

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 504**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/155** (2006.01)  
**A61K 31/195** (2006.01)  
**A61K 31/37** (2006.01)  
**A61K 31/42** (2006.01)  
**A61K 31/4365** (2006.01)  
**A61K 31/55** (2006.01)  
**A61K 31/64** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2009 PCT/EP2009/055205**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2009 WO09133141**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2009 E 09738185 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2282778**

54 Título: **Nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados a través de una modulación de la angiogénesis**

30 Prioridad:

**29.04.2008 US 48583 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.07.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 622 504 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 el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados a través de una modulación de la angiogénesis

### Campo de la invención

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

10 La EA es una demencia cortical prototípica caracterizada por un déficit de la memoria junto con disfasia (trastorno del lenguaje en el que hay un deterioro del habla y de la comprensión del habla), dispraxia (incapacidad para coordinar y realizar ciertos movimientos y gestos intencionales en ausencia de impedimentos motores o sensoriales) y agnosia (capacidad de reconocer objetos, personas, sonidos, formas u olores) atribuibles a la participación de las áreas de asociación corticales. También pueden estar implicados síntomas especiales tales como la paraparesia espástica (debilidad que afecta a las extremidades inferiores) (1-4).

15 La incidencia de la enfermedad de Alzheimer aumenta drásticamente con la edad. La EA es actualmente la causa más común de demencia. Se caracteriza clínicamente por una disminución global de la función cognitiva que progresa lentamente y deja a los pacientes en su etapa final pegados a la cama, incontinentes y dependientes de la atención de su custodia. La muerte ocurre, en promedio, 9 años después del diagnóstico (5).

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

25 El deterioro de la memoria es la característica temprana de la enfermedad e implica la memoria episódica (memoria para los acontecimientos del día actual). La memoria semántica (memoria para el significado verbal y visual) está implicada más adelante en la enfermedad. Por el contrario, la memoria de trabajo (memoria a corto plazo que involucra estructuras y procesos utilizados para almacenar y manipular información temporalmente) y la memoria procedimental (memoria inconsciente que es una memoria a largo plazo de habilidades y procedimientos) se conservan hasta tarde. A medida que avanza la enfermedad, surgen las características adicionales del deterioro del lenguaje, las deficiencias visuales perceptivas y espaciales, las agnosias y las apraxias.

30 El cuadro clásico de la enfermedad de Alzheimer es suficientemente característico para permitir la identificación en aproximadamente el 80% de los casos (7). Sin embargo, la heterogeneidad clínica se produce y no sólo es importante para el manejo clínico, sino que proporciona una mayor implicación de los tratamientos de medicamentos específicos para las formas funcionalmente diferentes. (8).

35 El signo patológico de la EA incluye placas amiloides que contienen beta-amiloide (Abeta), enredos neurofibrilares (NFT) que contienen Tau y disfunción y pérdida 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 amiloide", que establece que el proceso neurodegenerativo es una serie de eventos desencadenados por el procesamiento anormal de la proteína precursora amiloide (APP) (12), y la "hipótesis de la degeneración del citoesqueleto neuronal" (13), que propone que los cambios citoesqueléticos son los eventos desencadenantes. La teoría más ampliamente aceptada que explica la progresión de la EA sigue siendo la hipótesis de la cascada amiloide (14-16) y los investigadores de la EA se han centrado principalmente en la determinación de los mecanismos subyacentes 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 amiloide, debido a preocupaciones tanto fundamentales como prácticas. Además, el cambio de densidad sináptica es la lesión patológica que mejor se correlaciona con el deterioro cognitivo que los otros dos. Los estudios han revelado que la patología amiloide parece progresar en una forma específica de los neurotransmisores donde los terminales colinérgicos aparecen más vulnerables, seguido por los terminales glutamatérgicos y finalmente por 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 los trastornos relacionados.

55 Los inventores han identificado una vía molecular que está implicada en la génesis de la EA y ofrece nuevos objetivos para el desarrollo de nuevos tratamientos para mejorar la EA y los trastornos relacionados, particularmente para el desarrollo de terapias de combinación usando moléculas nuevas o existentes previamente utilizadas en otras indicaciones. Más particularmente, los inventores han identificado varios fármacos que, solos o en combinación(s), pueden afectar efectivamente a dicha vía y representar una terapia nueva y eficaz para el tratamiento de la EA y trastornos relacionados.

Por lo tanto, la invención proporciona nuevas composiciones y métodos para tratar la enfermedad EA y los trastornos relacionados.

5 Más particularmente, la invención es como se define en las reivindicaciones. La invención también describe composiciones adecuadas para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado en un sujeto que lo necesite, en el que dichas composiciones comprenden un fármaco que aumenta la angiogénesis.

Otra descripción de esta invención se refiere a composiciones adecuadas para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado en un sujeto que lo necesite, en el que dichas composiciones comprenden una combinación de al menos dos fármacos que aumentan la angiogénesis, para su administración combinada, separada o secuencial.

10 Más preferiblemente, el fármaco o los fármacos que aumentan la angiogénesis se unen o modulan la actividad de una proteína codificada por un gen seleccionado de ABCA1, ACAT, ACC2, ADAMTS12, ADCY2, ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2, ADRB2, AGPAT5, AIP4, AKAP2, AKR1C2, AMPK, ANG2, ANK1, ANXA1, APOA1, ARHGAP17, ATP10A, AUH, AUTOTAXINA, BAI3, BCAR1, BIN1, BMP3A, CA10, CAMK1D, CAMKK2, CD36, CD44, CDC42, CDH13, CHAT, CNTFR, COL4A2, CPT, CSH1, CTNN, CUBN, CYP7B1, CYSLTR1, CYSLTR2, DGKB, DGKH, DGKZ, DHCR7, DHFR, DRD2, DRD5, EDG1, EDG2, EDG3, EDG4, EDG5, EDG6, EDG7, EDG8, EDNRA, EHHADH, ENPP6, ERBB4, ERK1, ERK2, ESRRG, ETFA, F2, FDPS, FGF2, FLNA, FLT4, FOXO1, FOXO3A, FTO, GABBR2, GATA3, GH1, GNA12, GNA13, GRK2, GRK5, GRM5, HAPLN1, HAS1, HAS2, HAS3, HCRTR2, HIF1A, HSD11B1, HYAL1, HYAL2, HYAL3, IL20RA, IL20RB, IL6ST, IL8, ITGA6, ITGB1, KDR, LAMA1, LDLR, LEPR, LEPTIN, LIFR, LIPL2, LKB1, LRP, LTBP2, MAT2B, ME1, MEGALIN, MERLIN, MET, MGST2, MMP2, MMP9, MTOR, MTR, NCK2, NEDD9, NFKB1, NFKBIB, NOS2A, NOS3, NR1I2, NR3C2, NRG1, NRP1, NRP2, OPRS1, OSBPL10, OSBPL3, OSTEOPONTINA, P2RY1, P2RY12, PAI1, PAI2, PAK1, PAK6, PALLD, PAP1, PAR1, PAXILLINA, PC, PCTP, PDE11A, PDE1A, PDE3A, PDE4D, PDE5, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PI3K, PITPNC1, PKA, PKCD, PLA1A, PLA2, PLAT, PLAU, PLCB1, PLD1, PLD2, PLG, PLXDC2, PPARA, PPARG, PPARGC1B, PRKG1, PRL, PTGS2, PTN, PTPN11, PYK2, RAC1, RAS, RHEB, RHOA, ROCK1, ROCK2, RPS6KA1, RPS6KB2, SCARB1, SCHIP1, SGPP2, SLC25A21, SMAD3, SMAD4, SNCA, SORBS2, SPLA2, SPOCK1, SRD5A1, SREBF1, SREBF2, STAT3, TGFB1, TGFB2, TGFB3, THBS1, THBS2, THEM2, THRB, TIAM1, TIMP2, TLL2, TSC1, TSC2, TSPO, VEGFA, VEGFR1 y YES1.

30 La invención también describe ejemplos de tales fármacos que incluyen compuestos seleccionados de acamprosato, albuterol, alendronato, ambrisentan, ácido aminocaproico, argatroban, baclofeno, balsalazida, becaplermina, cabergolina, cilostazol, clopidogrel, desirudina, dihidroergotamina, eplerenona, fenoldopam, fludrocortisona, flunitrazepam, gemfibrozil, hesperetina, imatinib, cetotifeno, leflunomida, L-histidina, lioterona, marimastat, meloxicam, mepacrina, metacolamida, metimazol, milrinona, montelukast, netilmicina, nitroglicerina, nitroprusiato, pegaptanib, pentazocina, fenformina, fenilbutirato de sodio, pirimetamina, sulfisoxazol, sunitinib, tadalafil, temazepam, terbinafina, tilitperazina, tirofiban, topiramato, topotecan, vidarabina y warfarina, o una combinación de los mismos.

La invención también describe composiciones que comprenden además al menos un fármaco que modula la función de sinapsis, para su uso combinado, separado o secuencial.

Esta invención también describe composiciones que comprenden además al menos un fármaco que modula la respuesta de estrés celular, para su uso combinado, separado o secuencial.

40 Las composiciones de esta invención típicamente comprenden además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se describe en esta invención un método para producir un fármaco para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, comprendiendo el método una etapa de probar un fármaco candidato para la actividad sobre la angiogénesis y seleccionar fármacos candidatos que aumenten la angiogénesis.

45 La invención también describe un método para producir una composición para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, comprendiendo el método la preparación de una combinación de un fármaco que aumenta la angiogénesis y un fármaco que modula la función de sinapsis o la respuesta de estrés celular y la formulación de dicha combinación de fármacos para su administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto que lo necesite.

50 La invención describe además un método para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, comprendiendo el método administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente a un sujeto que lo necesite un fármaco o una combinación de fármacos que aumenten la angiogénesis.

55 La invención describe además un método para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado, comprendiendo el método administrar simultáneamente, de forma separada o secuencial, a un sujeto que lo necesite un fármaco que incremente la angiogénesis y un fármaco que module la función sinapsis y/o un fármaco que module la respuesta al estrés celular.

La invención describe además el uso de un fármaco que aumenta la angiogénesis para la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado.

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

Como se discute en la presente solicitud, las terapias anteriores y terapias de combinación proporcionan enfoques novedosos y eficaces para tratar la EA en sujetos humanos.

Breve descripción de las figuras

10 Fig. 1: Efecto protector de fármacos seleccionados contra la toxicidad del péptido beta-amiloide sobre la liberación de LDH de células cerebrales endoteliales de rata.  $\diamond$  : p <0,05: significativamente diferente del vehículo \*\*: p <0,01; \*\*\*: p <0,0001; \*\*\*\*: p <0,00001: significativamente diferente de A  $\beta$  25-35. Prueba Bilateral Student t. A  $\beta$  25-35 30  $\mu$ M produce una intoxicación moderada pero significativa (Fig. 1-A a D, en rojo). Esta intoxicación es significativamente prevenida por Leflunomida (Fig1A), Terbinafina (Fig1B), Sulfisoxazol (Fig1C) o Baclofen (-) (Fig1D). Además, Leflunomide y Terbinafina no sólo previenen el efecto deletéreo amiloide, sino que también disminuyen la muerte celular espontánea en el medio de cultivo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos enfoques terapéuticos para tratar la EA o trastornos relacionados. La invención describe un uso novedoso de fármacos o combinaciones de fármacos que permiten una corrección eficaz de tales enfermedades y pueden utilizarse para el tratamiento del paciente.

20 La expresión "trastorno relacionado con la EA" designa a la enfermedad de Alzheimer (EA), la demencia senil del tipo EA (SDAT), la enfermedad de Parkinson, la demencia del cuerpo de Lewis, la demencia vascular, el deterioro cognitivo leve (MCI), deterioro de la memoria asociado a la edad (AAMI) y el problema asociado con el envejecimiento, Parkinsonismo post-encefáltico, ALS y Síndrome de Down.

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

30 El término "aumento", cuando se refiere a la angiogénesis, incluye cualquier aumento en la angiogénesis en comparación con el nivel existente en el sujeto. Tal mejoría puede incluir una restauración, es decir, a niveles normales, o un aumento menor, que son todavía suficientes para mejorar la condición del paciente. Tal incremento puede ser evaluado o verificado usando ensayos biológicos conocidos, tal como se describe en la sección experimental.

35 El término "combinación" designa un tratamiento en el que al menos dos o más fármacos son coadministrados a un sujeto para provocar un efecto biológico. En una terapia combinada de acuerdo con esta invención, los al menos dos fármacos se pueden administrar juntos o por separado, al mismo tiempo o secuencialmente. Además, los al menos dos fármacos pueden administrarse a través de diferentes rutas y protocolos. Como resultado, aunque puedan formularse conjuntamente, los fármacos de una combinación también pueden formularse por separado.

Como se discutió anteriormente, la invención describe composiciones y métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno relacionado en un sujeto que lo necesite, usando un fármaco o una combinación de fármacos que aumenta la angiogénesis.

40 Mediante una amplia integración de datos experimentales que cubren resultados de estudios de biología celular, experimentos de perfil de expresión y estudios de asociación genética, describiendo diferentes aspectos de la enfermedad de Alzheimer y enlaces existentes en la señalización celular y vías funcionales, los inventores han descubierto que la angiogénesis representa un mecanismo importante que es alterado en sujetos con EA. Los genes situados en dicha red funcional e implicados en la enfermedad de Alzheimer se seleccionaron por los siguientes criterios:

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

50 A través de este proceso, los inventores pudieron establecer que la red responsable de la angiogénesis es una red funcional importante afectada en la enfermedad de Alzheimer.

La angiogénesis juega un papel fundamental en asegurar una homeostasis tisular y en respuestas adaptativas a desafíos ambientales y fisiológicos tales como hipoxia o cicatrización de heridas; su disfunción contribuye a la patogénesis de numerosas y heterogéneas patologías que van desde las complicaciones cardiovasculares hasta el crecimiento del tumor y las metástasis.

- 5 Aunque la enfermedad de Alzheimer es tradicionalmente considerada como una afección neurodegenerativa acompañada de patología vascular colateral, el análisis de los inventores permite la reevaluación del impacto patogénico de la disregulación vascular y atribuye un papel importante y probablemente causal a las vías angiogénicas en la etiología de esta enfermedad. Los inventores han encontrado que los genes que regulan la angiogénesis están extremadamente enriquecidos en las redes de señalización implicadas en la enfermedad de Alzheimer. Esta conclusión tiene profundas consecuencias para la prevención y curación de la enfermedad de Alzheimer y proporciona nuevas directrices para el tratamiento combinatorio de este complejo trastorno neurodegenerativo. También se encontró que esta red podría formalmente subdividirse en las familias de los factores angiogénicos y de las proteínas de las dos vías (vía AMPK y la vía metabólica LPA) estrechamente involucradas en la regulación de la angiogénesis.
- 10
- 15 La proteína amiloide Abeta afecta fuertemente no sólo a la biología de las neuronas, sino que posee también una fuerte actividad anti-angiogénica (17). Otro gen, causalmente asociado con casos familiares de enfermedad de Alzheimer - la presinilina es capaz de modular - mediante la regulación de la proteólisis intramembrana - la angiogénesis a través de varias vías de señalización independientes mediadas por sus sustratos funcionales VEGFR1, ErbB4, Notch, DCC, CD44, receptores ephrin y cadherinas (18 - 20).
- 20 El gen CD44 codifica un receptor para el ácido hialurónico (HA), cuyos productos de degradación promueven la angiogénesis (21). Este receptor estaba implicado en la organización y/o estabilización de los endotelios de vasos en formación o recién formados (22). También puede unirse y regular la actividad de proteínas tales como osteopontina, colágenos y metaloproteinasas de matriz (MMP) implicadas en la dinámica de la matriz extracelular, que acompaña a la formación de nuevos vasos sanguíneos (23).
- 25 Otros receptores de membrana identificados por la recopilación de datos de los inventores incluyen IL20R $\alpha$ , LEPTR, NRP1 y NRP2, y el receptor endotelina EDNRA. El gen IL20R $\alpha$  codifica un receptor para IL20, una citocina pleiotrópica implicada en la formación de un tubo vascular (24). La leptina, una hormona endocrina y ligando para LEPTR, estimula la angiogénesis sinérgicamente con el factor de crecimiento de fibroblastos FGF-2 y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), los dos factores angiogénicos más potentes y ubicuos expresados. Además, participa en el aumento de la permeabilidad vascular (25). NRP1 y NRP2 son co-receptores transmembrana que modulan la activación de la señalización de VEGFR-2, lo que asegura la angiogénesis de desarrollo (26).
- 30

Finalmente, se seleccionó un grupo de genes implicados en la organización y remodelación de la matriz extracelular (THBS2, LAMA1, COL4A2, ADAMTS12 y ADAM10) o en el procesamiento funcional (TLL2) de moduladores angiogénicos bien conocidos tales como prolactina, hormona del crecimiento y lactogen de placenta (27).

- 35 La familia de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) se reconoce como un sensor intracelular de la relación AMP:ATP y desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis energética mediante la regulación de los procesos metabólicos, tales como el metabolismo de la glucosa o de los ácidos grasos. Esta familia de serina/treonina quinasas se activa por estrés metabólico que inhibe la producción de ATP o estimula el consumo de ATP (28).
- 40 Además de su papel bien establecido en el control del balance energético celular, la señalización de AMPK es también un regulador de la angiogénesis necesario para la migración y diferenciación de las células endoteliales en condiciones de hipoxia (29). Esta quinasa es uno de los efectores aguas abajo responsable de los efectos pro-angiogénicos de VEGF (30), adiponectina (31), IGF-1 y, probablemente, el receptor PPAR $\gamma$ . Se ha descubierto que la AMPK está activada anormalmente en ratones APP/PS2 doblemente transgénicos, un modelo in vivo de la enfermedad de Alzheimer (32).
- 45

- Los inventores han identificado varios genes asociados con la enfermedad de Alzheimer y que representan tanto a moduladores aguas arriba como efectores aguas abajo de las quinasas activadas por AMP. Entre los moduladores aguas arriba de las proteínas AMPK, los receptores de leptina y CNTF, se pueden mencionar CDH13 (33), un co-receptor putativo para adiponectina Acrp30 y vías de señalización de trombina, así como la quinasa CAMKK2 $\beta$  que, junto con la quinasa LKB1, se reconoce como un principal modulador directo de la actividad de AMPK (28).
- 50

- En cuanto a los efectores aguas abajo de la AMPK, los genes implicados en los ácidos grasos y el metabolismo del colesterol representan un interés particular. En particular, el gen ACC2, objetivo bien establecido de la señalización de AMPK, codifica la acetil-CoA carboxilasa (ACC) que cataliza la carboxilación dependiente de ATP de acetil-CoA frente a malonil-CoA y, por tanto, controla la etapa de limitación de velocidad en la síntesis de ácidos grasos. La AMPK activada fosforila la proteína ACC2, disminuye su actividad enzimática y por lo tanto mejora la oxidación de ácidos grasos. Varios otros genes, principalmente mitocondriales, implicados en el metabolismo de los ácidos grasos, tales como la EFTA, AUH, SLC25A21, PC, ME1 y EHHADH, también podrían participar en el control mediado por AMPK del balance de energía celular en el contexto de la enfermedad de Alzheimer. Entre ellos, el gen
- 55

PC codifica la piruvato carboxilasa y está implicado en múltiples vías metabólicas, tales como gluconeogénesis, lipogénesis y síntesis del neurotransmisor glutamato. Se ha demostrado que el deterioro en la actividad de PC podría estar relacionado con la disfunción cerebral (34-35). Curiosamente, el receptor GABA(B) también fue identificado como un objetivo funcional para la quinasa activada por AMP. Un estudio reciente demostró que la activación de AMPK podría ser neuroprotectora, a través de la fosforilación del receptor GABA(B) (36), y así podría participar en la progresión de la patología amiloide dirigida a terminales GABAérgicos (11).

Además, la vía de señalización de AMPK podría modificar la evolución de las lesiones asociadas a la enfermedad de Alzheimer al influir en el metabolismo del colesterol. AMPK puede influir en el metabolismo del colesterol mediante la reducción de la actividad de factores de transcripción SREBP (37). Las proteínas SREBP son los principales sensores y reguladores de los niveles de colesterol intracelular; siendo activadas por clivaje proteolítico cuando el nivel de colesterol disminuye, las SREBP se unen a un elemento regulador de esterol específico (SRE) en regiones promotoras de genes que codifican enzimas, implicadas en la biosíntesis de colesterol y mejoran su transcripción.

El colesterol no sólo sirve como precursor de la biosíntesis de esteroides neuroprotectores, sino que también se reconoce como un importante regulador de la fluidez de la membrana y desempeña un papel fundamental en la dinámica de las balsas lipídicas, concentrando plataformas para una variedad de moléculas involucradas en la clasificación de membranas, tráfico y transducción de la señal. Los productos intermedios en la biosíntesis del colesterol generados por farnesil-PP y geranieranil-PP sintetas desempeñan un papel fundamental en la actividad moduladora de pequeñas GTPasas, incluyendo RhoA y Rac, que son los principales reguladores de la angiogénesis y el crecimiento del axón.

Varios otros genes implicados en el metabolismo del colesterol y el transporte también podrían influir en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Las proteínas DHCR7, SRD5A1 y CYP7B1 están implicadas en la producción de esteroides que podrían proteger las células neuronales contra los insultos tóxicos asociados con la enfermedad de Alzheimer (38). El gen ABCA1 que codifica un miembro de la familia de transportadores de casetes de unión a ATP (ABC) también representa un interés particular, ya que controla la secreción de la lipoproteína ApoE, el principal factor de riesgo de predisposición para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (39).

El ácido fosfatídico (PA), el ácido lisofosfatídico (LPA) y la esfingosina 1-fosfato (S1P) son fosfolípidos naturales que poseen potentes propiedades de señalización. En particular, estos factores de crecimiento de fosfolípidos muestran efectos divergentes sobre el potencial angiogénico de las células endoteliales y podrían, de manera complementaria combinada, inducir eficazmente la neovascularización. S1P participa principalmente en la promoción de la migración quimiotáctica de las células endoteliales, mientras que LPA está más implicado en la estabilización de la función de barrera de monocapa endotelial en las últimas etapas en la angiogénesis (40).

El LPA afecta la angiogénesis ya sea modulando la actividad de la RhoA GTPasa o mediante la potenciación de la expresión de varios factores angiogénicos - VEGF, PDGFB e IL-8 (41-45). Además de su estrecha participación en la angiogénesis, el LPA también se reconoce como una señal de lípidos extracelulares que provoca el colapso del cono de crecimiento de las neuritas e influye en la migración de las neuronas posmitóticas tempranas durante el desarrollo (46).

El LPA puede ser sintetizado por una lisofosfolipasa D secretada (autotaxina) y actúa a través de receptores EDG2, EDG4 y EDG7 acoplados a proteínas G específicos que afectan a la proliferación celular, la supervivencia y la motilidad (47). Lo más probable es que la capacidad del LPA para controlar la morfología celular y la motilidad está mediada por la activación del módulo de señalización RhoA-ROCK a través de la proteína G<sub>12/13</sub> (48).

Algunos datos experimentales indican un papel importante para la señalización mediadora de LPA en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Se ha demostrado que la expresión de la autotaxina se incrementa en la corteza frontal de los pacientes con demencia de tipo Alzheimer (49) y la retracción de las neuritas inducida por LPA in vitro se acompaña de un patrón de fosforilación de la proteína tau similar a la enfermedad de Alzheimer en células de neuroblastoma humano diferenciadas (50). Además, las manipulaciones genéticas con APP o las proteínas de presenilina afectan la expresión de la enzima autotoxina en los cerebros de los ratones transgénicos (51-52).

Usando el enfoque de recolección de datos de los inventores, se han identificado un gran número de genes, implicados en el metabolismo de LPA o modulados por la señalización de LPA y potencialmente vinculados a la progresión de la enfermedad de Alzheimer (MTR, MAT2B, CUBN, ATP10A, THEM2, PTPN1, ENPPG, SGPP2, AGPAT, DGKH, DGKB, MGST2, PLD2 y DRD2). Entre ellos, el gen CUBN codifica un receptor de factor intrínseco de vitamina B12, mientras que la deficiencia de biodisponibilidad de folato y cobalamina (vitamina B9 y B12) se asoció previamente con la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (53).

En la presente invención, los inventores describen composiciones novedosas, que pueden usarse para aumentar la angiogénesis alterada en la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurogenerativos.

En una realización particular, las composiciones y métodos de tratamiento de EA descritas en esta invención usan fármacos que aumentan la angiogénesis a través de su interacción con o la modulación de un gen o proteína como se ha mencionado anteriormente.

Más específicamente, dichas composiciones comprenden un fármaco o fármacos que aumentan la angiogénesis a través de la unión o modulación de la actividad de una proteína codificada por un gen seleccionado de ABCA1, ACAT, ACC2, ADAMTS12, ADCY2, ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2, ADRB2, AGPAT5, AIP4, AKAP2, AKR1C2, AMPK, ANG2, ANK1, ANXA1, APOA1, ARHGAP17, ATP10A, AUH, AUTOTAXINA, BA13, BCAR1, BIN1, BMP3A, CA10, CAMK1D, CAMKK2, CD36, CD44, CDC42, CDH13, CHAT, CNTFR, COL4A2, CPT, CSH1, CTNN, CUBN, CYP7B1, CYSLTR1, CYSLTR2, DGKB, DGKH, DGKZ, DHCR7, DHFR, DRD2, DRD5, EDG1, EDG2, EDG3, EDG4, EDG5, EDG6, EDG7, EDG8, EDNRA, EHHADH, ENPP6, ERBB4, ERK1, ERK2, ESRRG, ETFA, F2, FDPS, FGF2, FLNA, FLT4, FOXO1, FOXO3A, FTO, GABBR2, GATA3, GH1, GNA12, GNA13, GRK2, GRK5, GRM5, HAPLN1, HAS1, HAS2, HAS3, HCRTR2, HIF1A, HSD11B1, HYAL1, HYAL2, HYAL3, IL20RA, IL20RB, IL6ST, IL8, ITGA6, ITGB1, KDR, LAMA1, LDLR, LEPR, LEPTIN, LIFR, LIPL2, LKB1, LRP, LTBP2, MAT2B, ME1, MEGALIN, MERLIN, MET, MGST2, MMP2, MMP9, MTOR, MTR, NCK2, NEDD9, NFKB1, NFKB1B, NOS2A, NOS3, NR1I2, NR3C2, NRG1, NRP1, NRP2, OPRS1, OSBPL10, OSBPL3, OSTEOPONTINA, P2RY1, P2RY12, PAI1, PAI2, PAK1, PAK6, PALLD, PAP1, PAR1, PAXILLINA, PC, PCTP, PDE11A, PDE1A, PDE3A, PDE4D, PDE5, PDGFA, PDGFB, PDGFR, PDGFRB, PI3K, PITPNC1, PKA, PKCD, PLA1A, PLA2, PLAT, PLAU, PLCB1, PLD1, PLD2, PLG, PLXDC2, PPARA, PPARC, PPARGC1B, PRKG1, PRL, PTGS2, PTN, PTPN11, PYK2, RAC1, RAS, RHEB, RHOA, ROCK1, ROCK2, RPS6KA1, RPS6KB2, SCARB1, SCHIP1, SGPP2, SLC25A21, SMAD3, SMAD4, SNCA, SORBS2, SPLA2, SPOCK1, SRD5A1, SREBF1, SREBF2, STAT3, TGFB1, TGFB2, TGFB3, THBS1, THBS2, THEM2, THRB, TIAM1, TIMP2, TLL2, TSC1, TSC2, TSPO, VEGFA, VEGFR1, y YES1.

Las secuencias de todos los genes y proteínas enumerados anteriormente están disponibles en bibliotecas de genes y pueden aislarse mediante técnicas conocidas en la técnica. Además, la actividad de estos genes y proteínas puede evaluarse mediante técnicas conocidas per se en la técnica, como se discute en la sección experimental.

La invención describe además fármacos que pueden usarse para modular estos genes y proteínas diana. La invención describe la identificación y la actividad de fármacos particulares que, bien solos pero preferentemente en combinación(s), modulan la vía anterior y pueden usarse para tratar dichas enfermedades. En particular, se han identificado pequeñas moléculas que ya existen en la literatura, pero que se utilizan para tratar enfermedades distintas en sujetos humanos.

A este respecto, las composiciones descritas en esta invención comprenden al menos un inhibidor de ACAT (preferiblemente, hesperetina), un modulador de ADCY2 (preferiblemente, vidarabina), un modulador de AMPK (preferiblemente seleccionado entre fenformina y vidarabina), un modulador de AMPK de AUTOTAXINA (preferiblemente, L-histidina), un inhibidor de CA10 (preferiblemente, metazolamida), un antagonista de CYSLTR1 y CYSLTR2 (preferiblemente montelukast), un inhibidor de DHFR (preferiblemente, pirimetamina), un modulador de DRD2 (preferiblemente seleccionado de dihidroergotamina y cabergolina), un agonista del receptor de dopamina DRD5 (preferiblemente, fenoldopam), un antagonista de EDNRA (preferiblemente, sulfisoxazol), un modulador de F2 (preferiblemente, warfarina), un inhibidor de FDPS (preferiblemente alendronato), un modulador de GABBR2 (preferiblemente seleccionado de baclofeno y acamprosato), un modulador de HAS1-3 de hialuronan sintasas (preferiblemente, leflunomida), un modulador de HIF1A (preferiblemente seleccionado entre topotecán y meloxicam), un modulador de MGST2 (preferiblemente, balsalazida), un modulador de MMP2 y MMP9 (preferiblemente, marimastat), un modulador de NOS2A (preferiblemente seleccionado entre gemfibrozilo, albuterol y títiperazina), un modulador de NOS3 (preferiblemente, cetotifeno), un agonista de NR1I2 (preferiblemente, topiramato), un modulador de NR3C2 (preferiblemente seleccionado entre eplerenona y fludrocortisona), un agonista de OPRS1 (preferiblemente pentazocina), un modulador de P2RY1 y P2RY12 (preferiblemente seleccionado entre clopidogrel y tirofiban), un inhibidor del receptor de trombina PAR1 (preferiblemente, argatroban), un inhibidor de PDE11A (preferiblemente, tadalafil), un inhibidor de PDE3A (preferiblemente, cilostazol), un inhibidor de PDE4D (preferiblemente, milrinona), un modulador de PDGFRA y PDGFRB (preferiblemente seleccionado de becaperlina e imatinib), un inhibidor de fosfo lipasas PLA1A y PLA2 (preferiblemente seleccionadas entre netilmicina y mepacrina), un modulador de PLAT (preferiblemente fenilbutirato), un modulador de PLD2 (preferiblemente seleccionado entre ambrisentano y fenoldopam), un modulador de PLG (preferiblemente, ácido aminocaproico), un agonista de PPARA (preferiblemente, gemfibrozilo), un agonista de PPARG (preferiblemente fenilbutirato sódico), un activador de PRKG1 (preferiblemente seleccionado entre nitroprusiato, nitroglicerina, tadalafil y cilostazol), un modulador de RHOA (preferiblemente seleccionado entre alendronato y terbinafina), un modulador de THRB (preferiblemente seleccionado entre liotironina y metimazol), un inhibidor de TROMBIN (preferiblemente, desirudin), un modulador de TSPO (preferiblemente seleccionado de flunitrazepam y temazepam), y/o un antagonista de VEGFR1 (preferiblemente seleccionado entre sunitinib y pegaptanib).

Como se ha expuesto anteriormente, la invención describe en particular el diseño de terapias de combinación para abordar los mecanismos de la EA y los trastornos relacionados. A este respecto, se describen a continuación ejemplos de combinaciones de diana y fármacos más preferidos.

Más preferiblemente, la composición descrita en esta invención comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, para administración combinada, separada o secuencial:

- un modulador del receptor GABBR2 (preferiblemente baclofeno) y un modulador de RHOA (preferiblemente terbinafina),

- un modulador del receptor GABBR2 (preferiblemente, baclofeno) y un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente sulfóxazol),
- un modulador del receptor GABBR2 (preferiblemente, baclofeno) y un modulador de HAS1-3 hialuronan sintasas (preferiblemente, leflunomida)
- 5 - un modulador de RHOA (preferiblemente, terbinafina) y un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente, sulfisoxazol),
- un modulador de RHOA (preferiblemente terbinafina) y un modulador de HAS1-3 hialuronan sintasa (preferiblemente, leflunomida),
- 10 - un modulador de RHOA (preferiblemente terbinafina) y un agonista del receptor de dopamina DRD5 (preferiblemente, fenoldopam),
- un modulador de RHOA (preferiblemente terbinafina) y un inhibidor de fosfolipasas PLA1A y PLA2 (preferiblemente, mepacrina),
- un modulador de RHOA (preferiblemente terbinafina) y un modulador de AMPK (preferiblemente fenformina),
- 15 - un modulador de RHOA (preferiblemente terbinafina) y un modulador de receptores purinérgicos P2RY1 y P2RY12 (preferiblemente clopidogrel),
- un modulador del receptor GABBR2 (preferiblemente, baclofeno) y un modulador de AMPK (preferiblemente fenformina),
- 20 - un modulador del receptor GABBR2 (preferiblemente, baclofeno) y un modulador de receptores purinérgicos P2RY1 y P2RY12 (preferiblemente, clopidogrel),
- un modulador de RHOA (preferiblemente, terbinafina) y un modulador de receptores purinérgicos
- un antagonista del receptor de endotelina EDNRA (preferiblemente sulfóxazol) y un modulador de AMPK (preferiblemente, fenformina),
- 25 - un modulador de HAS1-3 de hialuronan sintasas (preferiblemente, leflunomida) y un agonista del receptor de dopamina DRD5 (preferiblemente fenoldopam), o
- un modulador de HAS1-3 de hialuronan sintasas (preferiblemente, leflunomida) y un inhibidor de fosfolipasas PLA1A y PLA2 (preferiblemente, mepacrina).

Ejemplos de las composiciones descritos en esta invención comprenden un compuesto seleccionado entre acamprosato, albuterol, alendronato, ambrisentan, ácido aminocaproico, argatroban, baclofeno, balsalazida, becaplermina, cabergolina, cilostazol, clopidogrel, desirudina, dihidroergotamina, eplerenona, fenoldopam, fludrocortisona, flunitrazepam, gemfibrozil, hesperetina, imatinib, cetotifeno, leflunomida, L-histidina, liotironina, marimastat, meloxicam, mepacrina, metazolamida, metimazol, milrinona, montelukast, netilmicina, nitroglicerina, nitroprusiato, pegaptanib, pentazocina, fenformina, fenilbutirato de sodio, pirimetamina, sulfisoxazol, sunitinib, tadalafil, temazepam, terbinafina, titilperazina, tirofiban, topiramato, topotecan, vidarabina y warfarina, o una combinación de los mismos.

En una realización preferida, la invención se refiere a composiciones para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que comprenden al menos un compuesto elegido de terbinafina o baclofeno, o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para la administración simultánea, separada o secuencial.

En otra realización preferida, las composiciones para uso de acuerdo con la invención comprenden además al menos un compuesto adicional distinto elegido del grupo que consiste en leflunomida, sulfisoxazol, terbinafina, baclofeno, clopidogrel, fenoldopam, mepacrina y fenformina, o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para la administración simultánea, separada o secuencial.

La presente invención también describe composiciones que comprenden una combinación de al menos dos compuestos elegidos del grupo que consiste en leflunomida, sulfisoxazol, terbinafina, baclofeno, clopidogrel, fenoldopam, mepacrina y fenformina, o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, en los que dicha composición aumenta la angiogénesis alterada en trastornos neurodegenerativos seleccionados del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y esclerosis múltiple (EM).

La presente invención también describe composiciones que comprenden una combinación de al menos dos compuestos elegidos del grupo que consiste en leflunomida, sulfisoxazol, terbinafina, baclofeno, clopidogrel,

fenoldopam, mepacrina y fenformina, o sales o profármacos o derivados o formulaciones de liberación sostenida para tratar la enfermedad de Alzheimer (EA).

Preferiblemente, la composición para tratar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que lo necesite comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos para administración combinada, separada o secuencial:

- 5 - baclofeno y terbinafina,
- baclofeno y sulfisoxazol,
- baclofeno y leflunomida,
- terbinafina y sulfisoxazol,
- terbinafina y leflunomida,
- 10 - terbinafina y fenoldopam,
- terbinafina y mepacrina,
- terbinafina y fenformina,
- terbinafina y clopidogrel,
- baclofeno y fenformina,o
- 15 - baclofeno y clopidogrel.

En una realización preferida, la composición de la invención comprende una combinación de terbinafina y baclofeno o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para administración simultánea, separada o secuencial.

- 20 Otra composición descrita en la invención comprende uno o más compuestos seleccionados entre leflunomida, terbinafina, sulfisoxazol y baclofeno, o sales o profármacos o 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 aumenta la angiogénesis, para uso combinado, separado o secuencial.

- 25 Preferiblemente, dicho fármaco adicional que aumenta la angiogénesis se selecciona de un inhibidor de ACAT (preferiblemente, hesperetina), un modulador de ADCY2 (preferiblemente, vidarabina), un modulador de AMPK (preferiblemente, vidarabina), un modulador de AUTOTAXINA (preferiblemente L-histidina), un inhibidor de CA10 (preferiblemente, metazolamida), un antagonista de CYSLTR1 y CYSLTR2 (preferiblemente montelukast), un inhibidor de DHFR (preferiblemente, pirimetamina), un modulador de DRD2 (preferiblemente seleccionado entre dihidroergotamina y cabergolina), un modulador de F2 (preferiblemente, warfarin) un inhibidor de FDPS (preferiblemente, alendronato), un modulador de GABBR2 (preferiblemente acamprosato), un modulador de HIF1A (preferiblemente seleccionado entre topotecán y meloxicam), un modulador de MGST2 (preferiblemente, balsalazida), un modulador de MMP2 y MMP9 (preferiblemente, marimastat), un modulador de NOS2A (preferiblemente seleccionado entre gemfibrozilo, albuterol y titilperazina), un modulador de NOS3 (preferiblemente, cetotifeno), un agonista de NR1I2 (preferiblemente topiramato), un modulador de NR3C2 (preferiblemente seleccionado entre eplerenona y fludrocortisona), un agonista de OPRS1 (preferiblemente, pentazocina), un modulador de P2RY1 y P2RY12 (preferiblemente tirofiban), un inhibidor del receptor de trombina PAR1 (preferiblemente, argatroban), un inhibidor de PDE11A (preferiblemente, tadalafil), un inhibidor de PDE3A (preferiblemente, cilostazol), un inhibidor de PDE4D (preferiblemente, milrinona), un modulador de PDGFRA y PDGFRB (preferiblemente seleccionado de becaplermina e imatinib), un inhibidor de PLA1A y PLA2 (preferiblemente, netilmicina), un modulador de PLAT (preferiblemente, fenilbutirato de sodio), un modulador de PLD2 (preferiblemente, ambrisentan), un modulador de PLG (preferiblemente ácido aminocaproico), un agonista de PPARA (preferiblemente gemfibrozilo), un agonista de PPARG (preferiblemente, fenilbutirato), un activador de PRKGI (preferiblemente seleccionado entre nitroprusiato, nitroglicerina, tadalafil y cilostazol), un modulador de RHOA (preferiblemente alendronato), un modulador de THRB (preferiblemente seleccionado entre liotironina y metimazol), un inhibidor de TROMBIN (preferiblemente, desirudina), un modulador de TSPO (preferiblemente seleccionado entre flunitrazepam y temazepam), y/o un antagonista de VEGFR1 (preferiblemente seleccionado de sunitinib y pegaptanib).

- 50 En otras realizaciones, dicho fármaco adicional que aumenta la angiogénesis se selecciona del fármaco o fármacos que se unen o modulan la actividad de una proteína codificada por un gen seleccionado de ABCA1, ACAT, ACC2, ADAMTS12, ADCY2, ADIPOQ, ADIPOR1, ADIPOR2, ADRB2, AGPAT5, AIP4, AKAP2, AKR1C2, AMPK, ANG2, ANK1, ANXA1, APOA1, ARHGAP17, ATP10A, AUH, AUTOTAXINA, BAI3, BCAR1, BIN1, BMP3A, CA10, CAMK1D, CAMKK2, CD36, CD44, CDC42, CDH13, CHAT, CNTFR, COL4A2, CPT, CSH1, CTNN, CUBN, CYP7B1, CYSLTR1,

5 CYSLTR2, DGKB, DGKH, DGKZ, DHCR7, DHFR, DRD2, DRD5, EDG1, EDG2, EDG3, EDG4, EDG5, EDG6, EDG7, EDG8, EDNRA, EHHADH, ENPP6, ERBB4, ERK1, ERK2, ESRRG, ETFA, F2, FDPS, FGF2, FLNA, FLT4, FOXO1, FOXO3A, FTO, GABBR2, GATA3, GH1, GNA12, GNA13, GRK2, GRK5, GRM5, HAPLN1, HAS1, HAS2, HAS3, HCRTR2, HIF1A, HSD11B1, HYAL1, HYAL2, HYAL3, IL20RA, IL20RB, IL6ST, IL8, ITGA6, ITGB1, KDR, LAMA1, LDLR, LEPR, LEPTIN, LIFR, LIPL2, LKB1, LRP, LTBP2, MAT2B, ME1, MEGALIN, MERLIN, MET, MGST2, MMP2, MMP9, MTOR, MTR, NCK2, NEDD9, NFKB1, NFKBIB, NOS2A, NOS3, NR1I2, NR3C2, NRG1, NRP1, NRP2, OPRS1, OSBPL10, OSBPL3, OSTEOPONTINA, P2RY1, P2RY12, PAI1, PAI2, PAK1, PAK6, PALLD, PAP1, PAR1, PAXILLINA, PC, PCTP, PDE11A, PDE1A, PDE3A, PDE4D, PDE5, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PI3K, PITPNC1, PKA, PKCD, PLA1A, PLA2, PLAT, PLAU, PLCB1, PLD1, PLD2, PLG, PLXDC2, PPARA, PPARG, PPARGC1B, PRKG1, PRL, PTGS2, PTN, PTPN11, PYK2, RAC1, RAS, RHEB, RHOA, ROCK1, ROCK2, RPS6KA1, RPS6KB2, SCARBI, SCHIP1, SGPP2, SLC25A21, SMAD3, SMAD4, SNCA, SORBS2, SPLA2, SPOCK1, SRD5A1, SREBF1, SREBF2, STAT3, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, THBS1, THBS2, THEM2, THRB, TIAM1, TIMP2, TLL2, TSC1, TSC2, TSPO, VEGFA, VEGFR1 y YES1.

15 Los inventores han establecido que los fármacos y las combinaciones de fármacos anteriores proporcionan un efecto biológico mejorado y sinérgico que conduce a una corrección o normalización efectiva o a una desregulación funcional que conduce a la EA y a trastornos relacionados.

20 Los compuestos mencionados anteriormente se enumeran en la siguiente tabla 1, junto con su Número CAS. Como se ha discutido anteriormente, debe entenderse que la invención abarca el uso de los compuestos anteriores así como cualquier sal, hidrato, éster, éter, isómeros, racematos, conjugados o pro-fármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los profármacos pueden prepararse (por ejemplo, acoplado el fármaco a un vehículo adecuado) para ofrecer un mejor control 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
Ambrisentan	177036-94-1
Ácido aminocaproico	60-32-2
Argatroban	74863-84-6
Baclofen	1134-47-0
Balsalazida	80573-04-2
Becaplermin	165101-51-9
Cabergolina	81409-90-7
Cilostazol	73963-72-1
Clopidogrel	113665-84-2
Desirudin	120993-53-5
Dihidroergotamina	6190-39-2
Eplerenona	107724-20-9
Fenoldopam	67227-57-0
Fludrocortisona	127-31-1
Flunitrazepam	1622-62-4
Gemfibrozil	25812-30-0
Hesperetin	520-33-2
Imatinib	152459-95-5

ES 2 622 504 T3

NOMBRE DEL FÁRMACO	NÚMERO CAS
Ketotifen	34580-14-8
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
Metimazol	60-56-0
Milrinona	78415-72-2
Montelukast	158966-92-8
Netilmicin	56391-56-1
Nitroglicerina	55-63-0
Nitroprusida	15078-28-1
Pegaptanib	222716-86-1
Pentazocina	359-83-1
Fenformin	114-86-3
Fenilbutirato de sodio	1716-12-7
Pirimetamina	58-14-0
Sulfisoxazol	127-69-5
Sunitinib	557795-19-4
Tadalafil	171596-29-5
Temazepam	846-50-4
Terbinafina	91161-71-6
Tietilperazina	1420-55-9
Tirofiban	144494-65-5
Topiramato	97240-79-4
Topotecan	119413-54-6
Vidarabina	24356-66-9
Warfarin	81-81-2

5 Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables, sales de metales farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y 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, cinámico, cítrico, fumárico, glicólico,

5 láctico, maleico, málico, malónico, mandélico, oxálico, picárico, pirúvico, salicílico, succínico, metanosulfónico, etanosulfónico, tartárico, ascórbico, pamoico, bismetileno salicílico, etanodisulfónico, glucónico, citracónico, aspártico, esteárico, palmítico, EDTA, glicólico, p-aminobenzoico, glutámico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, sulfatos, nitratos, fosfatos, percloratos, boratos, acetatos, benzoatos, hidroxinaftoatos, glicerofosfatos, cetoglutaratos. Ejemplos adicionales de sales de adición de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables se enumeran, por ejemplo, en J. Pharm. Sci. 1977, 66, 2. Ejemplos de sales metálicas incluyen sales de litio, sodio, potasio, magnesio y similares. Ejemplos de sales de amonio y 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, colina y similares.

10 La terapia de acuerdo con la invención puede realizarse sola o como combinación de fármacos, y/o en combinación con cualquier otra terapia, dirigiéndose a la misma vía o teniendo distintos modos de acción. Se puede proporcionar en el hogar, en el consultorio del médico, en una clínica, en un departamento ambulatorio del hospital o en un hospital, para que el médico pueda observar los efectos de la terapia de cerca y hacer los ajustes necesarios.

15 En una realización particular, las composiciones descritas en esta invención comprenden además al menos un fármaco que modula la función de sinapsis, preferiblemente que mejora la función de sinapsis, para uso combinado, separado o secuencial. Más preferiblemente, dicho al menos un fármaco que modula la función de sinapsis se selecciona entre alfentanilo, amilorida, amlodipina, aztreonam, buclizina, bumetanida, buprenorfina, lidocaína, cloroxazona, cinacalcet, dasatinib, dhipifilina, eletriptano, ergotamina, fosfenitoína, fenobarbital, pregabalina, propiltiouracil, tiagabina, triamtereno, vigabatrina y zonisamida (véase la tabla 2 a continuación).

20 Tabla 2

Nombre del fármaco	Número CAS
Alfentanil	71195-58-9
Amilorida	2016-88-8
Amlodipina	88150-42-9
Aztreonam	78110-38-0
Buclizina	82-95-1
Bumetanida	28395-03-1
Buprenorfina	52485-79-7
Lidocaína	137-58-6
Cloroxazona	95-25-0
Cinacalcet	226256-56-0
Dasatinib	302962-49-8
Difilina	479-18-5
Eletriptan	143322-58-1
Ergotamina	113-15-5
Fosfenitoin	93390-81-9
Fenobarbital	50-06-6
Pregabalin	148553-50-8
Propiltiouracil	51-52-5
Tiagabina	115103-54-3
Triamterena	396-01-0
Vigabatrín	60643-86-9

Nombre del fármaco	Número CAS
Zonisamida	68291-97-4

- 5 Alternativamente, o además de la realización anterior, las composiciones descritas en esta invención pueden comprender además al menos un fármaco que modula la respuesta al estrés celular, preferiblemente que inhibe la respuesta al estrés celular, para uso combinado, separado o secuencial. Los fármacos más preferidos que modulan la respuesta al estrés celular se seleccionan de arabitol, manitol, metaraminol, omeprazol, prilocaína, rapamicina, rifabutina, tioguanina, trehalosa y vidarabina (véase la tabla 3 a continuación).

Tabla 3

Nombre del fármaco	Número CAS
Arabitol	488-82-4, 7643-75-6, 6018-27-5
Manitol	69-65-8
Metaraminol	54-49-9
Omeprazol	73590-58-6
Prilocaína	721-50-6
Rapamicina	53123-88-9
Rifabutin	72559-06-9
Tioguanina	154-42-7
Trehalosa	99-20-7
Vidarabina	24356-66-9

- 10 En una realización particular, la invención se refiere a una composición que comprende un fármaco que aumenta la angiogénesis, un fármaco que mejora la función de la sinapsis y un fármaco que inhibe la respuesta al estrés celular, para administración simultánea, separada o secuencial.

Las composiciones de la invención típicamente comprenden uno o varios vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. La duración de la terapia depende de la etapa de la enfermedad que se esté tratando, de la combinación utilizada, de la edad y condición del paciente y de cómo responde el paciente al tratamiento.

- 15 La dosificación, la frecuencia y el modo de administración de cada componente de la combinación pueden controlarse independientemente. Por ejemplo, se puede administrar un fármaco por vía oral mientras que el segundo fármaco se puede administrar por vía intramuscular. La terapia combinada puede administrarse en ciclos de encendido y apagado que incluyen períodos de descanso para que el cuerpo del paciente tenga la oportunidad de recuperarse de cualquier efecto secundario aún imprevisto. Los fármacos también se pueden formular juntos de manera que una administración administre todos los fármacos.

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

- 25 Aunque es posible administrar los ingredientes activos de la combinación como producto químico puro, es preferible presentarlos como una composición farmacéutica, a la que también se hace referencia en este contexto como formulación farmacéutica. Las composiciones posibles incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, tópica (incluyendo transdérmica, bucal y sublingual) o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica).

- 30 Más comúnmente, estas formulaciones farmacéuticas se prescriben al paciente en "paquetes de paciente" que contienen un número de unidades de dosificación u otros medios para la administración de dosis unitarias medidas para su uso durante un período de tratamiento distinto en un solo envase, habitualmente un envase blister. Los paquetes de paciente tienen una ventaja sobre las prescripciones tradicionales, cuando un farmacéutico divide un suministro de un paciente de un producto farmacéutico de un suministro a granel, en que el paciente siempre tiene acceso al prospecto incluido en el paquete de paciente, que normalmente carece de las recetas tradicionales. Se ha

demostrado que la inclusión de un prospecto de paquete mejora la conformidad del paciente con las instrucciones del médico. Por lo tanto, la invención incluye además una formulación farmacéutica, como se ha descrito anteriormente, en combinación con material de envasado adecuado para dichas formulaciones. En tal paquete de pacientes, el uso pretendido de una formulación para el tratamiento combinado puede deducirse mediante instrucciones, medios, disposiciones, adaptaciones y/u otros medios para ayudar a usar la formulación más adecuadamente para el tratamiento. Tales medidas hacen que un paquete de paciente sea específicamente adecuado y adaptado para su uso para el tratamiento con la combinación de la presente invención.

El fármaco puede estar contenido en cualquier cantidad apropiada en cualquier sustancia vehículo adecuado, 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 vía oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhalante, por la piel (parche) u ocular. Por lo tanto, la composición puede estar en forma, por ejemplo, de comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles que incluyen hidrogeles, pastas, ungüentos, cremas, emplastos, empapados, dispositivos de liberación osmótica, supositorios, enemas, inyectables, implantes, pulverizaciones o aerosoles.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>a</sup> ed.), Ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

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

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 tiempo de retardo 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 de fármaco relativamente constante y eficaz en el cuerpo con minimización concomitante de efectos secundarios indeseables asociados con fluctuaciones en el nivel de plasma de la sustancia farmacológica activa; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco, por ejemplo, colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente al tejido u órgano enfermo; y (v) formulaciones que se dirigen a la acción del fármaco utilizando vehículos o derivados químicos para administrar el fármaco a un tipo de célula objetivo particular.

La administración de fármacos en forma de una formulación de liberación controlada es especialmente preferida en los casos en los que el fármaco, solo o en combinación, tiene (i) un índice terapéutico estrecho (es decir, la diferencia entre la concentración en plasma que produce efectos secundarios dañinos o reacciones tóxicas y la concentración plasmática que conduce a un efecto terapéutico es pequeña; en general, el índice terapéutico, IT, se define como la relación de la dosis letal media (LD50) respecto a la dosis media efectiva (ED50)); (ii) una ventana de absorción estrecha en el tracto gastrointestinal; o (iii) una semivida biológica muy corta, de modo que se requiere una dosificación frecuente durante un día para mantener el nivel de plasma a un nivel terapéutico.

Cualquiera de una serie de estrategias puede ser perseguida con el fin de obtener una liberación controlada en la que la tasa de liberación supere la tasa de metabolismo de la droga en cuestión. La liberación controlada puede obtenerse mediante la selección apropiada de diversos parámetros e ingredientes de la formulación, incluyendo, por ejemplo, diversos tipos de composiciones y revestimientos de liberación controlada. De este modo, el fármaco se formula con excipientes apropiados en una composición farmacéutica que, después de su administración, libera el fármaco de una manera controlada (comprimidos o composiciones de cápsulas individuales o múltiples, soluciones oleosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, y liposomas).

#### Formas de dosis sólidas para uso oral

Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el ingrediente(s) activo(s) en una mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes o cargas (por ejemplo, sacarosa, celulosa microcristalina, almidones incluyendo almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro de sodio, fosfato de calcio, sulfato de calcio o fosfato de sodio); agentes de granulación y de desintegración (por ejemplo, derivados de celulosa que incluyen celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, croscarmelosa sódica, alginatos o ácido algínico); agentes de unión (por ejemplo, acacia, ácido algínico, alginato sódico, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol); y agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo, ácido esteárico, sílices o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes aromatizantes, plastificantes, humectantes, agentes tamponantes.

Los comprimidos pueden estar sin recubrimiento o pueden recubrirse por técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y, de este modo, proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. El recubrimiento puede estar adaptado para liberar la sustancia farmacológica activa en un patrón predeterminado (por ejemplo, para conseguir una formulación de liberación controlada) o puede adaptarse para no liberar la sustancia farmacológica activa hasta después del paso del estómago (recubrimiento entérico). El recubrimiento puede ser un recubrimiento de azúcar, un recubrimiento de película (por ejemplo, a base de hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, metil hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona), o un revestimiento entérico (por ejemplo, a base de copolímero de ácido metacrílico, acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de acetato de polivinilo, goma laca y/o etilcelulosa). Se puede emplear un material de retardo de tiempo tal como, por ejemplo, monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones de comprimidos sólidos pueden incluir un recubrimiento adaptado para proteger la composición de cambios químicos no deseados (por ejemplo, degradación química antes de la liberación de la sustancia farmacológica activa). El recubrimiento puede aplicarse sobre la forma de dosificación sólida de una manera similar a la descrita en *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*.

Pueden mezclarse varios fármacos en el comprimido o pueden dividirse. Por ejemplo, el primer fármaco está contenido en el interior del comprimido, y el segundo fármaco está en el exterior, de manera que una porción sustancial del segundo fármaco se libera antes de la liberación del primer fármaco.

Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como tabletas masticables o como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, almidón de patata, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín) o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, parafina líquida o aceite de oliva. Los polvos y granulados se pueden preparar usando los ingredientes mencionados anteriormente en tabletas y cápsulas de una manera convencional.

Las composiciones de liberación controlada para uso oral pueden, por ejemplo, estar construidas para liberar el fármaco activo controlando la disolución y/o la difusión de la sustancia farmacológica activa.

La disolución o liberación controlada por difusión puede conseguirse mediante un recubrimiento apropiado de una formulación de comprimidos, cápsulas, gránulos o granulados de fármacos, o incorporando el fármaco en una matriz apropiada. Un revestimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de recubrimiento mencionadas anteriormente y/o, por ejemplo, goma laca, cera de abejas, glicol, cera de ricino, cera de carnauba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido dl-poliláctico, butirato de acetato de celulosa, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, vinilpirrolidona, 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 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 halogenado.

Una composición de liberación controlada que contiene uno o más de los fármacos de las combinaciones reivindicadas también puede estar en forma de una tableta o cápsula flotante (es decir, una tableta o cápsula que, tras la administración oral, flote sobre el contenido gástrico durante cierto tiempo período de tiempo). Se puede preparar una formulación en tableta flotante del(de los) fármaco(s) por granulación de una mezcla del(de los) fármaco(s) con excipientes y 20-75% p/p de hidrocoloides, tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. Los gránulos obtenidos se pueden comprimir a continuación en comprimidos. En contacto con el jugo gástrico, el comprimido forma una barrera de gel sustancialmente impermeable al agua alrededor de su superficie. Esta barrera de gel toma parte en el mantenimiento de una densidad de menos de uno, permitiendo de este modo que el comprimido permanezca flotante en el jugo gástrico.

#### Líquidos para administración oral

Los polvos, polvos dispersables o gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa por adición de agua son formas de dosificación convenientes para la administración oral. La formulación como suspensión proporciona el ingrediente activo en una mezcla con un agente dispersante o humectante, un 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 puede administrarse parenteralmente mediante inyección, infusión o implantación (intravenosa, intramuscular, subcutánea o similar) en formas de dosificación, formulaciones o mediante dispositivos o implantes de liberación adecuados que contengan vehículos convencionales no tóxicos

farmacéuticamente aceptables y adyuvantes. La formulación y preparación de tales composiciones son bien conocidas por los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica.

5 Las composiciones para uso parenteral pueden proporcionarse en formas de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas de dosis única) o en viales que contienen varias dosis y en las 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 administración para su implantación o puede presentarse como un polvo seco a reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Aparte de los fármacos activos, 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, ajuste del pH y/o agentes dispersantes.

15 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden estar en la forma adecuada para la inyección estéril. Para preparar dicha composición, el fármaco o fármacos activos adecuados se disuelven o suspenden en un vehículo líquido parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, agua ajustada a un pH adecuado por adición de una cantidad apropiada de ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o un tampón adecuado, 1,3-butanodiol, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. La formulación acuosa puede contener también uno o más conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo, etilo o n-propilo). En los casos en que uno de los fármacos es sólo escasamente o ligeramente soluble en agua, se puede añadir un agente potenciador o solubilizante de la disolución, o el disolvente puede incluir 10-60% p/p de propilenglicol o similar.

20 Las composiciones parenterales de liberación controlada pueden estar en forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, soluciones de aceite, suspensiones oleosas o emulsiones. Alternativamente, el(los) fármaco(s) activo(s) se pueden incorporar en vehículos biocompatibles, liposomas, nanopartículas, implantes o dispositivos de infusión. Los materiales para uso 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). Los vehículos biocompatibles que pueden usarse cuando se formula una formulación parenteral de liberación controlada son carbohidratos (por ejemplo, dextranos), proteínas (por ejemplo, albúmina), lipoproteínas o anticuerpos. Los materiales para uso en implantes pueden ser no biodegradables (por ejemplo, polidimetilsiloxano) o biodegradables (por ejemplo, poli(caprolactona), poli(ácido glicólico) o poli(ortoésteres)).

#### Composiciones rectales

35 Para la aplicación rectal, las formas de dosificación adecuadas para una composición incluyen supositorios (tipo emulsión o suspensión) y cápsulas de gelatina rectal (soluciones o suspensiones). En una formulación de supositorio típica, el fármaco o fármacos activos se combinan con una base de supositorio farmacéuticamente aceptable apropiada, tal como manteca de cacao, ácidos grasos esterificados, gelatina glicerizada y diversas bases solubles en agua o dispersables como polietilenglicoles. Pueden incorporarse diversos aditivos, potenciadores o tensioactivos.

#### Composiciones percutáneas y tópicas

40 Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse tópicamente sobre la piel para absorción percutánea en formas de dosificación o formulaciones que contienen vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales que incluyen microesferas y liposomas. Las formulaciones incluyen cremas, ungüentos, lociones, linimentos, geles, hidrogeles, soluciones, suspensiones, varillas, aerosoles, pastas, yesos y otros tipos de sistemas de administración transdérmica de fármacos. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir agentes emulsionantes, antioxidantes, agentes tamponantes, conservantes, humectantes, potenciadores de penetración, agentes quelantes, agentes formadores de gel, bases para ungüentos, perfumes y agentes protectores de la piel.

Los agentes emulsionantes pueden ser gomas naturales (por ejemplo, goma arábica o goma tragacanto)

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

50 Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para la administración tópica sobre la piel también pueden usarse en relación con la administración tópica sobre o cerca de la parte del cuerpo que se va a tratar. Las composiciones pueden adaptarse para aplicación directa o para aplicación por medio de dispositivos especiales de suministro de fármacos tales como apósitos o alternativamente yesos, almohadillas, esponjas, tiras u otras formas de material flexible adecuado.

55 Dosis y duración del tratamiento

5 Se apreciará que los fármacos de la combinación pueden administrarse concomitantemente, ya sea en la misma o en una formulación farmacéutica diferente o secuencialmente. Si hay administración secuencial, el retraso en la administración del segundo ingrediente activo (o adicional) no debe ser tal que pierda el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. Un requisito mínimo para una combinación según 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 puede deducirse por medios, disposiciones, adaptaciones y/u otros medios para ayudar a usar la combinación según la invención.

10 Aunque los fármacos activos de la presente invención puedan administrarse en dosis divididas, por ejemplo dos o tres veces al día, se prefiere una única dosis diaria de cada fármaco en la combinación, siendo la 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 discretas (tales como cápsulas, comprimidos o cilindros de jeringa cargados) adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo o materiales calculados para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el soporte farmacéutico requerido.

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

Adicionalmente, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo sobre el perfil farmacocinético, farmacodinámico o de eficacia de una terapéutica) sobre un paciente en particular puede afectar la dosis utilizada.

20 Excepto cuando se responde a casos especialmente dañinos de la enfermedad EA cuando pueden requerirse dosificaciones más altas, la dosificación preferida de cada fármaco en la combinación estará por lo general dentro del intervalo de dosis no superior a la habitualmente prescrita para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo o probada segura en grandes estudios clínicos de fase 3.

25 La dosis más preferida corresponderá a cantidades del 1% hasta el 10% de las habitualmente prescritas para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo.

Por ejemplo, las dosis posibles para las terapias de combinación en la presente descripción pueden ser:

- eplerenona oralmente de aproximadamente 0,25 a 5 mg una o dos veces al día y marimastat oralmente de aproximadamente 0,1 a 1 mg por día,
- 30 - gemfibrozil oralmente de aproximadamente 12 a 120 mg administrado en dos tomas divididas 30 minutos antes de la comida de la mañana y de la tarde y marimastat oralmente de aproximadamente 0,1 a 1 mg por día,
- marimastat oralmente de aproximadamente 0,1 a 1 mg por día y terbinafina oralmente de aproximadamente 2,5 a 25 mg una vez o dos veces al día
- 35 - topotecan oralmente de aproximadamente 0,025 a 0,25 mg por día y metazolamida por vía oral de aproximadamente 1 a 10 mg 2-3 veces por día,
- eplerenona por vía oral de aproximadamente 0,25 a 5 mg una o dos veces al día y tadalafil por vía oral de aproximadamente 0,05 a 0,5 mg por día,
- eplerenona oralmente de aproximadamente 0,25 a 5 mg una o dos veces al día y cilostazol por vía oral de aproximadamente 1 a 10 mg por día,
- 40 - sunitinib por vía oral de aproximadamente 0,5 a 5 mg por día y terbinafina por vía oral desde aproximadamente 2,5 a 25 mg una o dos veces al día,
- fenformina por vía oral de aproximadamente 0,5 a 5 mg por día y baclofeno por vía oral de aproximadamente 0,4 a 8 mg por día administrado en dos o tres dosis divididas,
- 45 - fenformina por vía oral de aproximadamente 0,5 a 5 mg por día y terbinafina por vía oral de aproximadamente 2,5 a 25 mg una o dos veces al día,
- tadalafil por vía oral de aproximadamente 0,05 a 0,5 mg por día y alendronato por vía oral de aproximadamente 0,7 a 7 mg una vez por semana o de 0,7 a 7 mg una vez al día,
- cilostazol oralmente de aproximadamente 1 a 10 mg al día y alendronato por vía oral de aproximadamente 0,7 a 7 mg una vez por semana o de 0,7 a 7 mg una vez al día,

- mepacrina por vía oral de aproximadamente 3 a 30 mg al día y terbinafina por vía oral de 2,5 a 25 mg una o dos veces al día,

- mepacrina por vía oral de aproximadamente 3 a 30 mg por día y balsalazida por vía oral de aproximadamente 7 a 75 mg a tomar 3 veces al día,

5 - terbinafina por vía oral de aproximadamente 2,5 a 25 mg una o dos veces al día e imatinib oralmente de aproximadamente 4 a 60 mg por día

Se entenderá que la cantidad de fármaco realmente administrado será determinado por un médico a la luz de las circunstancias relevantes que incluyen la condición que se trate, la composición exacta que se administre, la edad, el peso y la respuesta de cada paciente, la gravedad de los síntomas del paciente y la ruta de administración elegida. Por lo tanto, los intervalos de dosificación anteriores están destinados a proporcionar orientación general y soporte para las enseñanzas de la presente memoria, pero no pretenden limitar el alcance de la invención.

Los siguientes ejemplos se dan a título ilustrativo y no limitativo.

### **EJEMPLOS**

Validación de fármacos utilizando ensayos in vitro

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

20 Estas pruebas in vitro comienzan con el estudio del potencial protector de los fármacos sobre las células endoteliales expuestas al efecto tóxico de la proteína Abeta. Los fármacos en la vía implicada podrían ser analizados individualmente, seguido de ensayos de su acción combinatoria. En la etapa posterior, las combinaciones más eficaces que actúan sobre las dianas en las vías individuales se combinan y se prueban de nuevo en ensayos para el estrés celular, la proliferación de axones y la toxicidad vascular.

Cultivo de células:

25 El cultivo Primo de células cerebrales endoteliales de rata (Vect-Horus SAS, Marsella) se cultiva en el paso 0. En la confluencia, las células endoteliales se disocian con tripsina EDTA (Pan Biotech Ref: P 10-023100). Las células se sembraron a una densidad de 25 000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (los pocillos se recubren con 30 µl de colágeno de rata tipo I a 1,5 mg/ml, Vect - Horus SAS, Marsella) y se cultivan en medio MCBD 131 (M-131-500, Invitrogen) suplementado con 1% de suplemento de crecimiento microvascular (MVGGS, S-005-25, Invitrogen). Las células se cultivan a 37°C en una atmósfera de aire humidificado (95%)/CO<sub>2</sub> (5%). La mitad del medio se cambia cada dos días con medio fresco.

30 Después de 4 días, los fármacos se añaden al medio de cultivo celular, a diferentes concentraciones, se resuelven en DMSO 0,1% o agua. Se lleva a cabo una preincubación de 1 hora en un medio de cultivo que contiene medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Pan Biotech Ref: P04-03600), suplementado con 2% de suero bovino fetal (FBS, Invitrogen ref: 16000-036), 1% de L-glutamina (Pan Biotech ref: P04-80100), 1% de Penicilina-Estreptomicina (PS, Pan Biotech ref: P06-07100), 0,1 mg/ml de Heparina (Sigma), 10 ng/ml de Factor de crecimiento de epidermis (EGF, Invitrogen) y 10 ng/ml de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, PHG0146, Invitrogen).

Las células son entonces intoxicadas con 30 µM de β-amiloide (25-35; Sigma) junto con fármacos en el mismo medio de cultivo. Las células son entonces intoxicadas durante 3 días.

40 Ensayo de actividad de lactato deshidrogenasa (LDH).

Para cada cultivo, después de 3 días de intoxicación, se recoge el sobrenadante y se analiza con 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 lactato deshidrogenasa (LDH) liberada del citosol de células dañadas en el sobrenadante. La densidad óptica (OD) se evalúa por espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm mediante un aparato multiscan (Thermo, Ref Ascent).

Resultados

Los resultados presentados en la Figura 1 se extraen de dos cultivos independientes, 6 pozos por condición. Todos los valores se expresan como media ± s.e.m. Se realiza un análisis t de Student bilateral sobre los datos brutos. Los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad celular, en comparación con el control (vehículo).

50 Los fármacos se incuban con células endoteliales cerebrales primarias de rata una hora antes de la intoxicación con Aβ<sub>25-35</sub> 30 µM que dura 3 días.

Tres días después de esta incubación, la liberación de LDH en el medio de cultivo se cuantifica, reflejando el nivel de muerte celular. Los inventores han observado que 4 fármacos ejercen claramente un efecto protector contra esta intoxicación por A $\beta$ <sub>25-35</sub> (Fig. 1).

#### Ensayos in vivo

5 Los compuestos y sus combinaciones activas en ensayos in vitro se han ensayado en el modelo in vivo de la enfermedad de Alzheimer. La sobreexpresión de los transgenes del precursor de la proteína beta amiloide humana mutante ligada a la enfermedad de Alzheimer (APP) ha sido el medio más fiable de promover la deposición de Abeta en los cerebros de ratones transgénicos que sirvieron como modelos de la enfermedad EA en numerosos estudios. A medida que envejecen, estos ratones mutantes de APP desarrollan una patología amiloide robusta y otras características de tipo EA, incluyendo la disminución de la densidad sináptica, gliosis reactiva y algunos déficits cognitivos. Muchos modelos de ratón de APP mutantes muestran poca evidencia de pérdida neuronal manifiesta y patología de enredo neurofibrilar (NFT). Los ratones hemicigotos para este transgén BRI-Abeta42 son viables y fértiles con una vida normal. El ARNm de BRI-Abeta42 transgénico se expresa en un patrón característico del promotor de la proteína de príon de ratón; los niveles más altos de expresión transgénica se detectan en las células granulares cerebelares y el hipocampo, seguido por la corteza, pons, tálamo y mesencéfalo. En la proteína de fusión transgénica, Abeta1-42 se fusiona con el extremo C de la proteína BRI en el sitio de escisión tipo furina de tal manera que la escisión da como resultado una secreción eficaz de Abetal-42 en el lumen o el espacio extracelular. Por lo tanto, estos ratones expresan específicamente la isoforma Abetal-42. Los ratones BRI-Abeta42 hemicigotos acumulan amiloide beta insoluble en detergente con la edad y desarrollan placas de núcleo en el cerebelo a los 3 meses de edad. El desarrollo de la patología del prosencéfalo ocurre más tarde, las placas extracelulares de Abeta no están presentes consistentemente en el hipocampo y las cortezas entorrinal/piriforme hasta los 12 meses de edad. Los depósitos de beta amiloide (placas con núcleos) se pueden observar tan pronto como a los 3 meses en la capa molecular de cerebelo de ratones transgénicos y se hacen más pronunciados con la edad; se observan placas extracelulares ocasionales en las cortezas entorrinal/piriforme y el hipocampo a los 6 meses de edad, pero no se encuentran de forma consistente hasta los 12 meses de edad. Los ratones más antiguos muestran una patología generalizada con placas en núcleo y difusas en cerebelo, corteza, hipocampo y bulbo olfatorio. Las placas amiloides extracelulares muestran núcleos amiloides densos con fibrillas radiantes; se observan muchos haces de neuritas distróficas en la periferia de estas placas. La gliosis reactiva se asocia con las placas.

#### Tratamientos farmacológicos

30 Los ratones (57) transgénicos Tg A12E mc (Prnp-ITM2B/APP695\*42) se han obtenido de Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org/strain/007002.html>). Los ratones fundadores con los niveles plasmáticos más altos de Abeta42, línea BRI-Abeta42A (12e), se han mantenido sobre un fondo mixto de B6C3. Los ratones transgénicos machos adultos tienen acceso libre a alimentos y agua. De acuerdo con un protocolo aprobado del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales, los ratones han sido pesados e inyectados i.p. o alimentados a la fuerza una vez al día durante 10 a 20 semanas consecutivas con una solución de control (placebo) o fármacos PXT, preparados a diferentes dosis.

#### Análisis de supervivencia

40 Las tasas de supervivencia se han analizado utilizando los métodos de Kaplan-Meier. Los métodos Holm-Sidak (post hoc) se han utilizado para todas las pruebas de comparación múltiple por pares. Las muertes externas son censuradas. Todas las comparaciones se han hecho entre los compañeros de camada para limitar cualquier efecto potencialmente confuso de las diferencias de la cepa de fondo.

#### Pruebas conductuales

Las pruebas conductuales fueron diseñadas y conducidas de acuerdo con los métodos publicados por varios autores (58-61).

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

Este experimento se realiza en una piscina circular de 90 cm de diámetro, hecha de plástico blanco y rellena de agua de color lechoso. Una plataforma de escape de 8 cm de diámetro, hecha de plástico transparente, se sumergió 0,5 cm bajo el nivel del agua. Las pistas visuales son proporcionadas por diferentes formas geométricas impresas en letras de tamaño A4 y colocadas en las cuatro paredes circundantes (la distancia desde la piscina era de 50 a 70 cm). Cada ratón ha recibido cuatro ensayos diarios (intervalo de 5 a 7 minutos entre ensayos, un total de 16 ensayos) durante 4 días. Cada ensayo se ha realizado a partir de uno de cuatro puntos de partida diferentes. El movimiento de los ratones se controla mediante el Software Videotrack (View Point). Se ha determinado el tiempo necesario para localizar la plataforma de escape (latencia de escape, hasta 60 segundos). Después de localizar la plataforma al ratón se le ha permitido sentarse en él durante 15 segundos. Los ratones que no pudieron encontrar la plataforma en 60 segundos han sido guiados hacia ella y se les permitió permanecer en ella durante 15 segundos. Se ingresa una latencia de 60 segundos en el registro para tal ocurrencia. Los cuatro ensayos al día se han promediado para el análisis estadístico, excepto para el primer ensayo en el día 1. El día 9 (5 días después del último entrenamiento) los ratones han sido sometidos a un ensayo de sonda de 60 segundos en el que se elimina la

plataforma y se permite a los ratones buscarla. El tiempo que cada animal gastó en cada cuadrante ha sido registrado (tiempo de búsqueda de cuadrante). Se han utilizado varios grupos de ratones machos a los 3, 7, 10 y 12 meses.

5 Pocos ratones han mostrado un comportamiento de congelación (por ejemplo, estando inmóviles en el agua y negándose a nadar) que interfiere fuertemente con la prueba; estos animales han sido excluidos del análisis de los datos.

Todas las pruebas de comportamiento se llevan a cabo en un ambiente tranquilo y con poca luz.

Prueba de memoria de trabajo en el laberinto de agua del brazo radial

10 Esta medida sensible cognitiva de la memoria de trabajo se ha obtenido con la ayuda del aparato que consistía en una piscina de 100 cm de diámetro rellena de agua (también utilizada para el laberinto de agua Morris y tareas de reconocimiento de plataforma) equipada con un inserto de aluminio para crear seis brazos de nadada distribuidos radialmente. Las pruebas consisten en cinco ensayos de 1 minuto por sesión diaria durante 9-12 días consecutivos. Al comienzo de cada sesión, una plataforma sumergida clara se coloca al final de uno de los seis brazos de nadada (seleccionado al azar, cambiado diariamente). Para cada uno de los cuatro primeros ensayos de adquisición, el animal se coloca en uno de los brazos que no contiene la plataforma (secuencia aleatoria) y se le permite buscar la plataforma. Durante el ensayo de 60 s, cada vez que el animal entra en otro brazo que no contiene plataforma, es devuelto suavemente a su lugar de partida y se registra un error. Después del cuarto ensayo, el animal se deja reposar durante 30 minutos, seguido de un quinto ensayo (de retención), que se origina en el brazo de nadada final que no contiene plataforma. El número de errores (selección de brazos incorrectos) y la latencia de escape (tiempo para alcanzar la plataforma, máximo 60 s) se registran para cada ensayo.

Aprendizaje de referencia espacial y memoria en la prueba de la plataforma circular

25 Esta prueba de tarea basada en la cognición se realiza con la ayuda del aparato que consta de una plataforma circular de 69 cm de diámetro que tiene 16 orificios de "escape" espaciados equidistantes alrededor de la circunferencia. Un refugio de escape está instalado debajo de uno de los agujeros, y una cortina negra, en la que se colocan varias señales visuales, rodea la plataforma. El animal se coloca en el centro de la plataforma al inicio de una sola prueba de 5 minutos y se presentan estímulos aversivos (luces brillantes, viento de ventilador). El número total de errores (picos de cabeza en agujeros sin escape) y la latencia de escape (tiempo para alcanzar el agujero de escape) se registran.

Capacidad de reconocimiento en la prueba de reconocimiento de la plataforma

30 Esta tarea de búsqueda cognitiva evalúa la identificación de objetos y la capacidad de reconocimiento. El objeto objetivo consiste en una plataforma circular de 9 cm de diámetro provista de un estandarte negro 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. Las pruebas consisten en cuatro ensayos de 60 s por día en cada uno de los cuatro días consecutivos. Cada día, el objeto objetivo se coloca en un cuadrante diferente de la piscina para cada prueba, y el animal es liberado en la misma ubicación a lo largo de la circunferencia de la piscina para los cuatro ensayos. Se registra la latencia total (máximo 60 s) para cada ensayo.

Examen de Irwin modificado

40 Una pantalla completa, modificada de Irwin se utiliza para determinar si alguno de los ratones presentaba impedimentos fisiológicos, conductuales o sensorimotrices relacionados con su genotipo. Para explorar las habilidades motoras, la coordinación y la fuerza muscular, los ratones se colocan en un alambre que fue apretado entre dos columnas de 30 cm de altura y su capacidad de equilibrio en el cable se evaluó. Además, se determinó su capacidad para agarrarse y colgarse en el cable con las cuatro patas durante al menos 5 segundos y para subir de nuevo al cable.

Cuantificación del depósito de amiloide vascular

45 Para la cuantificación de la angiopatía amiloide cerebral (CAA), se inmunotifieron secciones de 5 µm embebidas en parafina a intervalos de 30 µm a través de las leptomeninges de la corteza parietal o cerebelar con anticuerpo Ab9 biotinilado (anti-Aβ1-16, 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 teñidos positivamente se evalúan visualmente utilizando el sistema de puntuación de Vonsattel modificado. (62) El puntaje de gravedad CAA se calcula multiplicando el número de vasos CAA por el grado de gravedad CAA.

Histología: inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Los ratones Tg y WT de 3 a 12 meses son anestesiados y perfundidos transcárdialmente secuencialmente con NaCl al 0,9% y paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1 mol/L (pH 7,4) o formalina al 10% y paraformaldehído al 4% en 0,1 mol/L PBS (pH 7,4). Los cerebros y las médulas espinales se eliminan y se

- almacenan en paraformaldehído al 4%. Algunas muestras se incrustan en parafina y se cortan en un micrótopo deslizante con un espesor de 10  $\mu\text{m}$ . Las criosecciones (14  $\mu\text{m}$ ) se cortan en un criostato y se montan sobre láminas revestidas de alumbre de cromo. La peroxidasa endógena se inactiva tratando la sección con metanol que contiene 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos. Las secciones se bloquean en suero de caballo al 10%. Se usan anticuerpos primarios y se incuban durante la noche a 4°C en presencia de suero de caballo al 1%. Todos los anticuerpos secundarios biotinilados o marcados con fluoresceína, Texas Red y AMCA, fluorocromos, ABC-kit y 3,3'-diaminobenzidina como cromógeno para la actividad peroxidasa son de Vector Laboratories. La incubación con el anticuerpo secundario se mantiene a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 5
- 10 Todas las etapas de lavado (3 - 10 minutos) y la dilución de anticuerpo se realizan usando solución salina tamponada con fosfato (PBS 0,1 mol/L, pH 7,4) o solución salina tamponada con Tris (Tris 0,01 mol/L, NaCl 0,15 mol/L, pH 7,4). La incubación con el complejo ABC y la detección con 3,3'-diaminobenzidina se realiza de acuerdo con el manual del fabricante. La contratinción de hematoxilina se realiza según procedimientos estándares. Para cada determinación se utiliza un mínimo de tres ratones por genotipo, edad y sexo (63).
- Análisis estadístico de datos in vivo.
- 15 Los resultados de todos los experimentos se analizan con STATISTICA 8.0 (Statsoft).
- La gravedad de CAA se analiza usando ANOVA con la prueba de comparación múltiple Holm-Sidak post hoc o la prueba t de Student de dos colas. Si el conjunto de datos no cumple con los supuestos de la prueba paramétrica, se lleva a cabo la prueba de Kruskal-Wallis seguida por la comparación múltiple de Dunn post hoc o la prueba de suma de rango de Mann-Whitney. Todas las comparaciones se hacen entre los compañeros de camada.
- 20 El modelo de respuesta a fármacos se realiza excluyendo las muestras de control (0 mg/kg). ED<sub>50</sub> corresponde a la dosis (mg/kg) requerida para inducir un 50% de la respuesta máxima inducida por fármaco en los experimentos. Se calcula usando el modelo de la ecuación de Hill para el log de ED<sub>50</sub>.

**Bibliografia**

1. Crook R., Verkoniemi A., et al. (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., et al. (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 Neurol.* 48(5): 806-8.
3. Kwok J.B., Taddei K., et al. (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. *Neuroreport.* 8(6): 1537-42.
- 10 4. Verkoniemi A., Kalimo H., et al. (2001). Variant Alzheimer disease with spastic paraparesis: neuropathological phenotype. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60(5): 483-92.
5. Citron M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5(9): 677-85.
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.
- 15 7. Blacker D., Albert M.S., et al. (1994). Reliability and validity of NINCDS-ADRDA criteria for Alzheimer's disease. The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Arch Neurol.* 51(12): 1198-204.
8. Rossor M.N., Fox N.C., et al. (1996). Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurodegeneration.* 5(4): 393-7.
9. Glenner G.G., Wong C.W., et al. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol.* 2(6): 357-69.
- 20 10. Ballatore C., Lee V.M., et al. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8(9): 663-72.
11. Bell K.F. and Claudio Cuello A. (2006). Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 545(1): 11-21.
- 25 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 Neuropathol.* 82(4): 239-59.
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.
- 30 15. Hardy J. 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.
16. Selkoe D.J. (2000). The genetics and molecular pathology of Alzheimer's disease: roles of amyloid and the presenilins. *Neurol Clin.* 18(4): 903-22.
- 35 17. Patel N.S., Quadros A., et al. (2008). Potent anti-angiogenic motifs within the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Amyloid.* 15(1):5-19.
18. Cai J., Jiang W.G., et al. (2006). Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *JBiol Chem.* 281(6):3604-13.
19. Hainaud P., Contrerès J.O., et al. (2006). The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions. *Cancer Res.* 66(17):8501-10.
- 40 20. Murakami D., Okamoto I., et al. (2003). Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of CD44. *Oncogene.* 22(10): 1511-6.
21. West D.C., Hampson I.N., et al. (1985). Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science.* 228(4705): 1324-6.
- 45 22. Cao G., Savani R.C., et al. (2006). Involvement of endothelial CD44 during in vivo angiogenesis. *Am J Pathol.* 169(1): 325-36.

23. Sottile J. (2004). Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta*. 1654(1):13-22.
24. Hsieh M.Y., Chen W.Y., et al. (2006). Interleukin-20 promotes angiogenesis in a direct and indirect manner. *Genes Immun*. 7(3): 234-42.
- 5 25. Cao R., Brakenhielm E., et al. (2001). Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(11):6390-5.
26. Ferrara N., Gerber H.P., et al. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 9(6): 669-76.
27. Ge G., Fernández C.A., et al. (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(24):10010-5.
- 10 28. Hardie D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(10): 774-85.
29. Nagata D., Mogi M., et al. (2003). AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in endothelial cells is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress. *J Biol Chem*. 278(33):31000-6.
30. Reihill J.A., Ewart M.A., et al. (2007). AMP-activated protein kinase mediates VEGF-stimulated endothelial NO production. *Biochem Biophys Res Commun*. 354(4):1084-8.
- 15 31. Ouchi N., Kobayashi H., et al. (2004). Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *JBiol Chem*. 279(2):1304-9.
32. Lopez-Lopez C., Dietrich M.O., et al. (2007). Disturbed cross talk between insulin-like growth factor I and AMP-activated protein kinase as a possible cause of vascular dysfunction in the amyloid precursor protein/presenilin 2 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 27(4):824-31.
- 20 33. Hug C., Wang J., et al. (2004). T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(28):10308-13.
34. Feksa L.R., Cornelio A.R., et al. (2003). Characterization of the inhibition of pyruvate kinase caused by phenylalanine and phenylpyruvate in rat brain cortex. *Brain Res*. 968(2): 199-205.
- 25 35. Feksa L.R., Cornelio A.R., et al. (2003). Alanine prevents the inhibition of pyruvate kinase activity caused by tryptophan in cerebral cortex of rats. *Metab Brain Dis*. 18(2): 129-37.
36. Hardie D.G. and Frenguelli B.G. (2007). A neural protection racket: AMPK and the GABA(B) receptor. *Neuron*. 53(2): 159-62.
37. Oikari S., Ahtialansaari T., et al. (2008). Downregulation of PPARs and SREBP by acyl-CoA-binding protein overexpression in transgenic rats. *Pflugers Arch*. 456(2):369-77.
- 30 38. Morfin R. and Stárka L. (2001). Neurosteroid 7-hydroxylation products in the brain. *International review of neurobiology*. 46(79-95).
39. Hirsch-Reinshagen V., Zhou S., et al (2004). Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain. *JBiol Chem*. 279(39): 41197-207.
- 35 40. English D., Kovala A.T., et al. (1999). Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis. *J Hematother Stem Cell Res*. 8(6):627-34.
41. Park S.Y., Jeong K.J., et al. (2007). Hypoxia enhances LPA-induced HIF-1alpha and VEGF expression: their inhibition by resveratrol. *Cancer Lett*. 258(1):63-9.
- 40 42. Tsopanoglou N.E., Pipili-Synetos E., et al. (1994). Leukotrienes C4 and D4 promote angiogenesis via a receptor-mediated interaction. *Eur J Pharmacol*. 258(1-2): 151-4.
43. Hoang M.V., Whelan M.C., et al. (2004). Rho activity critically and selectively regulates endothelial cell organization during angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(7): 1874-9.
44. Kanayasu T., Nakao-Hayashi J., et al. (1989). Leukotriene C4 stimulates angiogenesis in bovine carotid artery endothelial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 159(2): 572-8.
- 45 45. Lee O.H., Kim Y.M., et al. (1999). Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 264(3): 743-50.

46. Fukushima N., Weiner J.A., et al. (2002). Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons. *Mol Cell Neurosci.* 20(2):271-82.
47. van Meeteren L.A., Ruurs P., et al. (2006). Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol.* 26(13):5015-22.
- 5 48. Buhl A.M., Johnson N.L., et al. (1995). G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *JBiol Chem.* 270(42): 24631-4.
49. Umemura K., Yamashita N., et al. (2006). Autotaxin expression is enhanced in frontal cortex of Alzheimer-type dementia patients. *Neurosci Lett.* 400(1-2): 97-100.
- 10 50. Sayas C.L., Moreno-Flores M.T., et al. (1999). The neurite retraction induced by lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation. *J Biol Chem.* 274(52):37046-52.
51. Stein T.D. and Johnson J.A. (2002). Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways. *J Neurosci.* 22(17):7380-8.
- 15 52. Beglopoulos V., Sun X., et al. (2004). Reduced beta-amyloid production and increased inflammatory responses in presenilin conditional knock-out mice. *J Biol Chem.* 279(45):46907-14.
53. Regland B. and Gottfries C.G. (1992). Slowed synthesis of DNA and methionine is a pathogenetic mechanism common to dementia in Down's syndrome, AIDS and Alzheimer's disease? *Med Hypotheses.* 38(1): 11-9.
54. Coma M. et al. (2005) Lack of oestrogen protection in amyloid-mediated endothelial damage due to protein nitrotyrosination. *Brain* 128:1613-1621.
- 20 55. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunological Methods* 65:55-63.
56. P.J. Mitchell et al. (2007) A quantitative method for analysis of in vitro neurite outgrowth. *Journal of Neuroscience Methods* 164 350-362
- 25 57. McGowan E., et al. (2005) Aβ42 Is Essential for Parenchymal and Vascular Amyloid Deposition in Mice. *Neuron* 47: 191-199.
58. 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
59. Ashe KH (2001) Learning and memory in transgenic mice modelling Alzheimer's disease. *Learning and Memory* 8: 301-308.
- 30 60. 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.
61. Hsiao K, et al. (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 99-102.
- 35 62. Greenberg S.M. and Vonsattel J.P. (1997) Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy. Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke* 28(7):1418-22
63. 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.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende baclofen o terbinafina, o una sal o formulación de liberación sostenida de la misma, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 5 2. La composición para uso de la reivindicación 1, que además comprende al menos un compuesto distinto adicional seleccionado del grupo de leflunomida, sulfisoxazol, terbinafina, baclofen, clopidogrel, fenoldopam, mepacrina y fenformin, o sales o formulaciones de liberación sostenida de la misma, para administración combinada, separada o secuencial con baclofen o terbinafina.
- 10 3. La composición para uso de la reivindicación 2, en donde dicha composición comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, siendo dichos fármacos en cada una de dichas combinaciones para la administración combinada, separada o secuencial:
  - baclofen y sulfisoxazol,
  - baclofen y leflunomida,
  - terbinafina y sulfisoxazol,
  - terbinafina y leflunomida,
  - 15 - terbinafina y fenoldopam,
  - terbinafina y mepacrina,
  - terbinafina y fenformin,
  - terbinafina y clopidogrel,
  - baclofen y fenformin, o
  - 20 - baclofen y clopidogrel.
4. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende además al menos un fármaco que aumenta la angiogénesis, para uso combinado, separado o secuencial.
- 25 5. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición se administra repetidamente al sujeto.
7. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho sujeto es un ser humano.
- 30 8. Una composición que comprende terbinafina y sulfisoxazol, o sales o formulaciones de liberación sostenida de la misma, para administración simultánea, separada o secuencial.
9. Baclofen, o una sal o formulación de liberación sostenida del mismo, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto humano.
- 35 10. Baclofen, o una sal o formulación de liberación sostenida del mismo, para uso en la protección de células frente a la toxicidad del péptido amiloide-beta en un sujeto humano que tiene la enfermedad de Alzheimer.

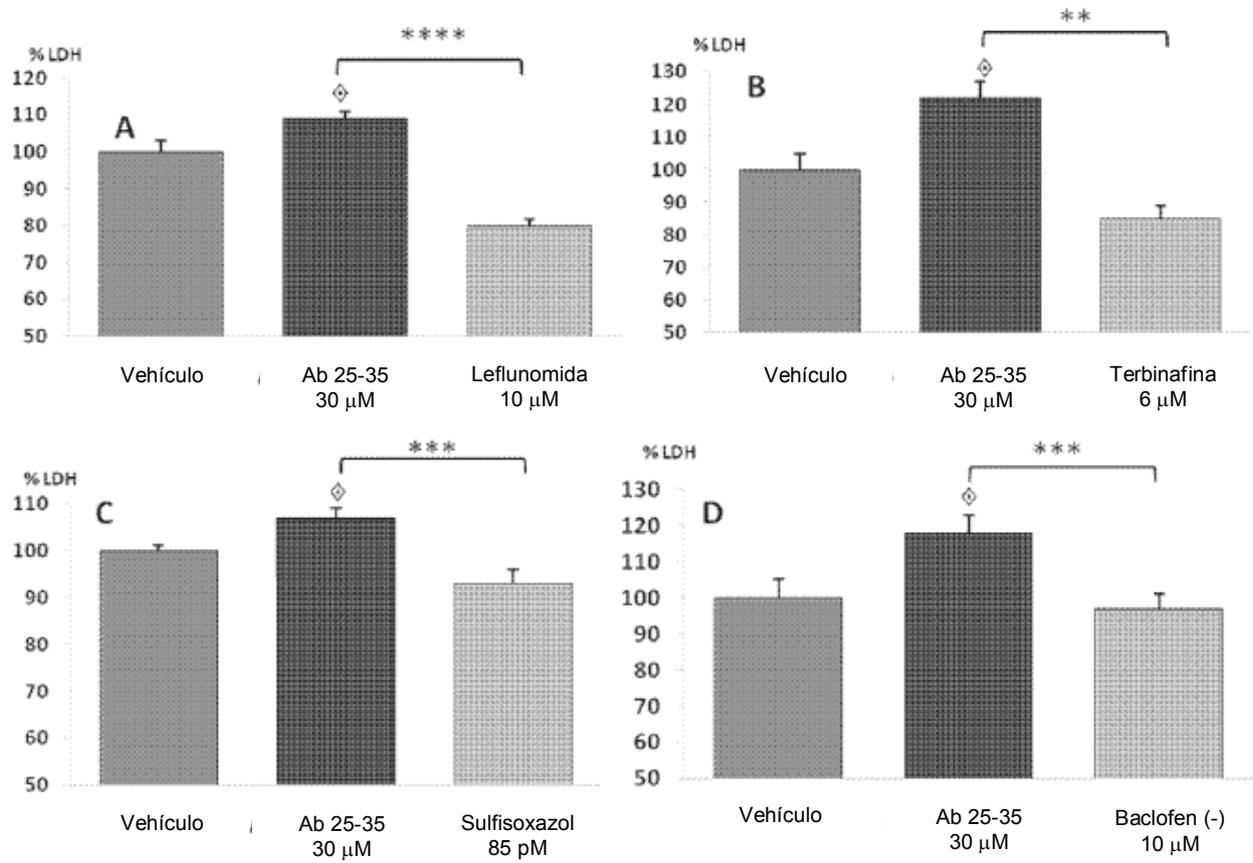


FIGURA 1