

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 737**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/05** (2006.01)

**A61K 31/565** (2006.01)

**A61K 31/65** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2009 E 09772865 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2310051**

54 Título: **Combinación de un inhibidor de PARP y un compuesto que activa la quinasa Akt**

30 Prioridad:

**04.07.2008 HU 0800414**

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

**14.05.2015**

73 Titular/es:

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM (100.0%)  
Szántó Kovács János u. 1/b  
7633 Pécs, HU**

72 Inventor/es:

**GALLYAS, FERENC;  
SÜMEGI, BALÁZS;  
VETŐ, SÁRA;  
ÁCS, PÉTER;  
KOMOLY, SÁMUEL y  
ILLÉS, ZSOLT**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 535 737 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

Combinación de un inhibidor de PARP y un compuesto que activa la quinasa Akt

**Campo de la invención**

5 El objeto de la invención es el empleo combinado y la composición farmacéutica que se relaciona en donde se aplica como ingrediente activo la combinación de un inhibidor de PARP y un compuesto que activa la quinasa Akt. La invención es útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en las que la inhibición de PARP y/o la activación de una de las más proteína quinasas citoprotectoras importantes, Akt, es ventajosa para curar la enfermedad.

**Antecedentes de la invención**

10 En los últimos pocos años se ha descubierto en muchas enfermedades que de un modo u otro están relacionadas con una activación de PARP aumentada. El daño cardíaco de reperfusión isquémica [Methods in Enzymol. 186: 1-85, 1990; Arch. Biochem. Biophys. 288:533-7, 1991], el daño oxidativo en células diferentes [Adv. Exp. Med. Biol. 361:319-325, 1994; Mol. Cell. Biochem. 138: 141-8, 1994], la isquemia neuronal [Nat. Med. 3, 1089-1095, 1997; J. Cereb. Blood Flow Metab. 17, 1143-1151, 1997], la neumonía aguda [Am. J. Respir. Crit. Care Med. 165, 372-377, 2002], el choque séptico agudo [Shock 17, 286-292, 2002], el fallo orgánico múltiple inducido por zimógenos [J. Exp. Med. 186, 1041-1049, 1997] y el daño pancreático diabético, así como enfermedades asociadas con estas patologías, se encuentran típicamente en esta categoría. Según los resultados más recientes, la enzima de PARP desempeña un papel importante en el patomecanismo de numerosas patologías del sistema nervioso central y neurodegenerativos [J. Pharmacol. Exp. Ther., 310(3):1053-61, 2004; J. Neurosci. Res., 81(2):190-8, 2005; Curr. Pharm. Des. 13(8): 933-62, 2007]. En el caso de enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo esclerosis múltiple, encefalomiелitis, la enfermedad de Parkinson, de Alzheimer, de Huntington y otras patologías degenerativas), los tratamientos de que se dispone ofrecen beneficios sintomáticos relativamente pequeños y permanecen paliativos en naturaleza. Estas enfermedades afectan a un gran número de personas, por ejemplo la esclerosis múltiple (MS) es una de las enfermedades neurológicas más comunes entre la población de jóvenes europeos y norteamericanos. 25 Esta enfermedad inflamatoria crónica del sistema nervioso central (CNS) ejerce su efecto en torno a 1 millón de personas en todo el mundo. Los cambios histológicos de MS activos incluyen la infiltración del CNS por linfocitos T y B y macrófagos, degeneración andoligodendrocítica de degeneración de mielina (desmielinación) seguida por reconstrucción parcial (remielinación), lesiones de axones (neurodegradación), y activación de astrocitos y microglia. De conformidad con el punto de vista común, estos cambios inflamatorios implican ataques autoinmunitarios sobre componentes de mielina. Por consiguiente, la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) es uno de los modelos de la enfermedad en animales más aceptados.

Una hipótesis alternativa referente a la patogénesis heterogénea de MS propuso que la apoptosis oligodendrocítica representa la primera y más precoz etapa de todas las lesiones. Según este modelo, la inflamación autoinmunitaria puede ser secundaria debido a apoptosis de oligodendrocitos que da por resultado antígenos de tejidos que desenmascaran la desmielinación primaria [Barnett, M.H. and Prineas, J. W. Relapsing and remitting multiple sclerosis pathology of the newly forming lesion.. *Ann. Neurol.* 55, 458-468 (2004)] Además de la pérdida de oligodendrocitos en las lesiones precoces, el agotamiento de oligodendrocitos tiene lugar progresivamente durante la evolución de la lesión [Frohman, E.M., Racke, M.K and Raine, C.S. Multiple sclerosis - the plaque and its pathogenesis, *N. Engl. J. Med.* 354, 942-955 (2006)]. Este patomecanismo se aplica especialmente a tipo 3 y 4 de MS, pero puede explicar también la patogénesis de otros tipos de MS. La desmielinización inducida por cuprizona se ha sugerido para la modelación de tales tipos de MS degenerativos. Este modelo se emplea comúnmente para estudiar la de- y remielización que tienen lugar durante la MS. La cuprizona [bisclorhexanona]oxaldihidrazona] forma un complejo quelato con iones  $\text{Cu}^{++}$  e induce desmielinación principalmente en el cuerpo calloso y en el pedúnculo cerebral superior. La terminación del tratamiento da por resultado una remielinación rápida.

45 Basándose en nuestros propios estudios y en evidencias publicadas (Hemm RD, Carlton WW, Welser JR: *Ultrastructural changes of cuprizone encephalopathy in mice, Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1971 Apr; 18(4):869-82; Kesterson JW, Carlton WW.: *Aqueductal stenosis as the cause of hydrocephalus in mice fed the substituted hydrazine, cuprizone. Exp. Mol. Pathol.* 1970 Dec.; 13(3):281-94), la cuprizona induce también la formación de hidrocefalo, por tanto el modelo de cuprizona puede emplearse también en patologías que conducen a hidrocefalo. 50 Por consiguiente, durante nuestros experimentos, se examinaron tanto la desmielinación como la formación de hidrocefalo.

En paralelo con la acumulación de material teórico, se experimentaron numerosas terapias de inmunomodulación, y se introdujeron nuevos agentes (IFN- $\beta$ 1a, IFN- $\beta$ 1b, glatiramer-acetato, mitoxantrona) en el tratamiento clínico de MS. A pesar del hecho de que las nuevas terapias cambiaran espectacularmente el tratamiento de MS, no existe tal terapia actual que se capaz de detener el curso de la enfermedad, por lo que tal investigación activa está siendo hecha todavía para encontrar un tratamiento más eficaz.

La poli ADP ribosa polimerasa (PARP), una enzima nuclear que se presenta en un número de muchas copias, es activada por roturas de DNA inducidas por una tensión oxidativa. Por activación, la PARP desdobra el grupo de

nicotinamida procedente de proteínas nucleares de NAD<sup>+</sup> y ADP-ribosilatos. La activación de PARP afecta a numerosos procesos nucleares tales como la reparación de DNA y el control de la transcripción. Entre otros, la expresión de genes regulados por NFκB durante los procesos inflamatorios necesita la activación de PARP, que es probada por el hecho de que la expresión de estos genes está dañada grandemente en ratones PARP-1<sup>-/-</sup> (ratones que han perdido PARP-1). Los ratones PARP1<sup>-/-</sup> se han probado resistentes a procesos inflamatorios y al choque séptico al tiempo que no se encontraron cambios importantes en estos animales.

Según nuestros resultados previos, los inhibidores de PARP [4-hidroxi-quinazolina (4-HQ), PJ-34 (N-(6-oxo-5,6-dihydrofenantridin-2-il)-N,N-dimetilacetamida.HCl)] han sido útiles para evitar el choque séptico inducido por LPS en ratones BALB/c normales y han sido eficaces frente a diversos estímulos de tensiones oxidativas [Biochem Pharmacol 65(8) 1373-1382, 2003; J. Biol. Chem. 280(42) 35.767-75, 2005]. Nuestro grupo de investigación fue el primero en documentar que en el efecto citoprotector de inhibidores de PARP la activación del camino de PI3 quinasa/Akt desempeña un papel importante durante el choque séptico. Los resultados de otros grupos de investigación han puesto de manifiesto que PJ-34 había hecho disminuir eficazmente la formación inducida por MBP de EAE en ratones PJSJL [Pharmacol. Res. 52(1):109-18, 2005], y otros dos artículos demostraron también el papel de PARP en procesos neuroinflamatorios [J. Exp. Med. 198(11):1.729-40, 2003; J. Neurochem. 85(2):306-17, 2003].

Es bien sabido que la activación de la quinasa Akt (Akt) protege a células de la tensión en condiciones diferentes, y que la bibliografía expone claramente que la Akt es una quinasa citoprotectora muy importante (Ghong ZZ, Kang JQ, Maiese K.: *Essential cellular regulatory elements of oxidative stress in early and late phases of apoptosis in the central nervous system*, *Antioxid. Redox Signal.* 2004 Apr;6(2):277-87.; Nair VD, Olanow CW.: *Differential Modulation of Akt/Glycogen Synthase Kinase-3{beta}. Pathway Regulates Apoptotic and Cytoprotective Signaling Responses*. *J. Biol. Chem.* 2008 May 30;283(22):15.469-78., Quesada A, Lee BY, Micevych P: *PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease*. *Dev Neurobiol.* 2008 Apr; 68(5):632-44., Zhou P, Qian L, Chou T, Iadecola C.: *Neuroprotection by PGE2 receptor EPI inhibition involves the PTEN/AKT pathway*. *Neurobiol. Dis.* 2008 Mar; 29(3):543-51). Esta protección va ejercida parcialmente por protección del mitocondrio, es decir mediante la fosforilación y con ello la inactivación del Bad proapoptótico (Mullonkal CJ, Toledo-Pereyra L: *Akt in ischemia and reperfusion*, *J. Invest. Surg.* 2007 May-Jun;20(3): 195-203), Debido a que uno de los efectos primeros de la cuprizona es la formación de megamitocondrios, se ha propuesto que mediante la protección de mitocondrias, pueden protegerse las células que se degeneran, Por tanto se han buscado materiales no tóxicos que activan Akt y que por tanto tienen el potencial de ayudar a la regeneración de las células dañadas del sistema nervioso.

Además, se sabe que los estrógenos poseen también un efecto neuroprotector, que les hace útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (véase la familia de compuestos de estrógeno descrita en la patente europea EP 1 511 496 B1). Este efecto puede hacerse remontar al efecto inhibidor de PARP del estrógeno que puede ejercerse de un modo en el que el estrógeno se une a un receptor alfa y forma un complejo con PARP, es decir ancla la PARP al DNA y evita por tanto la activación de PARP inducida por la rotura de DNA [J. Pharmacol. Exp. Ther. 315(2):812-20, 2005].

En años recientes, se ha descubierto asimismo que compuestos de estilbeno, por ejemplo el trans-resveratrol, activan Akt (Das, Fraga CG, Dad DK.: *Cardioprotective effect of resveratrol via HO-1 expression involves p38 map kinase and PI-3-kinase signaling, but does not involve NFkappa*. *Free Radic. Res.* 2006 Oct.; 40(10):1066-75.; Das S, Tosaki A, Bagchi D, Maulik N, Das DK: *Resveratrol-mediated activation of cAMP response element-binding protein through adenosine A3 receptor by Akt-dependent and -independent pathways*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005 Aug.; 314(2):762-9). Esta ha sido la base de la idea de que estos compuestos combinados con inhibidores de PARP podrían ser beneficiosos en enfermedades neurodegenerativas y de desmielinación.

Descubrimientos nuevos han expuesto que sustancias con estructura de tetraciclina ponen de manifiesto también efectos inhibidores de PARP. Por ejemplo, la minociclina inhibe la actividad de PARP en una concentración de 1 nanomol [Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 103(25):9.685-90, 2006]. Encuentros similares han sido obtenidos en los compuestos de tetraciclina que siguen: doxiciclina, demeclociclina, clorotetraciclina.

También se sabe que la doxiciclina en combinación con un compuestos de interferón (interferón beta 1 a) puso de manifiesto un efecto positivo en el tratamiento de múltiples esclerosis que remiten en recaída (RRMS) ( publicación en línea, *Archives of Neurology*, Diciembre 10, 2007).

No obstante, ninguno de los caminos anteriormente citados ha probado ser útil en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

La tensión oxidativa desempeña un papel importante en muchos procesos patológicos. Aquí pueden citarse perfiles clínicos cardio y cerebrovasculares que pertenecen a enfermedades de reperusión isquémica, tensión séptica, enfermedades neurodegenerativas, y también muerte celular como consecuencia de terapia antitumoral y antiviral. Especies reactivas con oxígeno y nitrógeno (ROS) formadas de modos diferentes inducen tensión oxidativa y dañan componentes intracelulares diferentes tales como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. La activación de PARP inducida por rotura de DNA es un mecanismo principal de muerte celular inducida por ROS, en la que los mediadores p53 y NFκB desempeñan un papel importante. Son similarmente importantes la activación de caminos

de la MAP quinasa inducidos por TNF y ROS. La integridad del sistema de membrana mitocondrial desempeña un papel acéntrico en la regulación de caminos de señal que conducen a daño celular así como que median en muerte celular.

- 5 Sin embargo, algunos genes activados por PARP y MAP quinasa no son conocidos o solo son parcialmente conocidos, y pueden desempeñar un papel importante en la patología oxidativa que media. No se sabe como actúan estos caminos de señalización actúan sobre la integridad mitocondrial, el sistema de producción de energía y el potencial de la membrana mitocondrial, y tampoco es conocido el efecto de la integridad mitocondrial sobre la regulación de los caminos de señalización.

### Compendio de la invención

- 10 La invención se basa en el reconocimiento de que el empleo de inhibidores de PARP y compuestos que activan la Akt quinasa (por ejemplo estrógenos y estilbenos), en combinación, dio como resultado una protección inesperada en modelos de enfermedades neurodegenerativas en modelos de animales relevantes. Es muy sorprendente que los efectos positivos medidos durante el empleo combinado son mayores que la suma de los efectos positivos de los componentes individuales, es decir, tiene lugar sinergia en el empleo combinado de los dos agentes activos,

### 15 Descripción detallada de la invención

En la combinación según la invención pueden emplearse las moléculas siguientes como inhibidores de PARP:

- 20 La 4-hidroxiquinazolina y sus derivados, por ejemplo compuestos de la solicitud de patente húngara publicada bajo el No. P0301173, aún más: Pálfi A, Tóth A, Kulcsár G, Hantó K, Deres P, Bartha E, Halmosi R, Szabados E., Czopf L, Kálai T, Hideg K, Sümegi B, Tóth K.: The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in Langendorff perfused and in isoproterenol-damaged rat hearts, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2005 Oct., 315(1):273-82.

- 25 El carboxamino-bencimidazol y sus derivados, por ejemplo los compuestos de la solicitud de patente húngara publicada bajo el No. P0400883, además: Kovacs K, Toth A, Deres P, Kalai T, Hideg K, Gallyas F Jr, Sumegi B.: Critical role of PI3-Kinase/Akt activation in the PARP inhibitor induced heart function recovery during ischemia-reperfusion, Biochem. Pharmacol., 2006 Feb 14, 71(4):441-52.

La 4-aminofalimida y sus derivados, por ejemplo: Sharma SS, Kumar A, Kaundal RK.: Protective effects of 4-amino-1,8-naphthalimide, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in experimental diabetic neuropathy, Life Sci., 2008 Mar 12, 82(11-12):570-6.

- 30 Homólogos de PJ34, por ejemplo: Szijártó A, Batmunkh E, Hahn O, Mihály Z, Kreiss A, Kiss A, Lotz G, Schaff Z, Váli L, Blázovics A, Geró D, Szabó C, Kupcsulik P: Effect of PJ-34 PARP-inhibitor on rat liver microcirculation and antioxidant status, J. Surg. Res., 2007 Sep. 142(1):72-80; Veres B, Gallyas F Jr, Varbiro G, Berente Z, Osz E, Szekeres G, Szabo C, Sumegi B.: Decrease of the inflammatory response and induction of the Akt/protein kinase B pathway by poli-(ADP-ribose) polymerase 1 inhibitor in endotoxin-induced septic shock, Biochem. Pharmacol., 2003 Apr 15, 65(8):1373-82.

- 35 Derivados de tetraciclina, por ejemplo: Conrad C. Alano, Tiina M. Kauppinen, Andreu Viader Valls, and Raymond A. Swanson: Minocycline inhibits poly(ADP-ribose)polymerase-1 at nanomolar concentrations, PNAS (2006) 103, 9685-9690- Algunos de estos compuestos son medicinas que están disponibles en el mercado (por ejemplo doxiciclina).

- 40 Los compuestos que activan la Akt quinasa empleados en la combinación según la invención, pueden ser compuestos de estrógeno, p.ej., estrona, corticosterona, dexametasona, estradiol, estriol y otros esteroides, p.ej. compuestos con la estructura de pregnano, preferiblemente prednisolona.

Se sabe que compuestos de estrógeno activan caminos de señalización de Akt quinasa PI-3 (*Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P.: Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. Curr Genomics, 2006 Nov; 7(8): 497-508.*) y favorecen el crecimiento celular y las refuerza contra diferentes situaciones de tensiones (*Patten RD, Karas RH: Estrogen replacement and cardiomyocyte protection, Trends Cardiovasc. Med- 2006 Apr; 16(3):69-75.*).

- 45 Por tanto. se supuso (sin quedar obligados nosotros mismos a esta teoría) que los materiales de tipo de estrógeno protegen las neuronas en diferentes enfermedades neurológicas.

- 50 En la combinación según la invención el compuesto que activa la Akt quinasa puede ser un compuesto de estructura de estilbeno cuyo compuesto pertenece familiarmente a polifenoles de origen vegetal. Son preferidos los compuestos de hidroestilbeno, por ejemplo el resveratrol. Esos compuestos activan el camino de Akt quinasa PI-3 y por tanto más probablemente refuerzan la resistencia de neuronas que puede conseguirse parcialmente por inhibición de fosfoinositida 3 quinasa fosfatasa y parcialmente por medio de otros mecanismos (*Das S, Khan N, Mukherjee S, Bagchi D, Gurusamy N, Swartz H.: DK-Redox regulation of Resveratrol-mediated Switching of Death Signal into Survival Signal, Free Radic. Biol. Med., 2008 Jan 1, 44(1):82-90.*). Además, este efecto puede reforzarse

también por antioxidantes generales, véase Shankar S, Singh G, Srivastava RK.: Chemoprevention by Resveratrol: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential, *Front Biosci.*, 2007 Sep 1, 12:4839-54.

5 Otros compuestos de estructura de estilbeno natural, que pueden emplearse en la combinación según la invención, están descritos en el artículo siguiente: M.T. Ribeiro de Lima et al.: Determination of Stilbenes (trans-Astringin, cis- and trans-Picid and cis- and trans-Resveratrol) in Portuguese Wines, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 2666-2670.

Es preferible el empleo de compuestos con la estructura de estilbeno debido a que el estrógeno es una hormona femenina por lo que la administración de ella a los hombres no es aconsejable.

10 En una realización preferida de la invención el inhibidor de PARP y el compuesto que activa la Akt quinasa se formulan en una unidad farmacéutica común. Esta unidad farmacéutica puede considerarse como una composición farmacéutica típica, a pesar del hecho de que contiene dos compuestos. La composición farmacéutica de la invención puede administrarse de modos diferentes, tanto oralmente, en una forma líquida o sólida, en una solución de una inyección o infusión, o incluso en otro tipo de composición, p.ej., como composición sublingual, parenteral o rectal.

15 En otra realización preferida, los compuestos diferentes se formulan en unidades farmacéuticas diferentes. Preferiblemente, estas unidades se colocan en kits, en los que el régimen de dosificación puede averiguarse del acondicionamiento de las unidades farmacéuticas, de las notas indicadas en el kit o de las pautas que se acompañan al kit. Puede emplearse cualquier método típico para preparar los kits, y no es necesario que las unidades farmacéuticas de los diferentes agentes activos se formulen del mismo modo (un compuesto puede ser una gragea mientras que el otro puede formularse como una inyección).

20 En cada una de las realizaciones es posible que se emplee más de un agente activo dentro del mismo grupo de los agentes activos (es decir, se emplea más de un inhibidor de PARP y/o más de un agente que activa Akt quinasa, incluso formulados de modo diferente), evidentemente en la cantidad necesaria para el tratamiento de la enfermedad dada. Así, en la especificación completa (es decir, también en el conjunto de reivindicaciones) la frase "un inhibidor de PARP" y "un agente que activa Akt quinasa" pueden significar realmente un único agente activo, pero también  
25 engloban aquellas posibilidades en que se emplea más de un representativo de tal tipo de agente activo.

30 Las composiciones administradas por vía oral podrían tener la forma de polvo, cápsula, gragea, gragea revestida con una película, microcápsula, etc., y pueden contener excipientes tales como, p.ej., gelatina, sorbitol, polivinilpirrolidona, agentes de llenado tales como p.ej., lactosa, glucosa, almidón, fosfato cálcico; materiales auxiliares para la fabricación de comprimidos tales como, p.ej., estearato magnésico, polietilenglicol, sílice; y agentes humectantes tales como p.ej. lauril sulfato sódico.

Las composiciones líquidas pueden ser soluciones, emulsiones a base de agua y también pueden ser un gel.

35 Dada la forma de las unidades farmacéuticas (composiciones farmacéuticas) según la invención, no es una faceta característica de la invención, y pueden emplearse para su preparación cualesquiera métodos, técnicas y materiales conocidos. Los ejemplos de los materiales y métodos aplicables pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Co., Easton, EE.UU., (1990).

Durante la determinación de la dosificación de los agentes activos empleados en combinación, un médico general comenzaría con la dosificación normal, pero debería considerar el estado general, edad, peso del paciente. Además, habría que tener en cuenta que, según el efecto sinérgico, dosificaciones menores pueden ejercer el efecto deseado. La dosificación aplicable puede determinarse por rutina sobre la base del conocimiento general del doctor.

40 Las combinaciones preferidas de la invención se exponen en los ejemplos próximos, sin pretender limitar el alcance de la invención a estas realizaciones.

### Resultados experimentales

El efecto combinado de inhibidores de PARP y de agentes que activan Akt quinasa (preferiblemente derivados de estrógeno o estilbeno) en cambios inducidos con cuprizona en el sistema nervioso central de ratones C57BL/6.

### 45 Descripción general del experimento

A menos que se exponga de otro modo se siguió el procedimiento operatorio siguiente de los ejemplos 1-4

### Animales

50 Durante el experimento los ratones C57BL/6 se mantuvieron en un medio ambiente estándar, recibieron agua normal y alimento de ratones molido *ad libitum*. Se tuvo cuidado de que los ratones se ajustaran a los requisitos éticos que se relacionan con el tratamiento de animales.

Según un método descrito previamente [*Journal of Neuroimmunology* 92 (1998): 38-49], ratones macho C57BL/6 de 7-8 semanas de edad se trataron durante 6 semanas *per os* con cuprizona (Sigma, Steinheim, Alemania). Los

ratones se dividieron en 5 grupos con 8 ratones en cada uno de los grupos. El primer grupo no recibió tratamiento, el segundo grupo se trató con cuprizona, mientras que los de los grupos 3 a 5 recibieron los agentes activos descritos en los ejemplos 1 a 4 (véanse los agentes activos de los ejemplos 3 a 5).

5 La cuprizona se mezcló en una concentración de 0,2 % p/p (% en peso) en el alimento molido. La oxidación de la cuprizona se evitó administrando alimento de nueva adquisición a los ratones cada uno de los días. Los inhibidores de PARP y/o los agentes que activan Akt quinasa se colocaron en solución salina fisiológica, se filtró para esterilidad, y se administraron intraperitonealmente en la dosificación apropiada. El tratamiento con los agentes activos se comenzó un día antes de la administración de cuprizona. Los animales testigo recibieron por vía i.p. una cantidad de solución fisiológica estéril que correspondía a sus masas corporales (pesos).

10 **MRI**

Se sabe según la bibliografía (NMR Biomed. 2005 Oct; 18(6):395-403), que la intensidad de imagen MRI (imagen por resonancia magnética) T1 y T2 se correlaciona con la degradación y regeneración de la vaina de mielina en este modelo. El edema y el hidrocefalo se registran como hiperintensidad en la imagen de T2. Para la cuantificación del hidrocefalo MRI es más adecuado que la histología debido a que durante el tratamiento de fijación e histológico hay una contracción y una degradación de volumen importantes (Exp. Neurology 118 (1992): 1-6) La técnica de imágenes micro de MRI hace posible estudiar los cambios anteriores *in vivo* durante semanas.

20 Al cabo de tres semanas, los ratones se colocaron en el instrumento de NMR en narcosis cada semana [5 mg/kg de peso de diazepam (Seduxen) y 90 mg/kg de peso de ketamina (Calypsol, Richter Gedeon Zrt., Budapest) por vía intraperitoneal]. Las imágenes de T1 y T2 se adquirieron con un espectrómetro de NMR <sup>UNITY</sup> INOVA de Varian desde el bulbo olfatorio hasta el comienzo de la médula espinal en cortes transversales de un grosor de 1 mm. La intensidad de señal de un tubo de vidrio de un diámetro interior de 1 mm, que se había llenado con una mezcla de agua-glicerina 9:1, se utilizó como control externo. El desarrollo y el tamaño de la desmielinización se determinó comparando la intensidad de señal media detectada en el área del cuerpo calloso con la intensidad media del control externo. La intensidad de señal media del cuerpo calloso (CC) se determinó por un experto ciego con respecto al experimento de la sección 1 mm posterior a la bregma, marcando manualmente la región de interés (ROI), es decir, el cuerpo calloso (CC). La intensidad de ROI se normalizó con respecto a la intensidad del tubo control.

25 El desarrollo y el grado de hidrocefalo se cuantificaron calculando la razón de volúmenes de cámara/cerebro. El área de las cámaras se perfiló manualmente en cada sección, y se calculó el volumen total como la suma de las áreas multiplicada por el grosor de las secciones (1 mm). Se empleó el mismo método para la determinación del volumen de las cámaras.

30 Los resultados se exponen en las tablas, por una parte, como la razón de volúmenes de cámara/cerebro valores (Razón vol.) y, por otra parte, como los valores de CC/tubo control que son las razones de las intensidades medidas en el cuerpo calloso (CC) y en el tubo de control.

**Ejemplos**

35 Ejemplo 1:

Tratamiento con doxiciclina (inhibidor de PARP-1) (1 mg/kg de peso) y estriol (0,4 mg/kg de peso)

Desmielinización después de 5 semanas de tratamiento, determinada con MRI

|   | CC/ tubo control |
|---|------------------|
| Sin tratar  | 0,6±0,11         |
| 40 Tratamiento con cuprizona                      | 1,4±0,15         |
| Tratamiento con cuprizona + doxiciclina           | 1,1±0,18         |
| Tratamiento con cuprizona + estriol               | 1,2±0,13         |
| Tratamiento con cuprizona + estriol + doxiciclina | 0,7±0,14         |

Hidrocefalo después de 5 semanas de tratamiento, determinado con MRI

|   | Razón vol. de cámara/cerebro |
|---|------------------------------|
| Sin tratar                              | 0,057±0,013                  |
| 45 Tratamiento con cuprizona            | 0,192±0,017                  |
| Tratamiento con cuprizona + doxiciclina | 0,128±0,012                  |

## ES 2 535 737 T3

|   |             |
|---|-------------|
| Tratamiento con cuprizona + estriol               | 0,134±0,02  |
| Tratamiento con cuprizona + estriol + doxiciclina | 0,067±0,014 |

### Ejemplo 2

- 5 Tratamiento con doxiciclina (inhibidor de PARP-1) (1 mg/kg de peso) y trans-resveratrol (0,4 mg/kg de peso)  
Desmielinización después de 5 semanas de tratamiento, determinada con MRI

|    |   | CC/tubo control |
|----|---|-----------------|
|    | Sin tratar  | 0,6±0,15        |
|    | Tratamiento con cuprizona                             | 1,5±0,12        |
| 10 | Tratamiento con cuprizona + doxiciclina               | 1,2±0,17        |
|    | Tratamiento con cuprizona + resveratrol               | 1,3±0,09        |
|    | Tratamiento con cuprizona + resveratrol + doxiciclina | 0,75±0,15       |

Hidrocéfalo después de 5 semanas de tratamiento, determinado con MRI

|    |   | Razón vol. de cámara/cerebro |
|----|---|------------------------------|
| 15 | Sin tratar  | 0,06±0,01                    |
|    | Tratamiento con cuprizona                             | 0,183±0,019                  |
|    | Tratamiento con cuprizona + doxiciclina               | 0,117±0,02                   |
|    | Tratamiento con cuprizona + resveratrol               | 0,138±0,017                  |
|    | Tratamiento con cuprizona + resveratrol + doxiciclina | 0,07±0,016                   |

### 20 Ejemplo 3

Tratamiento con 4-hidroxiquinazolina (4-HQ) (inhibidor de PARP-1) (20 mg/kg de peso) y trans-resveratrol (0,4 mg/kg de peso)

Desmielinización después de 5 semanas de tratamiento, determinada con MRI

|    |  | CC/ tubo control |
|----|--|------------------|
| 25 | Sin tratar                                     | 0,6±0,15         |
|    | Tratamiento con cuprizona                      | 1,5±0,12         |
|    | Tratamiento con cuprizona + 4-HQ               | 1,25±0,14        |
|    | Tratamiento con cuprizona + resveratrol        | 1,3±0,09         |
|    | Tratamiento con cuprizona + resveratrol + 4-HQ | 0,7±0,11         |

30 Hidrocéfalo después de 5 semanas de tratamiento, determinado con MRI

|    |  | Razón vol, de cámara/cerebro |
|----|--|------------------------------|
|    | Sin tratar                                     | 0,06±0,01                    |
|    | Tratamiento con cuprizona                      | 0,183±0,019                  |
|    | Tratamiento con cuprizona + 4-HQ               | 0,122±0,03                   |
| 35 | Tratamiento con cuprizona + resveratrol        | 0,138±0,017                  |
|    | Tratamiento con cuprizona + resveratrol + 4-HQ | 0,065±0,012                  |

Ejemplo 4

Tratamiento con carboxamino-bencimidazol (Carb) (inhibidor de PARP-1) (2 mg/kg de peso) y trans-resveratrol (0,4 mg/kg de peso)

Desmielinización después de 5 semanas de tratamiento, determinada con MRI

|    |  | CC/tubo control |
|----|--|-----------------|
| 5  | Sin tratar                                     | 0,6±0,15        |
|    | Tratamiento con cuprizona                      | 1,5±0,12        |
|    | Tratamiento con cuprizona + Carb               | 1,24±0,08       |
|    | Tratamiento con cuprizona + resveratrol        | 1,3±0,09        |
| 10 | Tratamiento con cuprizona + resveratrol + Carb | 0,72±0,13       |

Hidrocéfalo después de 5 semanas de tratamiento, determinado con MRI

|    |  | Razón vol. de cámara/cerebro |
|----|--|------------------------------|
|    | Sin tratar                                     | 0,06±0,01                    |
| 15 | Tratamiento con cuprizona                      | 0,183±0,019                  |
|    | Tratamiento con cuprizona + Carb               | 0,118±0,05                   |
|    | Tratamiento con cuprizona + resveratrol        | 0,138±0,017                  |
|    | Tratamiento con cuprizona + resveratrol + Carb | 0,063±0,010                  |

20 Los resultados han indicado sinergia entre los dos agentes dado que el tratamiento de combinación dio por resultado efectos significativamente mejores que la suma de los tratamientos separados.

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Combinación de un inhibidor de PARP seleccionado del grupo de compuestos de tetraciclina, carboxamido-bencimidazol y 4-hidroxi-quinazolina, con un compuesto que activa Akt quinasa seleccionado del grupo de compuestos de estrógeno y resveratrol, de empleo en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.
- 5 2.- La combinación de empleo según la reivindicación 1, donde el inhibidor de PARP y el compuesto que activa Akt quinasa se formulan en la misma unidad farmacéutica junto con excipientes utilizados generalmente en farmacia.
- 3.- La combinación de empleo según la reivindicación 1, donde el inhibidor de PARP y el compuesto que activa Akt quinasa se formulan en unidades farmacéuticas separadas junto con excipientes utilizados generalmente en farmacia, donde las unidades farmacéuticas que contienen los agentes activos diferentes se colocan en un kit y el kit  
10 contiene instrucciones para el régimen de dosificación.
- 4.- La combinación de empleo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de esclerosis múltiple, encefalomiелitis y enfermedad de Parkinson, Alzheimer y Huntington.
- 15 5.- Composición farmacéutica, que contiene un inhibidor de PARP seleccionado del grupo de compuestos de tetraciclina, carboxamido-bencimidazol y 4-hidroxi-quinazolina. en combinación con un compuesto que activa Akt quinasa seleccionado del grupo de compuestos de estrógeno y resveratrol, junto con excipientes utilizados generalmente en farmacia.