inhibir la aparición de la enfermedad de Alzheimer (Documento no de patente 2). Con respecto al bloqueador del receptor de angiotensina II (BRA), todavía no se ha descrito su eficacia para la enfermedad de Alzheimer.

- 20 Documento no de patente 1: Launer LJ et al., Neurology 52:78, 1999  
Documento no de patente 2: Forette F et al., Lancet 352:1347, 1998

- 25 Tsukuda K et al., Japanese Journal of Geriatrics, vol.44, 20 de mayo de 2007, 129 informaron sobre los efectos de la administración del BRA olmesartán a ratones alimentados con una dieta con un alto contenido en sal y grasas y llegaron a la conclusión de que olmesartán inhibe el deterioro cognitivo debido a un alto contenido de sal y grasas en la dieta.

El documento WO 2007/112288 publicado el 4 de octubre de 2007 divulga olmesartán medoxomilo para su uso en la reducción de la generación de A  $\beta$ 1-40 y A  $\beta$ 1-42.

- 30 Los presentes inventores examinaron el efecto terapéutico de olmesartán administrado por vía oral utilizando un modelo de ratón llamado "modelo de inyección A $\beta$ " que inicia el deterioro cognitivo después de la administración aguda de  $\beta$ -amiloide (un agente causal probable de la enfermedad de Alzheimer) en el ventrículo lateral (Fig. 1). Para la evaluación de la función cognitiva, se utilizó la "prueba del laberinto acuático de Morris", que evalúa la memoria de referencia espacial. En los ratones que habían recibido la administración oral de olmesartán durante cuatro semanas de antelación, el deterioro cognitivo observado en este modelo se había mejorado (Figs. 3 a 6). Se sugirió que este efecto es especialmente significativo con el nivel de dosis de olmesartán 1 mg/kg/día o menos, en el que no se produce una disminución excesiva de la presión arterial (Figuras 3 a 6). Dado el mecanismo de este efecto terapéutico, los inventores creen que se ha mejorado la actividad cerebrovascular alterada por el  $\beta$ -amiloide probablemente debido al efecto antioxidante, etc. de olmesartán) y que la circulación cerebral mejorada aumentaba la excreción del  $\beta$ -amiloide del cerebro (Figuras 19 a 21).

La presente invención puede resumirse de la siguiente manera.

- 40 (1) Ácido 4-(1-Hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il)fenil]fenil]-metilimidazol-5-carboxílico o 4-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il)fenil]fenil]metilimidazol-5-carboxilato de (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo para su uso en el tratamiento de trastornos de la circulación cerebral o del flujo sanguíneo cerebral inducidos por el  $\beta$ -amiloide.

- 45 (2) Una composición que comprende ácido 4-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il)fenil]fenil]-metilimidazol-5-carboxílico o 4-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il)fenil]fenil]metilimidazol-5-carboxilato de (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo como un principio activo, para su uso en el tratamiento de trastornos de la circulación cerebral o del flujo sanguíneo cerebral inducidos por el  $\beta$ -amiloide.

- 50 (3) El uso del ácido 4-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il)fenil]fenil]-metilimidazol-5-carboxílico o 4-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il)fenil]fenil]metilimidazol-5-carboxilato de (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de la circulación cerebral o del flujo sanguíneo cerebral inducidos por el  $\beta$ -amiloide.

Los presentes inventores han demostrado la posibilidad de que olmesartán, un tipo de bloqueador del receptor de angiotensina II, pueda mejorar el deterioro cognitivo en un modelo de la enfermedad de Alzheimer en ratón. Además, dado que este fármaco (olmesartán) se ha usado clínicamente como un fármaco antihipertensivo, hay que

resaltar que los pacientes con enfermedad de Alzheimer tendrán pocos problemas en términos de seguridad al recibir la administración oral de este fármaco

**Efecto de la invención**

5 De acuerdo con la presente invención, se hace posible proporcionar un medicamento útil en el tratamiento de trastornos de la circulación cerebral o del flujo sanguíneo cerebral inducidos por el  $\beta$ -amiloide.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra el calendario experimental del Ejemplo de Ensayo 1.  
 La Figura 2 muestra los cambios en la presión arterial provocados por la administración de olmesartán en el Ejemplo de Ensayo 1.  
 10 La Figura 3 muestra los resultados de la prueba de la plataforma escondida en el Ejemplo de Ensayo 1.  
 La Figura 4 muestra los resultados de la prueba de la plataforma visible en el Ejemplo de Ensayo 1.  
 La Figura 5 muestra los resultados de la prueba de la sonda en el Ejemplo de Ensayo 1.  
 La Figura 6 muestra los resultados del cruce del anillo en el Ejemplo de Ensayo 1.  
 La Figura 7 muestra el calendario experimental en el Ejemplo de Ensayo 2.  
 15 La Figura 8 muestra los cambios en la presión arterial provocados por la administración de olmesartán o hidralazina en el Ejemplo de Ensayo 2.  
 La Figura 9 muestra los resultados de la prueba de la plataforma escondida en el Ejemplo de Ensayo 2.  
 La Figura 10 muestra los resultados de la prueba de la plataforma visible en el Ejemplo de Ensayo 2.  
 La Figura 11 muestra los resultados de la prueba de la sonda en el Ejemplo de Ensayo 2.  
 20 La Figura 12 muestra los resultados del cruce del anillo en el Ejemplo de Ensayo 2.  
 La Figura 13 muestra la velocidad de nado de cada grupo en el Ejemplo de Ensayo 2.  
 La Figura 14 muestra los resultados de la retención a largo plazo en el Ejemplo de Ensayo 2.  
 La Figura 15 muestra los resultados de la tarea de memoria de trabajo en el Ejemplo de Ensayo 2.  
 La Figura 16 muestra los resultados de la prueba en campo abierto en el Ejemplo de Ensayo 2.  
 25 La Figura 17 es un gráfico circular que muestra los porcentajes de las diversas enfermedades causantes de demencia.  
 La Figura 18-1 muestra las huellas de respuesta del PEPS (potencial excitatorio posináptico) de campo antes y 60 min después de la estimulación tetánica en el Ejemplo de Ensayo 3.  
 La Figura 18-2 muestra la evolución en el tiempo promedio de los valores de la pendiente de potencial de campo  
 30 en el Ejemplo de Ensayo 3.  
 La Figura 18-3 muestra los valores de la pendiente de potencial de campo tomados 50-60 minutos después de la estimulación tetánica en el Ejemplo de Ensayo 3.  
 La Figura 19-1 es un diagrama esquemático que muestra que la actividad neuronal se evoca en la corteza somatosensorial por la estimulación de los bigotes realizada en el Ejemplo de Ensayo 3.  
 35 La Figura 19-2 muestra la respuesta en LCR a la estimulación de los bigotes en el Ejemplo de Ensayo 3.  
 La Figura 20-1 es un diagrama esquemático que muestra el procedimiento experimental para el seguimiento del flujo sanguíneo cerebral en el Ejemplo de Ensayo 3 (vista general).  
 La Figura 20-2 es un diagrama esquemático que muestra el procedimiento experimental para el seguimiento del flujo sanguíneo cerebral en el Ejemplo de Ensayo 3 (vista ampliada del cerebro).  
 40 La Figura 20-3 muestra la relación entre el LCR y la PAM (presión arterial media) en el Ejemplo de Ensayo 3.  
 La Figura 21 muestra el mecanismo de acción de olmesartán como se supone a partir de los resultados del Ejemplo de Ensayo 3.  
 45 Preferiblemente, el bloqueador del receptor de angiotensina II es olmesartán medoxomilo. En particular, olmesartán medoxomilo se puede preparar fácilmente de acuerdo con el procedimiento descrito, por ejemplo, en la patente japonesa N° 2082519 (Patente de Estados Unidos N° 5.616.599).

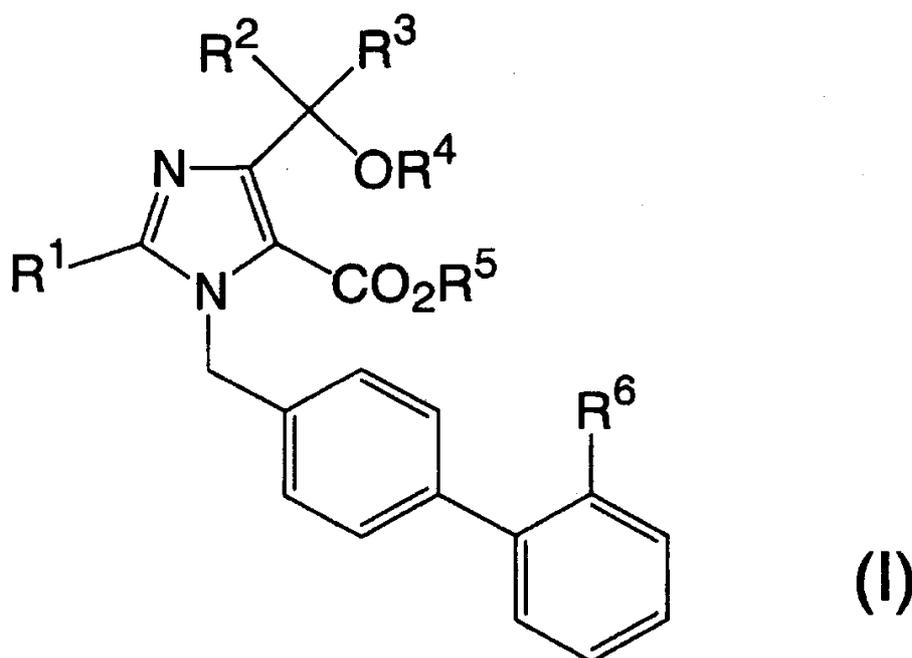


Tabla 1

Compuesto nº	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>
29	Pr	Me	Me	H	H	Tz
37	Pr	Me	Me	H	Mod	Tz

Las abreviaturas usadas en la Tabla anterior indican los siguientes grupos.

Me: grupo metilo

Mod: grupo (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo

Pr: grupo propilo

Tz: grupo tetrazol-5-ilo

Compuesto Ilustrado nº 29: ácido 4-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il)fenil]fenil]metilimidazol-5-carboxílico (denominación japonesa: olmesartán), y

- 5 Compuesto Ilustrado nº 37: 4-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il) fenil]fenil]metil-imidazol-5-carboxilato de (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo (nombre japonés: olmesartán medoxomilo).

Olmesartán medoxomilo (compuesto ilustrado nº 37) es un profármaco de olmesartán (compuesto ilustrado nº 29), en el que el ácido carboxílico de la posición 5 del anillo de imidazol es el éster medoxomilo. Tras la administración oral, este profármaco es hidrolizado por esterasas, principalmente en el epitelio del intestino delgado y, por lo tanto, es convertido en la forma activa olmesartán.

El compuesto (I) que es el principio activo de la presente invención, las sales farmacológicamente aceptables del mismo y los ésteres farmacológicamente aceptables del mismo son conocidos (véase, por ejemplo, la publicación de patente japonesa no examinada nº Hei 5-78328) o se pueden preparar por procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, la publicación de patente japonesa no examinada nº Hei 5-78328).

- 15 Según la presente invención, el medicamento de la presente invención se utiliza para mejorar trastornos de la circulación cerebral o del flujo sanguíneo cerebral inducidos por el  $\beta$ -amiloide. Además, el medicamento de la presente invención se puede usar en el tratamiento de la disfunción cerebral inducida por  $\beta$ -amiloide incluyendo la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa. Un hallazgo patológico característico, las denominadas placas seniles, se observan en muestras cerebrales de autopsias de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Se sabe que el componente principal de estas placas seniles es una proteína llamada amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ) y se presume que el  $A\beta$  es un agente causal de la enfermedad de Alzheimer. Recientemente, los estudios epidemiológicos han demostrado que la presencia de hipertensión arterial en personas de mediana edad es un factor de riesgo independiente para la enfermedad de Alzheimer y los ensayos clínicos a gran escala han revelado que el tratamiento antihipertensivo reduce el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, se ha sugerido la posibilidad de que la hipertensión esté profundamente implicada en la patología subyacente de la enfermedad de Alzheimer.

- 5 Como se muestra en los Ejemplos descritos más adelante, el medicamento de la presente invención es capaz de mejorar la disfunción/deterioro que induce el  $\beta$ -amiloide, por ejemplo, el deterioro de la memoria espacial y los trastornos cerebrovasculares tales como los trastornos de la circulación cerebral/flujo sanguíneo cerebral. Además, el efecto de mejora de la disfunción/deterioro del medicamento de la presente invención no se limita a su acción sobre la disfunción/deterioro inducido por el  $\beta$ -amiloide.
- 10 Dado que el bloqueador del receptor de angiotensina II descrito anteriormente se administra generalmente por vía oral, es deseable administrar el medicamento de la presente invención por vía oral. Sin embargo, la vía de administración del medicamento de la presente invención no se limita a la administración oral. También se puede administrar por vía parenteral, tal como por vía intravenosa, intrarrectal, percutánea, transmucosa o por vía subcutánea. Ejemplos de formas farmacéuticas adecuadas para la administración oral incluyen, pero no se limitan a, polvo, gránulos, comprimidos y cápsulas. En la preparación de la forma farmacéutica unitaria, se pueden usar apropiadamente aditivos farmacológicamente aceptables para la formulación tales como excipientes, lubricantes, aglutinantes, disgregantes, emulsionantes, estabilizantes, correctivos o diluyentes.
- 15 Ejemplos de "excipientes" que se pueden usar incluyen: excipientes orgánicos que incluyen derivados de azúcar tales como lactosa, sacarosa, glucosa, manitol o sorbitol; derivados de almidón tales como almidón de maíz, almidón de patata,  $\alpha$ -almidón o dextrina; derivados de celulosa tales como celulosa microcristalina; goma arábica; dextrano y pululano, y excipientes inorgánicos que incluyen derivados de silicato tales como anhídrido de ácido silícico ligero, silicato de aluminio sintético, silicato de calcio o aluminometasilicato de magnesio; fosfatos tales como hidrógenofosfato de calcio; carbonatos tales como carbonato de calcio y sulfatos tales como sulfato de calcio .
- 20 Ejemplos de "lubricantes" que se pueden usar incluyen: ácido esteárico; sales metálicas del ácido esteárico tales como estearato de calcio y estearato de magnesio; talco, sílice coloidal; ceras tales como cera de abejas y esperma de ballena; ácido bórico, ácido adipico; sulfatos tales como sulfato de sodio; glicol; ácido fumárico; benzoato de sodio; DL-leucina; lauril sulfatos tales como lauril sulfato de sodio o lauril sulfato de magnesio; silicatos tales como anhídrido silícico e hidrato silícico y los derivados de almidón descritos anteriormente.
- 25 Ejemplos de "aglutinantes" que se pueden usar incluyen: hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, macrogol y compuestos similares a los excipientes descritos anteriormente.
- 30 Ejemplos de "disgregantes" que se pueden usar incluyen: derivados de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio o carboximetilcelulosa de sodio internamente reticulada; polivinilpirrolidona reticulada y derivados de almidón/celulosa modificados químicamente, tales como carboximetilalmidón o carboximetilalmidón de sodio.
- 35 Ejemplos de "emulsionantes" que se pueden usar incluyen: arcilla coloidal tal como la bentonita o Veegum; hidróxidos metálicos tales como hidróxido de magnesio o hidróxido de aluminio; tensioactivos aniónicos tales como lauril sulfato de sodio o estearato de calcio; tensioactivos catiónicos tales como cloruro de benzalconio, y agentes tensioactivos no iónicos tales como polioxietilenaalquiléter, éster de ácido graso de sorbitán de polioxietileno o ésteres de sacarosa de ácidos grasos.
- Ejemplos de "estabilizadores" que se pueden usar incluyen: ésteres de p-hidroxibenzoato, tales como metilparabeno o propilparabeno, alcoholes tales como clorobutanol, alcohol bencílico o alcohol feniletílico; cloruro de benzalconio; fenoles tales como fenol o cresol; timerosal; ácido deshidroacético y ácido sórbico.
- 40 Ejemplos de "correctivos" que se pueden usar incluyen: edulcorantes, tales como sacarina de sodio o aspartamo; acidificantes tales como ácido cítrico, ácido málico o ácido tartárico y sabores tales como mentol, limón o naranja.
- Ejemplos de "diluyentes" que se pueden usar incluyen los diluyentes utilizados convencionalmente, tales como, lactosa, manitol, glucosa, sacarosa, sulfato de calcio, fosfato de calcio, hidroxipropilcelulosa, celulosa microcristalina, agua, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, glicerol, almidón, polivinilpirrolidona, aluminometasilicato de magnesio y mezclas de estos compuestos.
- 45 Las dosis del medicamento de la presente invención pueden seleccionarse apropiadamente dependiendo de varios factores tales como la vía de administración, el tipo de principio activo, la edad, el peso corporal o los síntomas del paciente, el propósito de la administración, etc. Generalmente, el medicamento de la presente invención se administra a un nivel dentro de un intervalo desde el límite inferior de 0,08 mg/kg (preferiblemente 0,33 mg/kg, más preferiblemente 0,50 mg/kg) por día hasta el límite superior de 1,13 mg/kg (preferiblemente 1,0 mg/kg) por día. Esta dosis puede administrarse una vez o 2 a 6 veces al día dependiendo de los síntomas.
- 50 El medicamento de la presente invención se puede utilizar en combinación con otras preparaciones que son eficaces contra la enfermedad objetivo (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). Por ejemplo, se puede utilizar junto con clorhidrato de donepezilo que es eficaz para la enfermedad de Alzheimer.

## Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los Ejemplos de Ensayo y Ejemplos de Preparación. Sin embargo, el alcance de la presente invención no se limita a estos Ejemplos

### Materiales

5  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) 1-40 y A $\beta$  40-1 (Peptide Institute, Inc.)  
\* A $\beta$  40-1 tiene una secuencia inversa a la de A $\beta$  1-40. Este se utilizó como un péptido de control. Ratón ddY (CLEA Japan, Inc.)

Olmesartán medoxomilo (Daiichi Sankyo Company, Limited)

Hidralazina (Sigma)

## 10 **Ejemplo de ensayo 1**

### Procedimientos

El efecto terapéutico de olmesartán medoxomilo en el modelo de inyección de A $\beta$  y la dependencia de la dosis del mismo se examinaron de acuerdo con el siguiente esquema experimental. [Programa Experimental]: Antes del experimento, se administró a ratones ddY machos de 8 semanas de edad olmesartán medoxomilo (0,5 mg/kg/día, 1 mg/kg/día, 3 mg/kg/día o 6 mg/kg/día) o agua destilada por vía oral durante cuatro semanas (días -28 a -1). A continuación, se administró A $\beta$  1-40 a los ratones por vía intracerebroventricular (día 0). (Aunque el A $\beta$  1-40 se administró en uno de los ventrículos laterales en el documento WO 2006/059777, A $\beta$  1-40 se administró en el Ejemplo de Ensayo 1 en los dos ventrículos laterales con un intervalo de un día entre las dos administraciones. A excepción de este punto, la administración de A $\beta$  1-40, se realiza de la misma manera que en el documento WO 2006/059777). Una semana después, se realizó una prueba de comportamiento para evaluar la función cognitiva (prueba del laberinto acuático de Morris; Morris R et al., J Neuroscience Methods 1984, 11, 47-60) (días 7 a 12). Como control negativo, a los ratones que habían recibido administración oral de agua destilada durante cuatro semanas se les administró por vía intracerebroventricular A $\beta$  40-1. La administración de olmesartán medoxomilo o el agua destilada se continuó hasta el final de la prueba de comportamiento. Las mediciones se realizaron como se describe a continuación.

Prueba de la plataforma escondida: Se coloca una plataforma por debajo de la superficie del agua de una piscina de agua de 150 cm de diámetro, rellena con agua de color blanco. Los ratones se liberan en el agua y se mide el tiempo que tardan en llegar a la plataforma. Este ensayo se realiza tres veces al día y durante cinco días consecutivos. A medida que aprenden, los ratones son capaces de llegar a la plataforma más rápidamente cada día.

30 Prueba de la plataforma visible: Los ratones se liberan en el agua en unas condiciones tales que puedan ver la plataforma. Se mide el tiempo que tardan en llegar a la plataforma. Prueba de la sonda: Se retira la plataforma y se libera a los ratones de modo que puedan nadar libremente. Los ratones con un buen aprendizaje/memoria nadan en el cuadrante donde se encontraba la plataforma a la búsqueda de la plataforma. Se mide el tiempo que pasaron en ese cuadrante. Cruce del anillo: Se cuenta el número de veces que los ratones cruzaron la plataforma en la prueba de la sonda.

Además, se realizó la evaluación de la presión arterial por el procedimiento del manguito en la cola (utilizando un esfigmomanómetro enrollado alrededor de la cola del ratón) (Bunag RD, J Lab Clin Med. 1971, 78, 957-62). Inmediatamente antes del comienzo de la administración de olmesartán medoxomilo o agua destilada (día -30), inmediatamente antes (día -1) e inmediatamente después (día 2) de la administración intracerebroventricular de A $\beta$  y después de la finalización de la prueba de comportamiento (día 14) (véase Fig. 1).

### Resultados

– Presión arterial: No se observaron diferencias entre los grupos en la presión arterial antes de iniciar la administración de olmesartán medoxomilo o agua destilada (día -30). Después de 4 semanas de administración (día -1), la presión arterial en los grupos a los que se había administrado olmesartán medoxomilo se redujo significativamente en comparación con el grupo de administración de agua destilada. Incluso el grupo con la dosis más baja de olmesartán medoxomilo (0,5 mg/kg/día) mostró una disminución significativa en la presión arterial. Una tendencia similar se observó en las mediciones llevadas a cabo inmediatamente después de la administración de A $\beta$  (día 2) y después de la finalización de la prueba de comportamiento (día 14) (véase Fig. 2).

50 – Función cognitiva: Se confirmó en la prueba de la plataforma escondida que la latencia de escape era significativamente mayor en el grupo de administración de A $\beta$  1-40 (●) que en el grupo de administración de A $\beta$  40-1 (■) en el día 4 y 5 después del comienzo del aprendizaje (sesión 4 y 5) y que el primer grupo tenía deterioro en la memoria espacial y la capacidad de aprendizaje. Sin embargo, esta disfunción mejoró significativamente en el grupo de administración de olmesartán medoxomilo de 0,5 mg/kg/día ( $\Delta$ ), grupo de administración de 1,0 mg/kg/día (A) y grupo de administración de 3,0 mg/kg/día (○) (véase la Fig. 3). En la prueba de la plataforma visible, no se observó ninguna diferencia significativa en la latencia de escape entre los grupos, por lo tanto, se

confirmó que no había ninguna diferencia en los factores de confusión (véase la Fig. 4). En la prueba de la sonda, el tiempo que los ratones pasaron en el cuadrante objetivo fue significativamente menor en el grupo de administración de A $\beta$  1-40 (●) en comparación con el grupo de administración de A $\beta$  40-1 (■). Sin embargo, este había mejorado significativamente en el grupo de administración de olmesartán medoxomilo de 0,5 mg/kg/día ( $\Delta$ ) y en el grupo de administración de 1,0 mg/kg/día ( $\blacktriangle$ ) (véase la Fig. 5). El número de cruces del anillo tendió a ser menor en el grupo de administración de A $\beta$  1-40 (●) que en el grupo de administración de A $\beta$  40-1 (■), pero esto mejoró significativamente en el grupo de administración de olmesartán medoxomilo 1,0 mg/kg/día ( $\blacktriangle$ ) (véase Fig. 6). A partir de estos resultados, se confirmó que en la prueba del laberinto acuático de Morris, el deterioro en la memoria espacial y del aprendizaje provocados por la administración intracerebroventricular de A $\beta$  1-40 mejoraron significativamente en los grupos de administración de olmesartán medoxomilo. Se puede decir que este efecto se observó en los grupos de dosis bajas de olmesartán medoxomilo (0,5 a 1 mg/kg/día), pero que no se observó en los grupos de dosis altas (3-6 mg/kg/día).

## Ejemplo de ensayo 2

### Procedimientos

Con el fin de examinar si el efecto de mejora sobre la función cognitiva conseguido con la administración oral de olmesartán medoxomilo (Ejemplo de Ensayo 1) era debido a la reducción de la presión arterial *per se* o no, se realizó un experimento similar utilizando el grupo de administración de hidralazina como un control hipotensor (véase la Fig. 7). La dosis de olmesartán medoxomilo se fijó en un nivel bajo de 1 mg/kg/día en vista de los resultados experimentales del Ejemplo de Ensayo 1. Por otro lado, se confirmó a partir de los resultados de un experimento piloto que la dosis de hidralazina que produce un nivel comparable de reducción de la presión arterial es de 30 mg/kg/día. Como pruebas de comportamiento para evaluar la función cognitiva, se realizaron las pruebas del laberinto acuático de Morris del Ejemplo de Ensayo 1 (prueba de la plataforma escondida, prueba de la plataforma visible y prueba de la sonda) y, además, también se realizó una prueba de campo abierto. Además, en las pruebas del laberinto acuático de Morris se examinaron también la retención a largo plazo, la tarea de memoria de trabajo y la velocidad de natación. Las mediciones se realizaron como se describe a continuación.

Prueba de campo abierto: Se utiliza una caja cúbica (30 x 30 x 30 cm). En cada sector X e Y de la zona de campo abierto, se sujetan dos haces infrarrojos 2 cm por encima del suelo en un intervalo de 10 cm. Se cuenta el número de intercepciones sucesivas por el sujeto de los dos haces adyacentes en cada banco como índice de locomoción.

Retención a largo plazo: El día 12 después de la finalización de la prueba de la plataforma escondida como una prueba de laberinto acuático, los ratones se liberan en el agua y se mide el tiempo que tardan en llegar a la plataforma.

Tarea de la memoria de trabajo: La plataforma se mueve y se fija en un nuevo lugar. Los ratones hacen cuatro pruebas consecutivas a intervalos de tan solo 20 segundos y se mide el tiempo que tardan en llegar a la plataforma. El promedio de los valores de latencia de escape para el segundo a cuarto ensayo se toma como un indicador de la tarea de memoria de trabajo.

Velocidad de natación: El tiempo que tardan los ratones en alcanzar la plataforma se ve afectado por la velocidad de natación de cada ratón. A fin de eliminar esta influencia, se mide la velocidad de natación.

### Resultados

- Presión arterial: No se observó ninguna diferencia significativa en la presión arterial entre los grupos antes del inicio de la administración oral, pero después de 4 semanas de administración (día -1), se confirmó que la presión arterial en el grupo de olmesartán medoxomilo de 1 mg/kg/día y de hidralazina 30 mg/kg/día se habían reducido de manera significativa y a niveles casi iguales en comparación con el grupo de administración de agua destilada (véase Fig. 8).
- Función cognitiva: En la prueba de la plataforma escondida, el tiempo que tardaban los ratones en alcanzar la plataforma se redujo a lo largo de las sucesivas sesiones en el grupo de administración de A $\beta$  40-1. Sin embargo, el tiempo no se redujo en el grupo de administración de A $\beta$  1-40. En el grupo de administración de A $\beta$  1-40 + olmesartán medoxomilo, el tiempo que tardaron los ratones en alcanzar la plataforma se redujo a lo largo de las sucesivas sesiones, en comparación con el grupo de administración de A $\beta$  40-1. En el grupo de administración de A $\beta$  1-40 + hidralazina, el tiempo no se redujo (Fig. 9).
- Prueba de la plataforma visible: No se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos (Fig. 10).
- Prueba de la sonda: El tiempo que tardaron los ratones en alcanzar la plataforma se redujo a lo largo de sesiones sucesivas en el grupo de administración de A $\beta$  40-1. Sin embargo, el tiempo no se redujo en el grupo de administración de A $\beta$  1-40. En el grupo de administración de A $\beta$  1-40 + olmesartán medoxomilo, el tiempo que tardaron los ratones en alcanzar la plataforma se redujo a través de las sucesivas sesiones, en comparación con el grupo de administración de A $\beta$  40-1. En el grupo de administración de A $\beta$  1-40 + hidralazina, el tiempo no se redujo (Fig. 11).
- Los cruces del anillo significa el número de veces que los ratones atraviesan la plataforma en la prueba de la sonda. En el grupo de administración de A $\beta$  40-1, el tiempo que tardaron los ratones en alcanzar la plataforma se

redujo. Sin embargo, el número de cruces de la plataforma fue menor en el grupo de administración de A $\beta$  1-40 que en el grupo de administración de A $\beta$  40-1. Aunque el número de cruces de la plataforma aumentó en el grupo de administración de A $\beta$  1-40 + olmesartán medoxomilo en comparación con el grupo de administración de A $\beta$  1-40, no hubo ningún aumento en el grupo de administración de A $\beta$  1-40 + hidralazina (Fig. 12).

- 5 – Velocidad de natación: No se observaron diferencias significativas entre los grupos (Fig. 13).
- Retención a largo plazo: El día 17, el tiempo que tardaron los ratones en alcanzar la plataforma fue mayor en el grupo de administración de A $\beta$  1-40 que en el grupo de administración de A $\beta$  40-1. El tiempo que tardaron los ratones en alcanzar la plataforma se redujo en el grupo de administración de A $\beta$  1-40 + olmesartán medoxomilo en comparación con el grupo de administración de A $\beta$  1-40. Sin embargo, el tiempo que tardaron los ratones en alcanzar la plataforma no se redujo en el grupo de administración de A $\beta$  1-40 + hidralazina (Fig. 15).
- 10 – Tarea de la memoria de trabajo: El tiempo que tardaron los ratones en alcanzar la plataforma fue mayor en el grupo de administración A $\beta$  1.40 que en el grupo de administración de A $\beta$  40-1. El tiempo que tardaron los ratones en alcanzar la plataforma se redujo en el grupo de administración de A $\beta$  1-40 + olmesartán medoxomilo en comparación con el grupo de administración de A $\beta$  1-40. Sin embargo, el tiempo que tardaron los ratones en alcanzar la plataforma no se redujo en el grupo de administración de A $\beta$  1-40 + hidralazina (Fig. 15).
- 15 – Prueba de campo abierto: No se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos (Fig. 16).

Lo que se ha dicho hasta ahora se puede resumir de la siguiente manera. Se confirmó en la prueba acuática de Morris que el deterioro de la memoria espacial y la incapacidad de aprendizaje provocados por la administración intracerebroventricular de A $\beta$  1-40 mejoraron significativamente en el grupo de olmesartán medoxomilo 1 mg/kg/día del Ejemplo de Ensayo 1, pero este efecto no se observó en el grupo de hidralazina 30 mg/kg/día. Se confirmó en la prueba de campo abierto y similares que no había ninguna diferencia considerable en los factores de confusión como la actividad o la capacidad de nadar de los ratones.

Utilizando un modelo de inyección de A $\beta$ , los presentes inventores encontraron una posibilidad de que el deterioro de la memoria espacial y la incapacidad de aprendizaje provocados por la administración intracerebroventricular de A $\beta$  1-40 se pueda mejorar con la administración oral de una dosis baja de olmesartán medoxomilo (Ejemplo de Ensayo 1). Además, mediante la realización de un experimento similar utilizando hidralazina como un fármaco de control, los inventores confirmaron que este efecto no se produce por la reducción de la presión arterial *per se* (Ejemplo de Ensayo 2). El efecto no se observó en los grupos de dosis altas de olmesartán medoxomilo (3-6 mg/kg/día), probablemente debido a que el flujo sanguíneo cerebral se redujo al disminuir excesivamente la presión arterial (es decir, la presión arterial somática cayó por debajo del límite inferior de la autorregulación cerebrovascular).

### Ejemplo de ensayo 3

#### Procedimientos

Electrofisiología: La potenciación a largo plazo se midió como se ha descrito anteriormente (Niisato K, Fujikawa A, Komai S, Shintani T, Watanabe E, Sakaguchi G, Katsuura G, Manabe T, Noda M: Age-dependent enhancement of hippocampal long-term potentiation and impairment of spatial learning through the Rho-associated kinase pathway in protein tyrosine phosphatase receptor type Z-deficient mice. *J Neurosci* 2005; 25:1081-1088). Se prepararon cortes de hipocampo transversal (400  $\mu$ m de espesor) de ratones de 5 a 10 semanas de edad o de ratones de 13 a 31 semanas de edad y se colocaron en una cámara de retención de tipo interfaz por lo menos durante 1 hora. A continuación, se transfirió un único corte a una cámara de registro y se sumergió por debajo de un medio de perfusión continua saturado con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio estaba compuesto de NaCl 119 mM, KCl 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,3 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26,2 mM y glucosa 11 mM. Todas las soluciones de perfusión contenían picrotoxina 100  $\mu$ M con el fin de bloquear las respuestas sinápticas inhibitorias mediadas por el receptor GABA<sub>A</sub>. Los registros de los potenciales de campo se realizaron con un electrodo de vidrio (NaCl 3 M) colocado en el estrato radiado. La solución de la pipeta de células enteras contenía gluconato de Cs 122,5 mM, ClCs 17,5 mM, HEPES 10 mM, EGTA 0,2 mM, NaCl 8 mM, Mg-ATP 2 mM y Na<sub>3</sub>-GTP 0,3 mM, pH 7,2; 290-300 mM mOsm. Para evocar respuestas sinápticas, se colocó un electrodo de estimulación bipolar de tungsteno en el estrato radiado y se estimularon las fibras colaterales/comisurales de Schaffer a 0,1 Hz. La fuerza del estímulo se ajustó de modo que se originasen PEPS mediados por el receptor de AMPA de los valores de pendiente entre 0,10 y 0,15 mV/ms. Para el análisis de los PEPS, los inventores midieron su fase ascendente inicial con el fin de evitar en la medida de lo posible la contaminación por los componentes dependientes de voltaje. Cada punto de datos representa el valor de la pendiente promedio de 1 minuto que se normalizó al valor de la pendiente de referencia. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C. Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM. Se utilizó la prueba t de Student o un ANOVA para determinar si había una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en la media. La mayoría de los experimentos electrofisiológicos fueron pruebas enmascaradas y los resultados fueron esencialmente idénticos a los de los experimentos no enmascarados; por lo tanto, todos los datos se agruparon. La picrotoxina se adquirió en Wako (Osaka, Japón). Seguimiento del flujo sanguíneo cerebral: Se realizó una pequeña craneotomía (2 x 2 mm) para exponer la corteza somatosensorial; se eliminó la duramadre y el sitio se perfundió con una solución de Ringer modificada (37 °C, pH 7,3-7,4) (Iadecola C, Zhang F, Niwa K, Eckman C, Turner SK, Fischer E, Younkin S, Borchelt DR, Hsiao KK, Carlson GA: SOD1 rescues cerebral endothelial dysfunction in mice overexpressing amyloid precursor protein. *Nat. Neurosci* 1999; 2:157-161). El líquido cefalorraquídeo (LCR) se monitorizó continuamente en

el sitio de la perfusión con una sonda de láser Doppler posicionada estereotáxicamente en la superficie cortical y conectada a un sistema de adquisición de datos computarizado. Los valores del LCR se expresaron como porcentaje de aumento en relación con el nivel de reposo. Se obtuvieron valores de cero para el LCR después de detener el corazón con una sobredosis de isoflurano al final del experimento. Efecto de la aplicación tópica de A $\beta$ 40 en hiperemia funcional: La ventana del cráneo se perfundió primero con solución de Ringer y se registraron las respuestas del LCR a la estimulación de los bigotes. Los bigotes se acariciaron suavemente durante 60 segundos con un aplicador con punta de algodón. Después de analizar las respuestas del LCR durante la perfusión de la solución de Ringer, la solución de perfusión se cambió a solución de Ringer que contenía A $\beta$ 40 (5  $\mu$ M; Peptide Institute, Osaka, Japón). Previamente se había determinado que esta concentración de A $\beta$ 40 producía efectos cerebrovasculares máximos (Niwa K, Younkin L, Ebeling C, Turner SK, Westaway D, Younkin S, Ashe KH, Carlson GA, Iadecola C: Abeta 1-40-related reduction in functional hyperemia in mouse neocortex during somatosensory activation. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 2000; 97:9735-9740). Autorregulación cerebrovascular: Las técnicas utilizadas para el estudio de la autorregulación vascular cerebral en roedores fueron similares a las descritas previamente (Ishitsuka T, Iadecola C, Underwood MD, Reis DJ: Lesions of nucleus tractus solitarii globally impair cerebrovascular autoregulation. Am J Physiol 1986; 251: H269-281). Los ratones fueron anestesiados como preparación para la medición en el LCR por LDF. Después de la estabilización de la PAM y los gases sanguíneos, la PAM se elevó o se redujo en pasos de 10 mm Hg, o bien por infusión intravenosa de fenilefrina (1-2  $\mu$ g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  min<sup>-1</sup>) o mediante exanguinación controlada (100-400  $\mu$ l de sangre arterial), (Ishitsuka T, Iadecola C, Underwood MD, Reis DJ: Lesions of nucleus tractus solitarii globally impair cerebrovascular autoregulation. Am J Physiol 1986; 251: H269-281). El intervalo de PAM estudiado fue 20-160 mmHg. Los valores del LCR se registraron 5 min después de cambiar la PAM. En vista de los posibles efectos patológicos de cambios en la PAM por encima o por debajo del intervalo autorregulado, se analizaron los límites inferior y superior de la autorregulación en otros animales (Ishitsuka T, Iadecola C, Underwood MD, Reis DJ: Lesions of nucleus tractus solitarii globally impair cerebrovascular autoregulation. Am J Physiol 1986; 251: H269-281).

## 25 Resultados

- Medición de la potenciación a largo plazo en el hipocampo (CA1/colaterales de Schaffer) de los ratones inyectados con A $\beta$ 40 (con o sin tratamiento con el BRA olmesartán)

Se cree que la potenciación a largo plazo (PLP) en el hipocampo es una base celular del aprendizaje y la memoria. Los inventores midieron la potenciación a largo plazo (Fig. 18-1) en el hipocampo de los ratones inyectados con A $\beta$ 40 (con o sin tratamiento con el BRA olmesartán). El BRA olmesartán mejoró el deterioro inducido por el A $\beta$  en la memoria espacial asociado a la recuperación de la PLP (Figs. 18-2 y 18-3).

- Medición del flujo sanguíneo cerebral inducido por la actividad neuronal de ratones inyectados con A $\beta$  (con o sin tratamiento con el BRA olmesartán).

Los inventores midieron el flujo sanguíneo cerebral inducido por la actividad neuronal de ratones inyectados con A $\beta$  (con o sin tratamiento con el BRA olmesartán). La actividad neuronal fue provocada en la corteza somatosensorial mediante la estimulación de los bigotes (Fig. 19-1). El BRA olmesartán mejoró el deterioro inducido por el A $\beta$  en el acoplamiento neurovascular (Fig. 19-2).

- Medición del flujo sanguíneo cerebral de los ratones inyectados con A $\beta$  (con o sin tratamiento con el BRA olmesartán) (Figs. 20-1 y 20-2)

Se sabe que la autorregulación cerebrovascular, es decir, la capacidad de la circulación cerebral para mantener el flujo frente a cambios en la presión arterial media (PAM) se ve afectada por el A $\beta$ . Los inventores observaron que la autorregulación cerebrovascular afectada por A $\beta$  se recupera con el BRA olmesartán (Fig. 20-3).

En resumen, se puede decir que el BRA olmesartán recuperó el deterioro inducido por A $\beta$  de la memoria espacial asociado a la recuperación de acoplamiento neurovascular (Fig. 21).

## 45 **(Ejemplo de formulación 1) Cápsulas**

Olmesartán medoxomilo	20,0 mg
Lactosa	158,7 mg
Almidón de maíz	70,0 mg
Estearato de magnesio	1,3 mg
<b>Total</b>	<b>250,0 mg</b>

Los polvos mencionados anteriormente se mezclan y se pasan por un tamiz de malla 60. El polvo mezclado resultante se introduce en cápsulas de gelatina de nº 3 de 250 mg.

**(Ejemplo de formulación 2) Comprimidos**

Olmesartán medoxomilo	20,0 mg
Lactosa	154,0 mg
Almidón de maíz	25,0 mg
Estearato de magnesio	1,0 mg
<hr/> Total	<hr/> 200,0 mg

Los polvos mencionados anteriormente se mezclan y se comprimen en una máquina de comprimidos en comprimidos que pesaban cada uno 200 mg. Los comprimidos así obtenidos se pueden revestir con azúcar, si es necesario.

**5 Aplicabilidad industrial**

El medicamento de la presente invención que comprende un bloqueador del receptor de angiotensina II específico (tal como olmesartán medoxomilo) como principio activo es útil en el tratamiento de trastornos de la circulación cerebral o del flujo sanguíneo cerebral inducidos por el  $\beta$ -amiloide. Este medicamento es preferiblemente para uso en animales de sangre caliente, con mayor preferencia para su uso en humanos.

10 Enfermedades causantes representativas de la demencia son la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular, pero en realidad un gran número de pacientes con enfermedad de Alzheimer también sufren de enfermedad cerebrovascular (EA con ECV) (Fig. 17). Los estudios epidemiológicos a gran escala recientes han elucidado que los factores de riesgo vasculares tipificados por la hipertensión son factores de riesgo independientes de la enfermedad de Alzheimer. La hipertensión puede ser un modificador directo de la patología de la enfermedad de Alzheimer. Por  
15 otra parte, la hipertensión aumenta el riesgo de disminuir aún más la función cognitiva de los pacientes con enfermedad de Alzheimer al causar trastornos cerebrovasculares. El tratamiento de la hipertensión es un elemento crucial, no sólo en la prevención primaria de la demencia vascular, sino también en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

20 La mejora de la función cognitiva en el modelo en ratón de la enfermedad de Alzheimer que se logró mediante la presente invención ha sugerido que olmesartán es eficaz para mejorar directamente la patología de la enfermedad de Alzheimer. En las aplicaciones clínicas reales, el manejo de la hipertensión se añade además como un valor importante. Mediante la administración de olmesartán a los pacientes con enfermedad de Alzheimer o deterioro cognitivo leve (DCL), que es un estado temprano del deterioro cognitivo, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, y que también sufren de hipertensión, podría ser posible inhibir el progreso del deterioro cognitivo. Por otra parte,  
25 mediante la administración de tratamiento hipotensor con olmesartán a pacientes hipertensos, podría ser posible reducir el riesgo de la aparición de la enfermedad de Alzheimer en el futuro. Dado que el control de la hipertensión también es eficaz en la prevención de la demencia vascular, se cree que dicho control puede contribuir en gran medida al tratamiento médico general de la demencia.

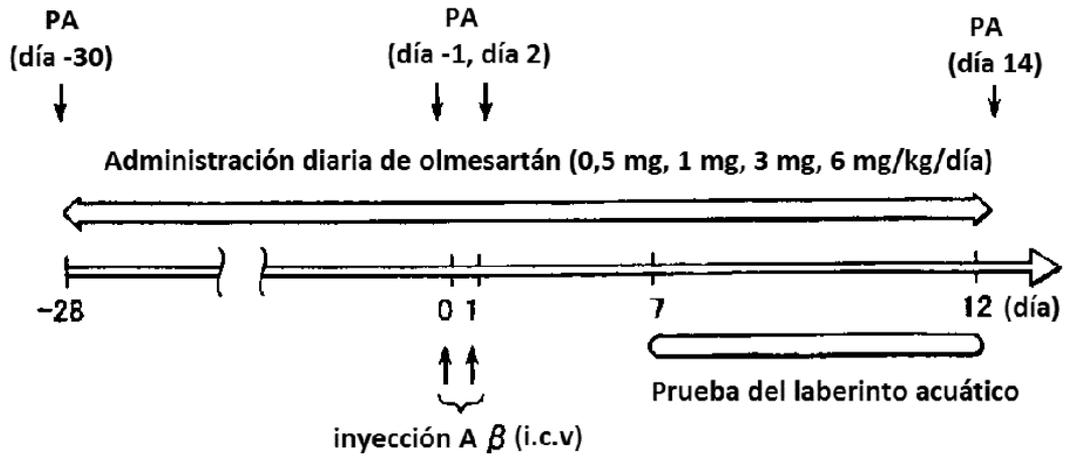
30 Específicamente, se contempla que una cantidad convencional de olmesartán actualmente aprobada se pueda administrar a pacientes con enfermedad de Alzheimer complicada con hipertensión o pacientes con DCL complicado con hipertensión para inhibir así el progreso del deterioro cognitivo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Ácido 4-(1-Hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il)fenil]fenil]-metilimidazol-5-carboxílico o 4-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il)fenil]fenil]metilimidazol-5-carboxilato de (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo para su uso en el tratamiento de trastornos de la circulación cerebral o del flujo sanguíneo cerebral inducidos por el  $\beta$ -amiloide.
2. Una composición que comprende ácido 4-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il)fenil]fenil]-metilimidazol-5-carboxílico o 4-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il)fenil]fenil]metilimidazol-5-carboxilato de (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo como un principio activo, para su uso en el tratamiento de trastornos de la circulación cerebral o del flujo sanguíneo cerebral inducidos por el  $\beta$ -amiloide.
- 10 3. El uso de ácido 4-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il)fenil]fenil]-metilimidazol-5-carboxílico o 4-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[4-[2-(tetrazol-5-il)fenil]fenil]metilimidazol-5-carboxilato de (5-metil-2-oxo-1,3-dioxolen-4-il)metilo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de la circulación cerebral o del flujo sanguíneo cerebral inducidos por el  $\beta$ -amiloide.

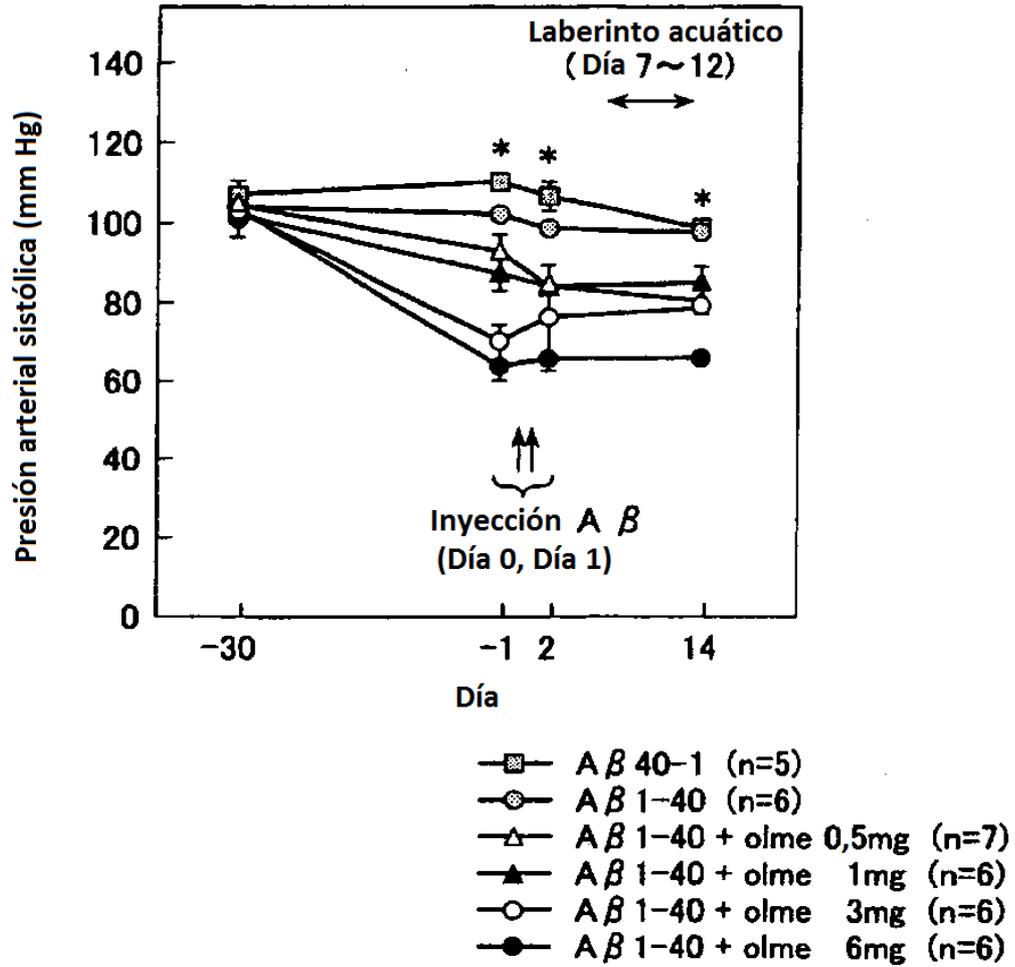
Fig. 1

Calendario experimental



✘ PA: evaluación de la presión arterial

Fig. 2  
Cambio en la presión arterial



\*  $p < 0,05$  frente a control (Aβ 40-1, Aβ 1-40)

Fig. 3

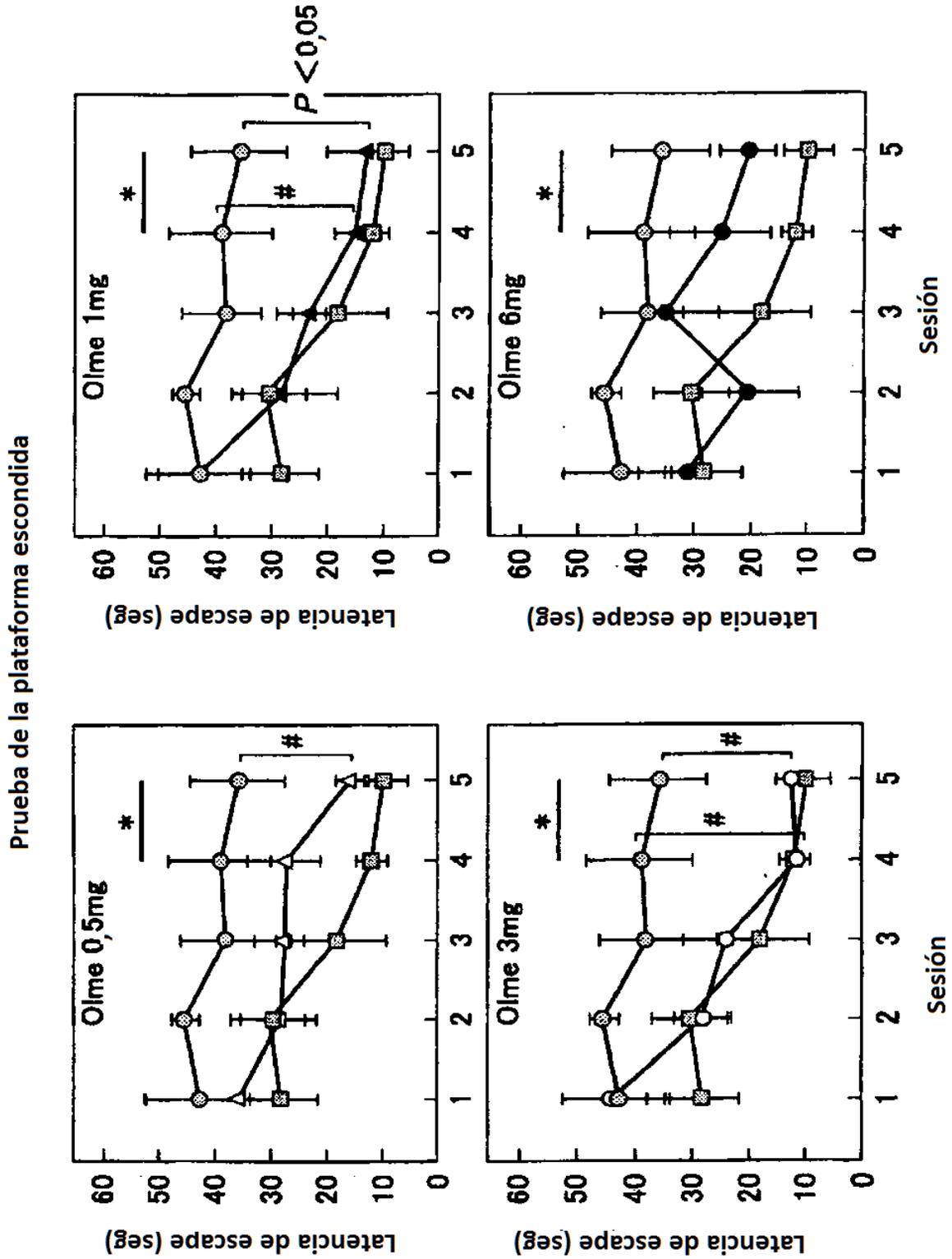


Fig. 4

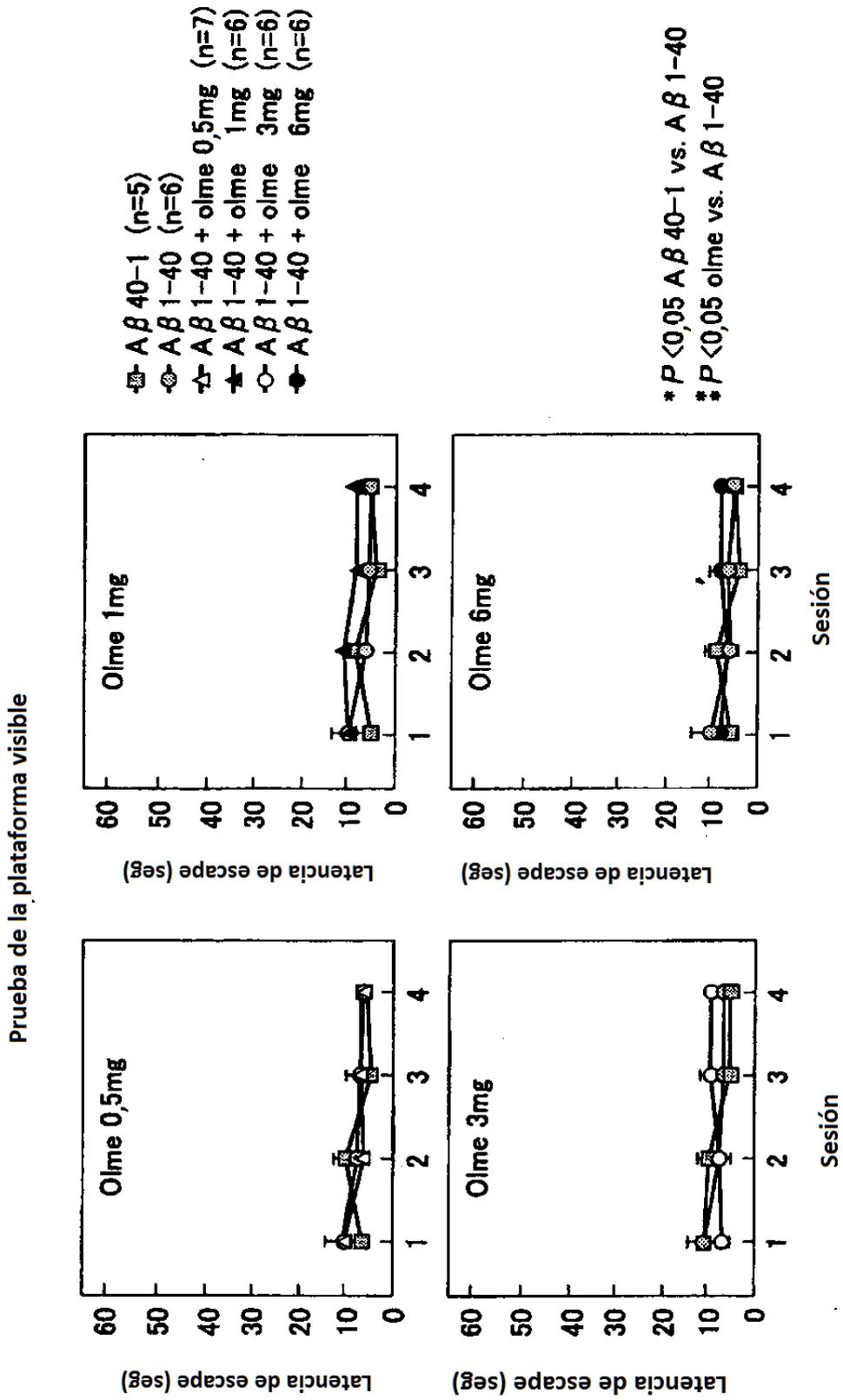
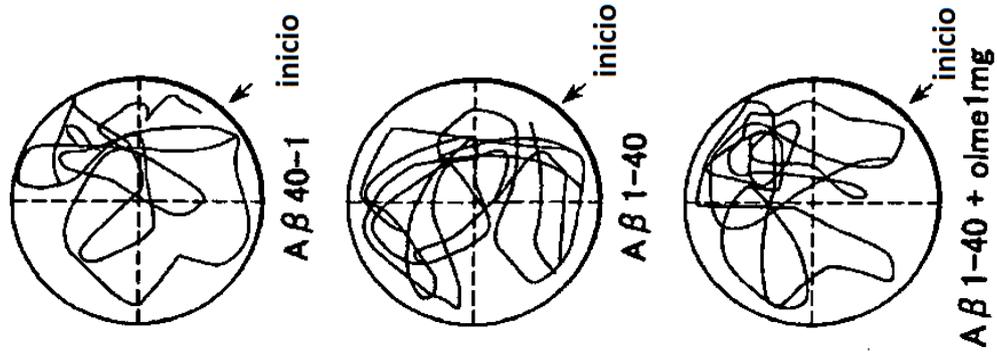
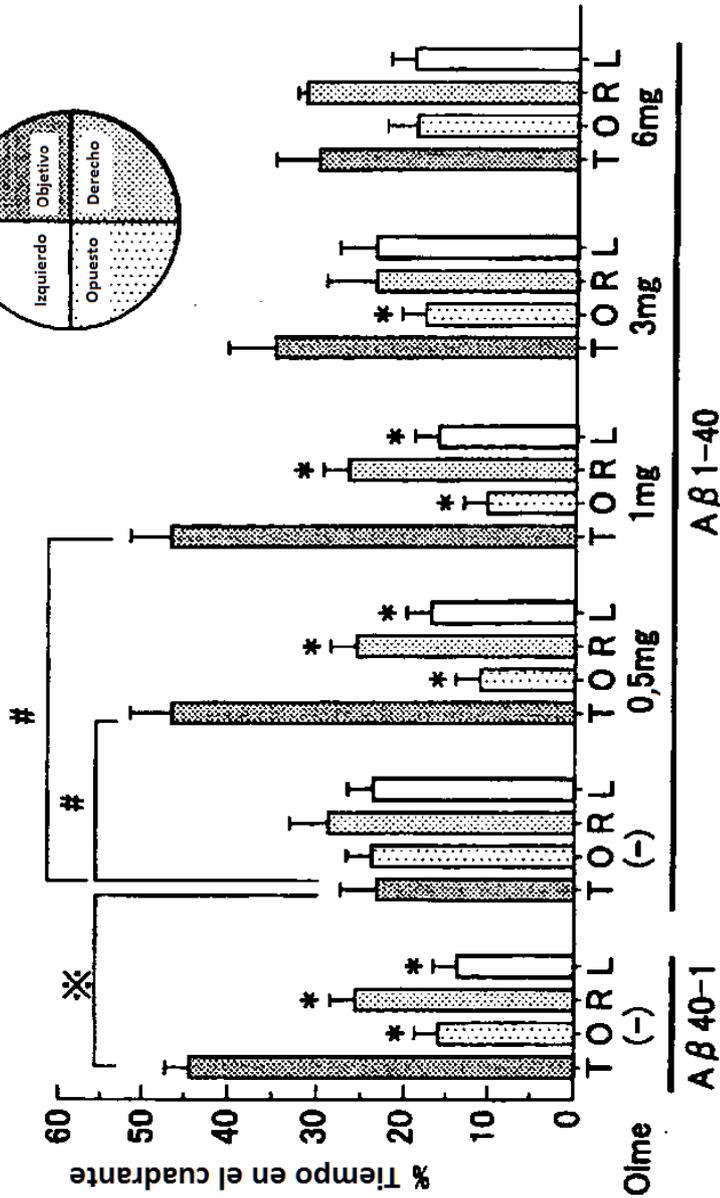
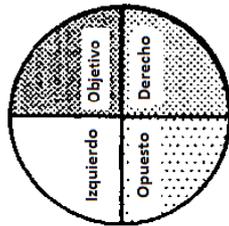


Fig. 5



Prueba de la sonda



\* P < 0,005, # P < 0,05 vs. cuadrante objetivo \* P < 0,005, # P < 0,005

Fig. 6

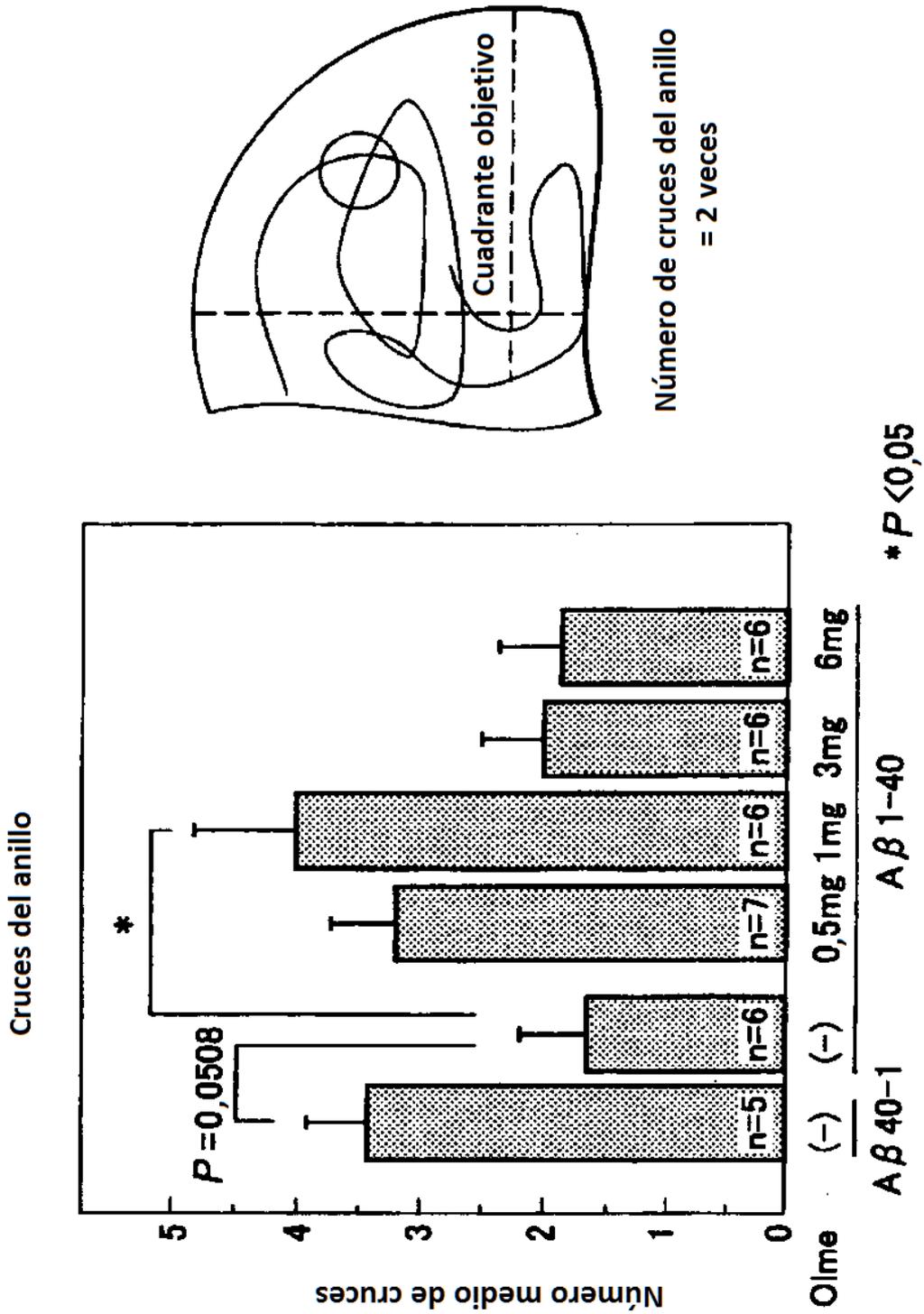
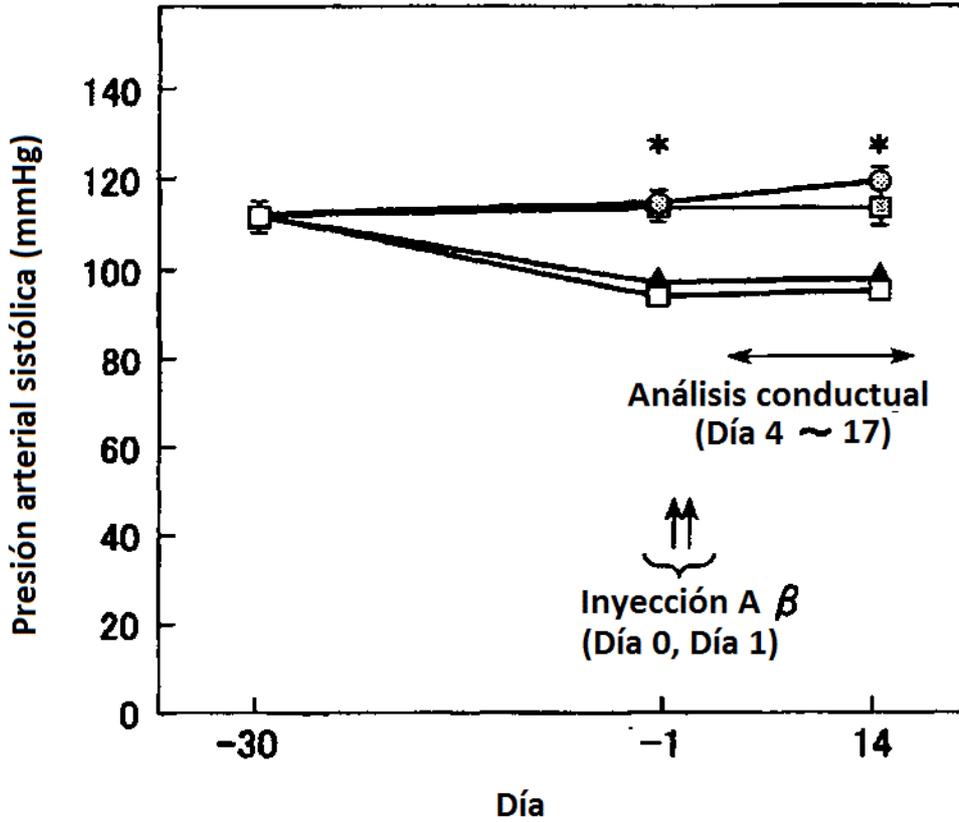




Fig. 8

Cambio en la presión arterial



- Aβ 40-1 + Vehículo (n=12)
- Aβ 1-40 + Vehículo (n=12)
- ▲— Aβ 1-40 + Olme 1mg (n=11)
- Aβ 1-40 + Hidralazina 30mg (n=12)

\*  $P < 0,05$  vs. Vehículo (Aβ 40-1, Aβ 1-40)

Fig. 9

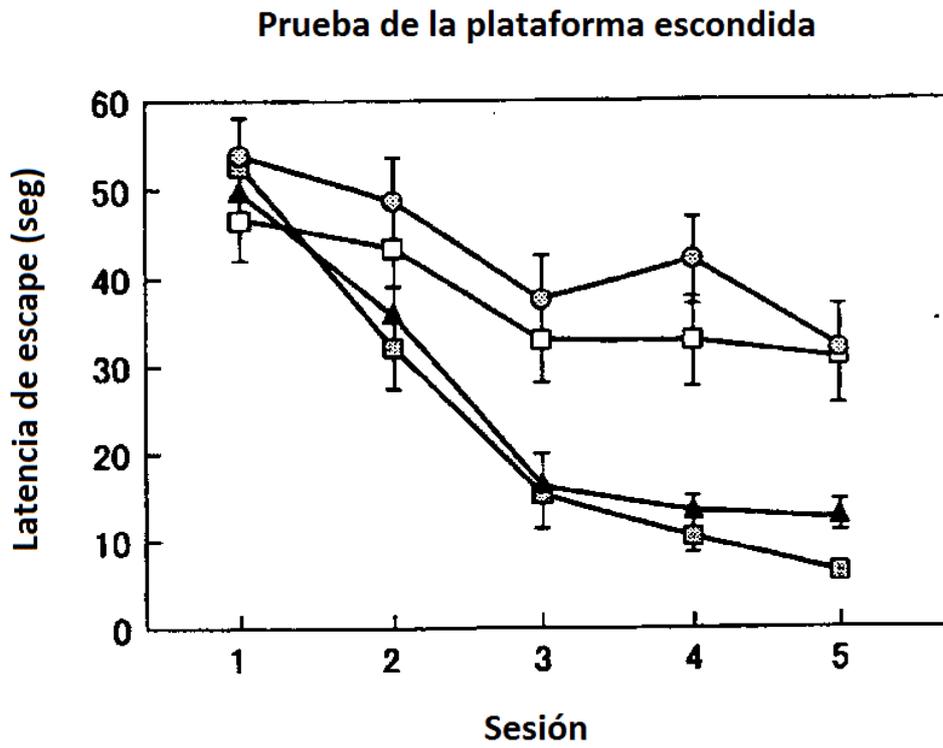


Fig. 10

Prueba de la plataforma visible

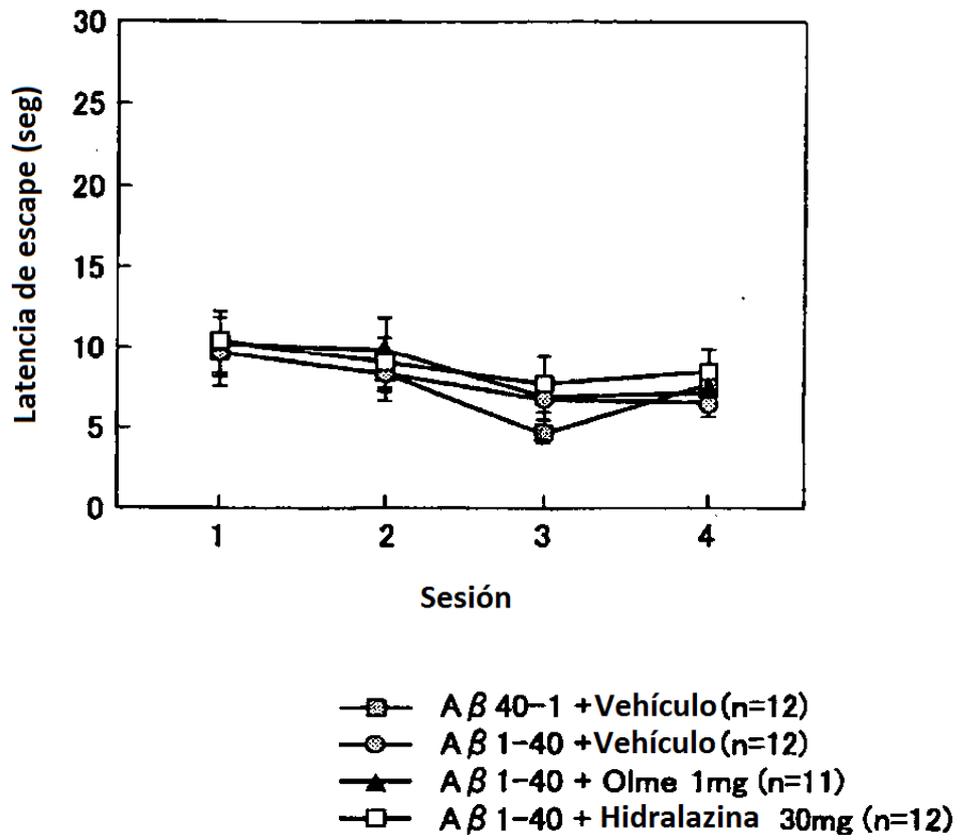


Fig. 11

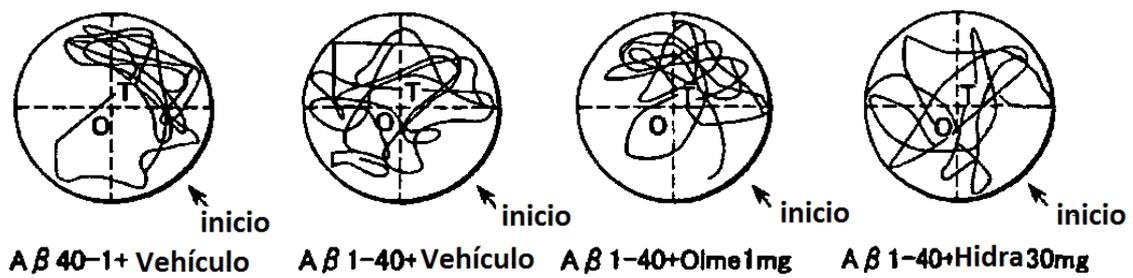
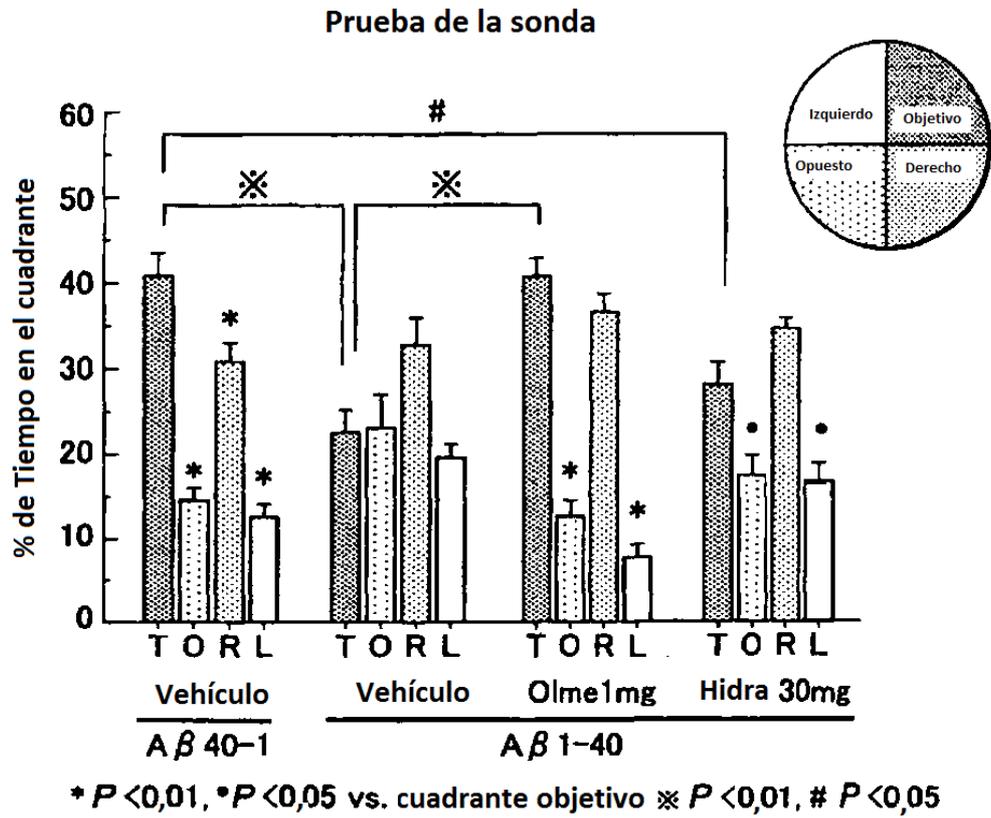


Fig. 12

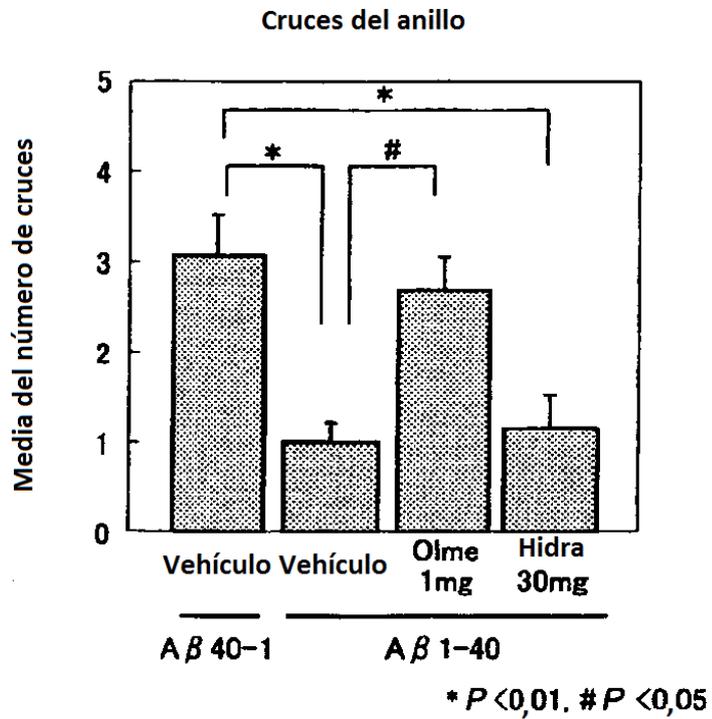


Fig. 13

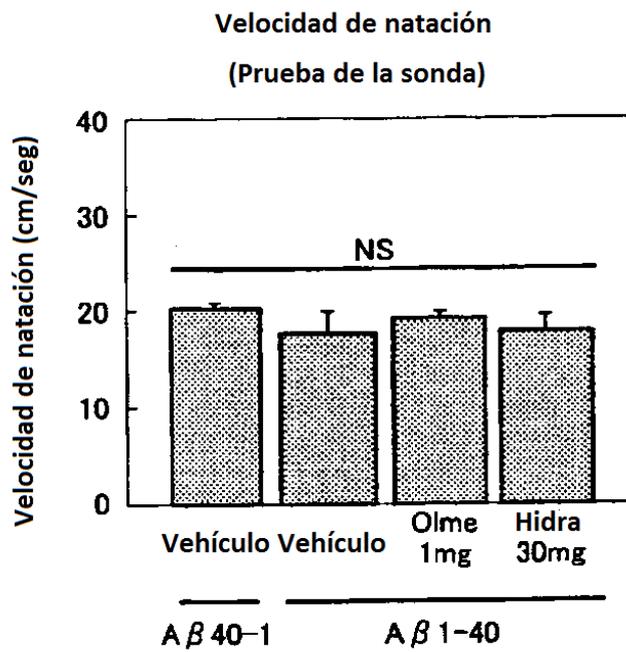


Fig. 14

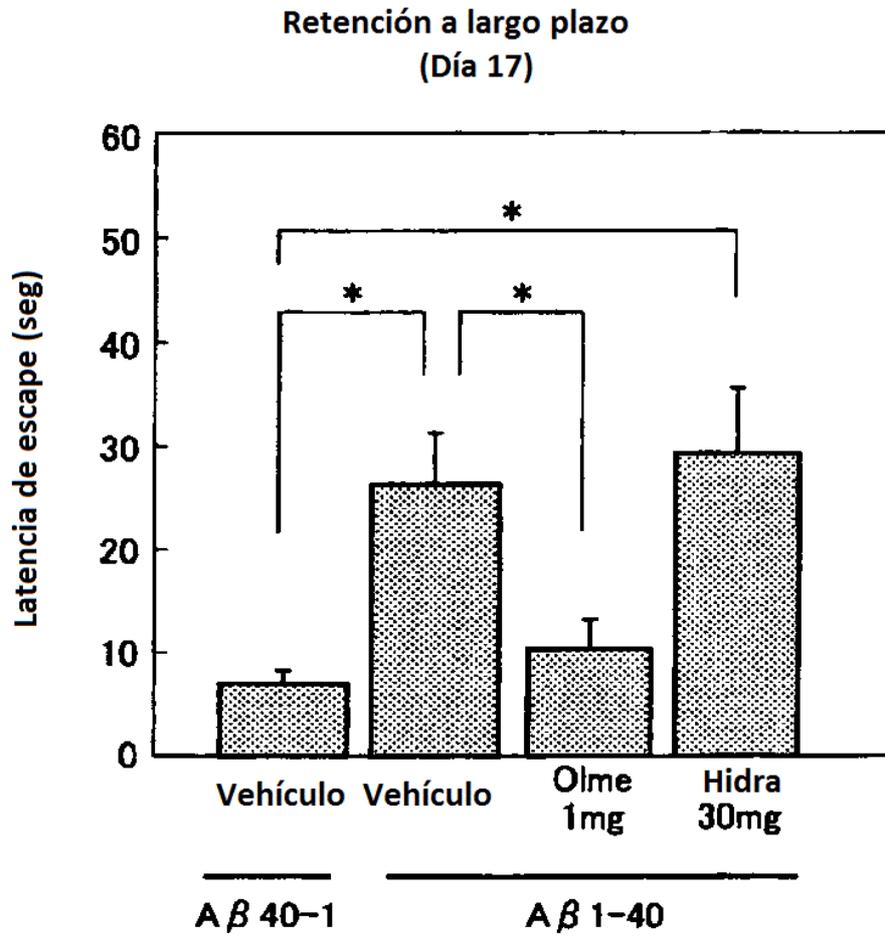


Fig. 15

Tarea de la memoria de trabajo

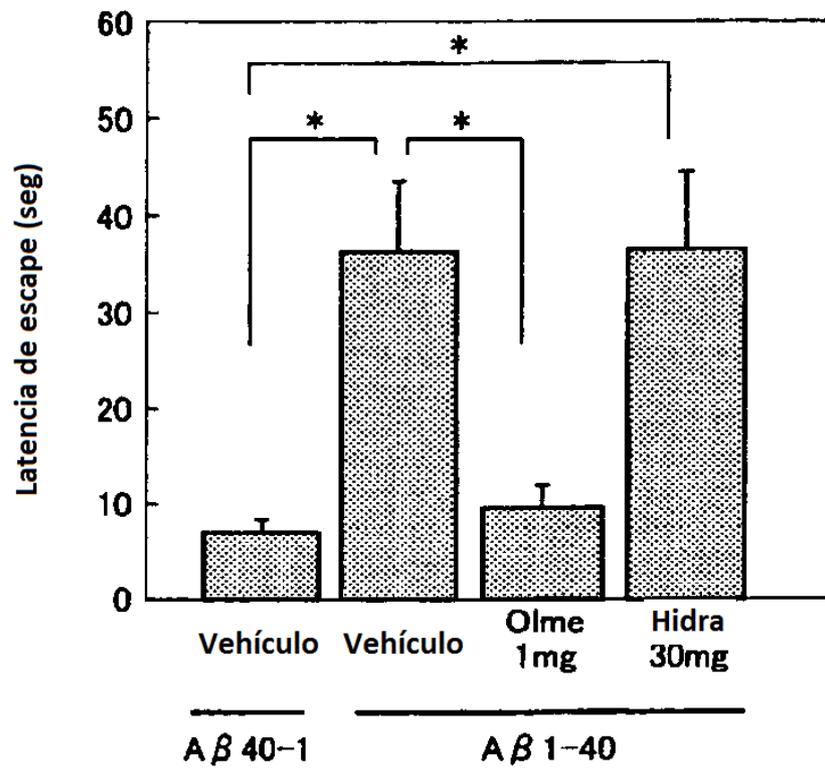


Fig. 16

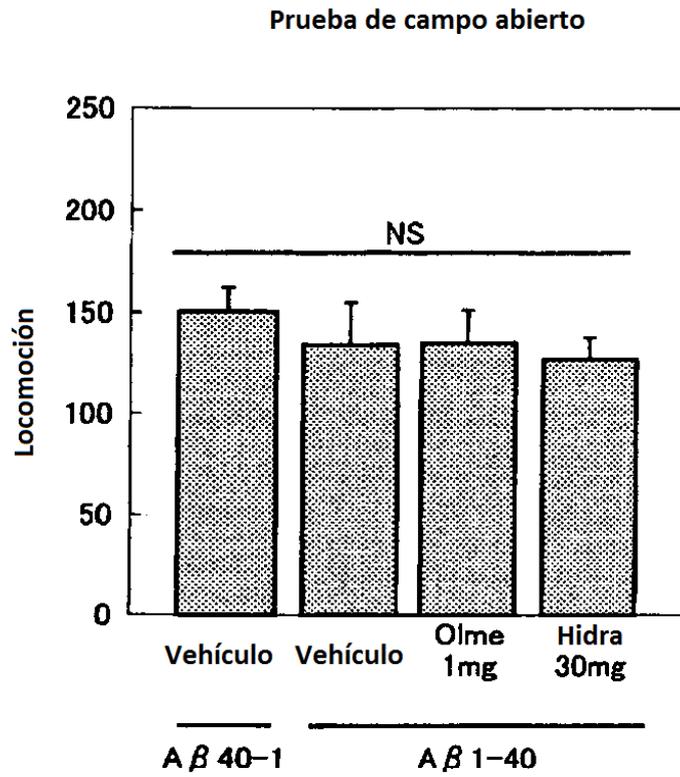


Fig. 17

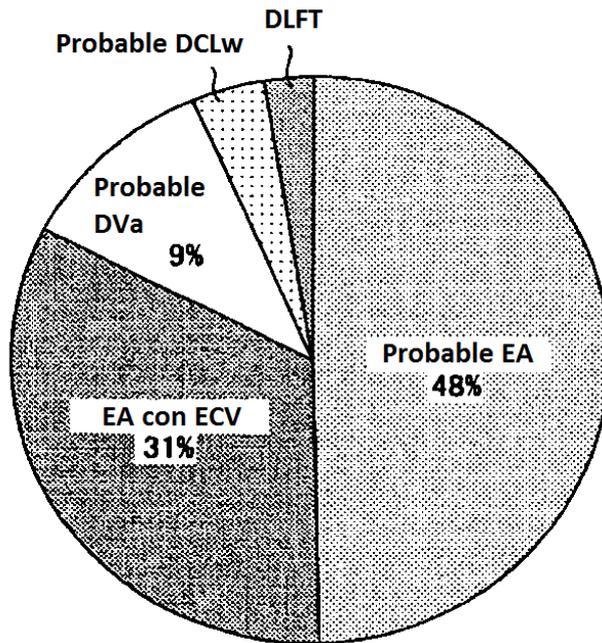


Fig. 18-1

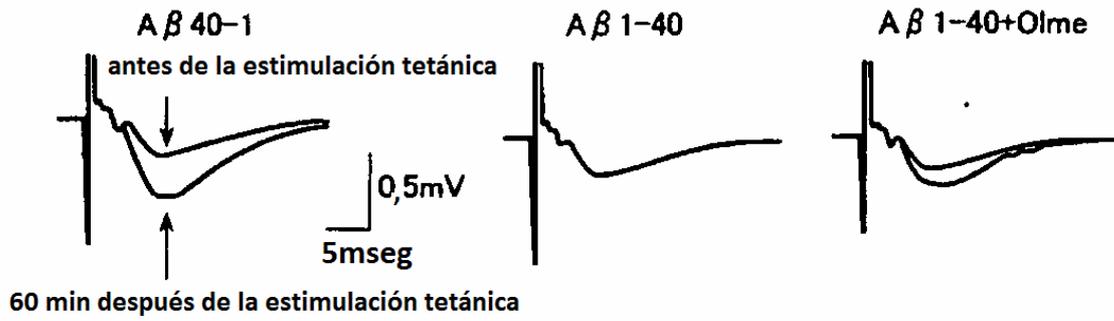


Fig. 18-2

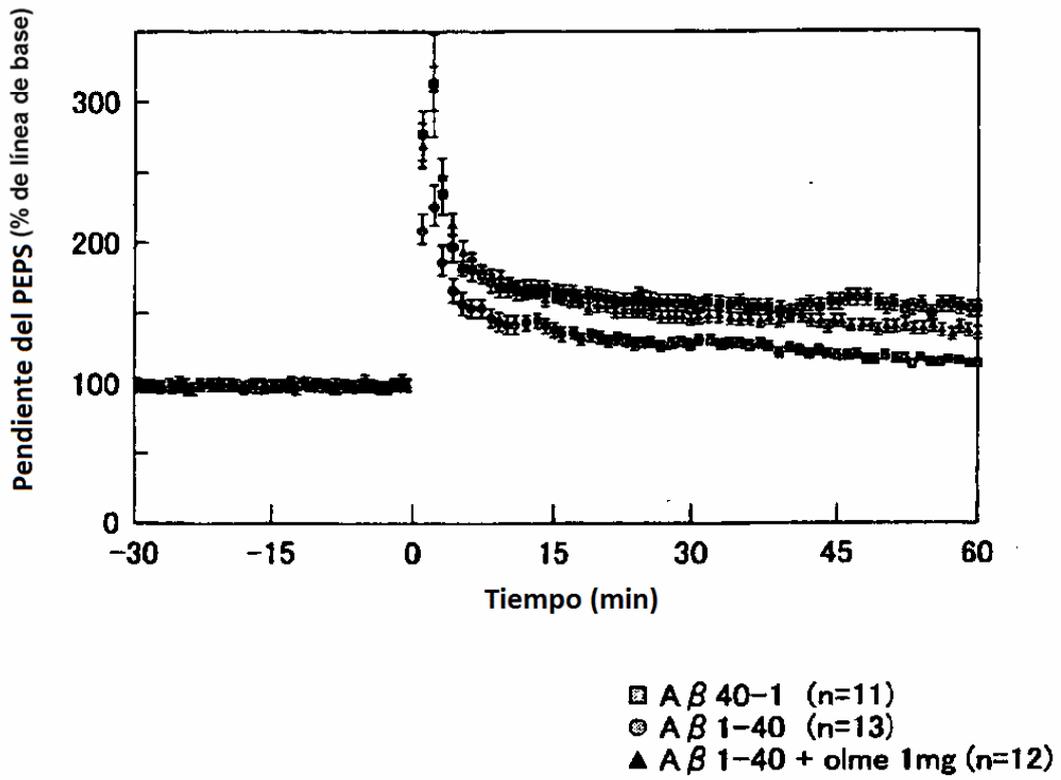


Fig. 18-3

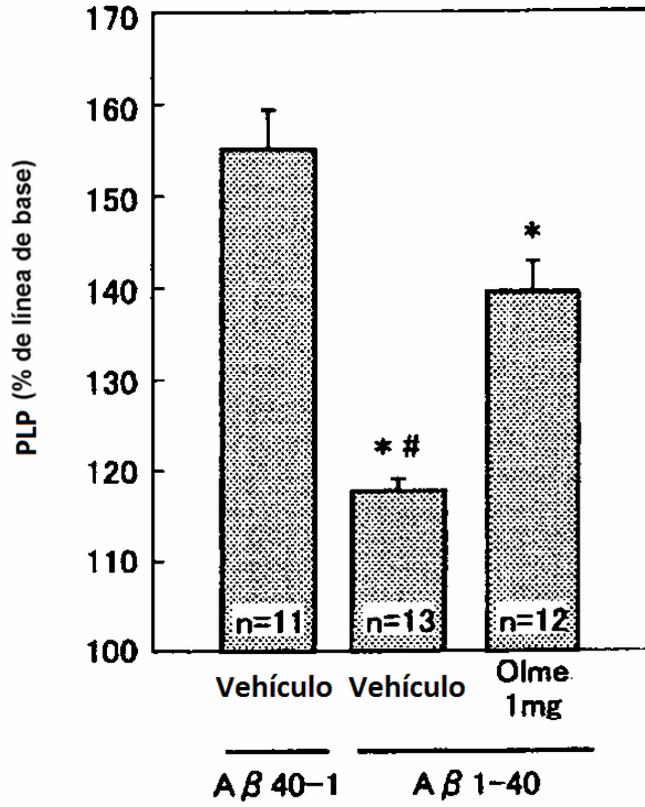


Fig. 19-1

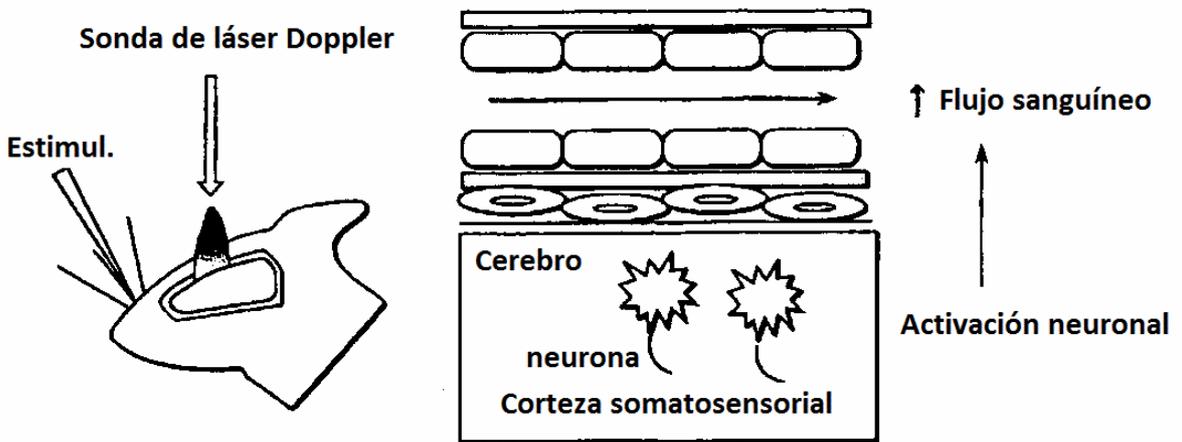


Fig. 19-2

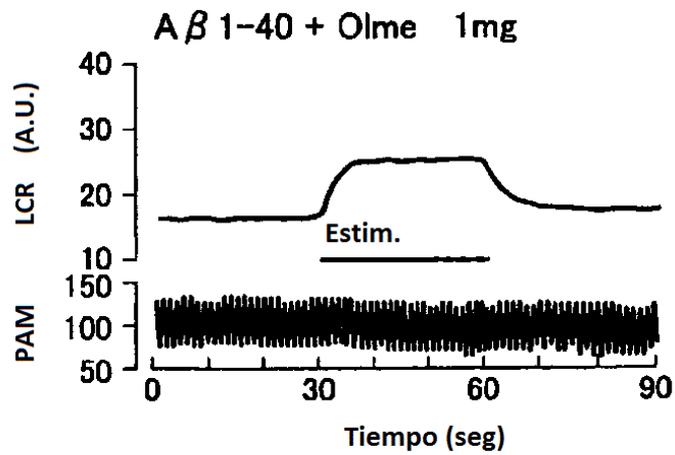
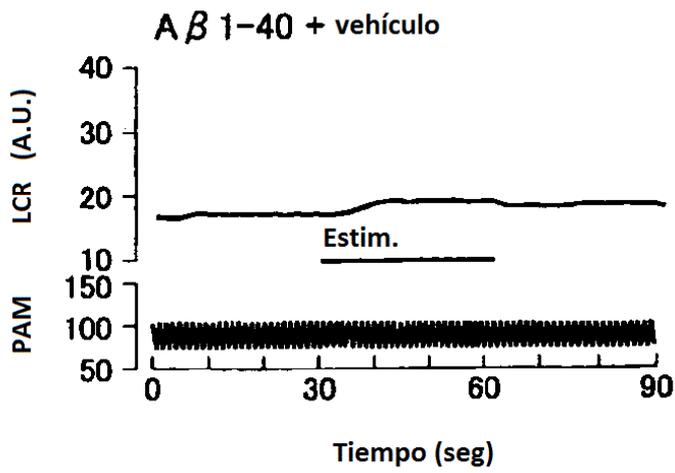
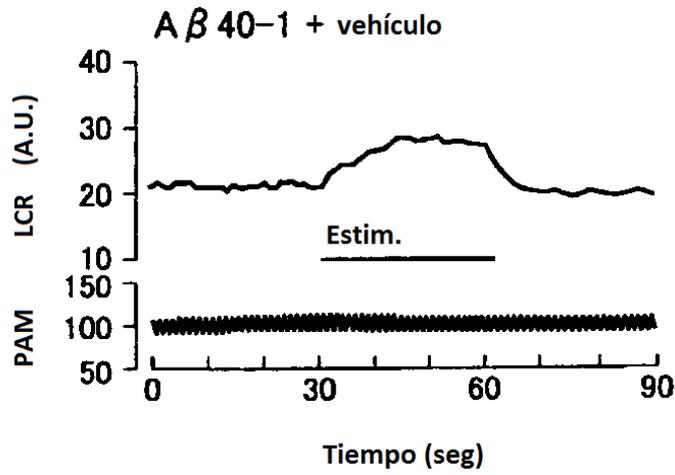


Fig. 20-1

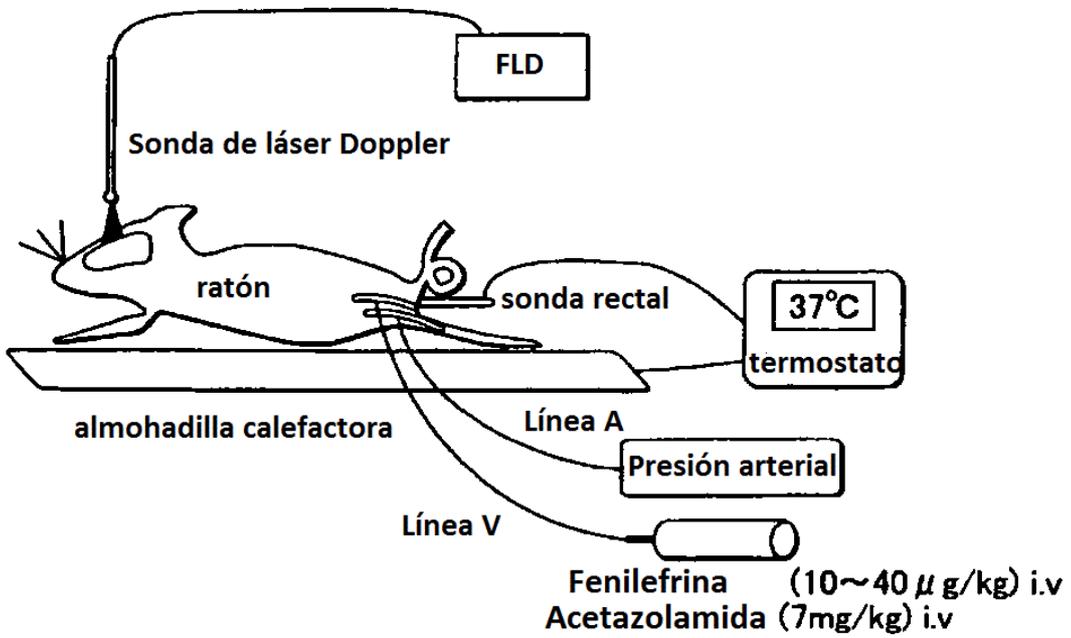


Fig. 20-2

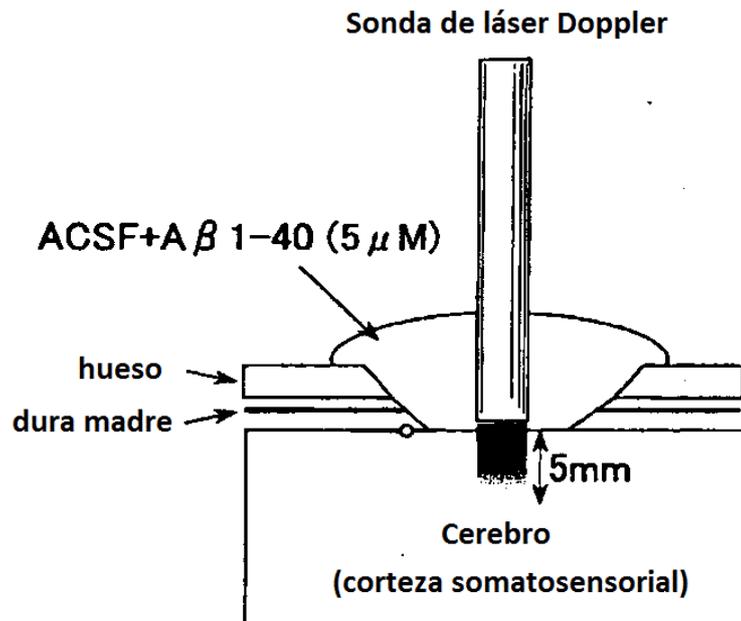


Fig. 20-3

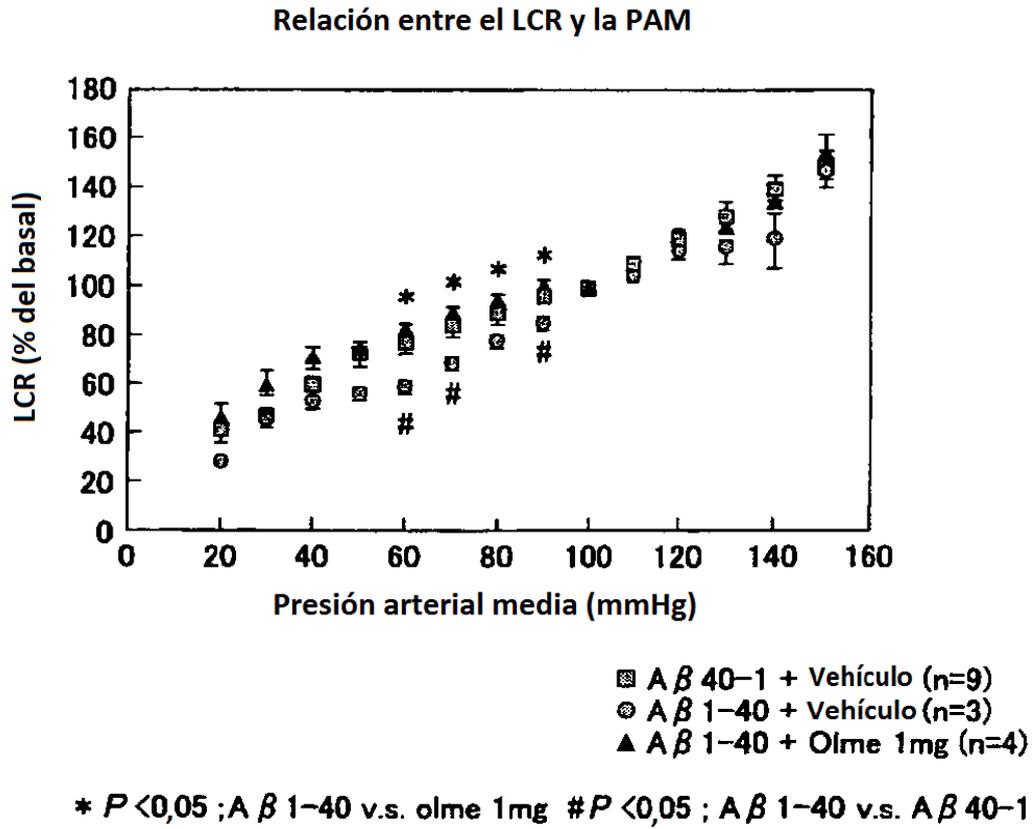


Fig. 21

