

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 934**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/185** (2006.01)

**A61K 31/195** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2013 PCT/EP2013/054026**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13127918**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2013 E 13706549 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2819663**

54 Título: **Nuevas estrategias terapéuticas para tratar la enfermedad de Parkinson**

30 Prioridad:

**01.03.2012 WO PCT/EP2012/053565**

**01.03.2012 WO PCT/EP2012/053568**

**01.03.2012 WO PCT/EP2012/053570**

**05.09.2012 EP 12306063**

**05.09.2012 US 201261696992 P**

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

**01.12.2017**

73 Titular/es:

**PHARNEXT (100.0%)**

**11 Rue des Peupliers**

**92130 Issy-les-Moulineaux, FR**

72 Inventor/es:

**COHEN, DANIEL;**

**NABIROCHKIN, SERGUEI;**

**CHUMAKOV, ILYA y**

**HAJJ, RODOLPHE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 644 934 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

Nuevas estrategias terapéuticas para tratar la enfermedad de Parkinson

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados. Más específicamente, la presente invención se refiere a nuevas terapias combinatorias de la enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados.

### Antecedentes de la invención

10 El Parkinsonismo o los síndromes Parkinsonianos son un grupo de trastornos neurodegenerativos progresivos multicéntricos, cuyas principales características son temblores en reposo, rigidez, bradicinesia e inestabilidad postural. La enfermedad de Parkinson (EP) es la forma más común de Parkinsonismo y el segundo trastorno neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer. En los países industrializados, se ha estimado la prevalencia de la EP en aproximadamente un 0,3% de la población general, siendo los mayores los de mayor riesgo (se estima que el 4% de la población por encima de los 80 años está afectada). La edad media del inicio está alrededor de los 60 años, aunque se puede producir un inicio temprano (hasta con 20 años de edad) (1).

15 La EP se clasifica a menudo como un trastorno del movimiento. El temblor en reposo es el más común y normalmente está entre los síntomas de desarrollo más temprano. La bradicinesia también aparece habitualmente en los estadios iniciales, con dificultad a la hora de desarrollar tareas tales como escribir o vestirse. Se han descrito trastornos de movimiento hiperkinético como efectos secundarios de algunos tratamientos de la enfermedad de Parkinson. A este respecto, la patente US 5.952.389 describe el uso de acamprosato para aliviar los trastornos de movimiento hiperkinético inducidos por levodopa. Sin embargo, limitar los efectos secundarios de los fármacos no es lo mismo, y está lejos, que tratar la enfermedad o los síntomas relacionados. La rigidez se produce y progresa hasta inflexibilidad y resistencia al movimiento de todo el cuerpo, reduciendo la capacidad de movimiento. En los estadios avanzados, la enfermedad progresa hacia inestabilidad postural, produciendo alteraciones en el equilibrio y caídas frecuentes. También pueden surgir otros síntomas motores como dificultades al andar o al tragar. Si no se tratan, los síntomas motores pueden conducir al paciente a estar confinado en cama después de una media de diez años (2,3).

20 En los últimos estadios de la enfermedad, la EP da lugar a muchos síntomas no motores que varían mucho de individuo a individuo. La discapacidad empeora entonces notablemente por el desarrollo de alteraciones neuropsiquiátricas y de la autonomía. Se desarrollan trastornos del habla, cognitivos, el humor, el comportamiento y/o el pensamiento, conduciendo finalmente a la demencia. Otros síntomas habituales incluyen problemas sensoriales, del sueño y emocionales. Estos trastornos reducen la esperanza de vida del individuo afectado y las tasas de mortalidad son aproximadamente el doble de las de la gente sin EP (2-4).

25 La EP es una enfermedad idiopática y su patofisiología sigue sin conocerse bien (4). Sin embargo, al menos el 5% de los casos de EP pueden atribuirse a variaciones genéticas. Las mutaciones dentro de genes tales como SNCA (alfa-sinucleína), PRKN (parquina), LRRK2 (quinasa 2 de repetición rica en leucina), PINK1 (quinasa 1 putativa inducida por PTEN), DJ-1 y ATP13A2 y once localizaciones génicas (PARK1-PARK11) han sido asociadas con la EP familiar (5). Se sospecha que DJ1 es una proteína citoprotectora de respuesta redox ubicua, lo que confirma la función principal del estrés oxidativo en la EP (28), que queda evidenciado adicionalmente por el papel protector del Factor Inducible de Hipoxia en la protección celular dopaminérgica nigral contra el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la alteración de la homeostasis de hierro (29). Aparte de los factores genéticos, se han propuesto muchos factores de riesgo ambientales implicados en el inicio de la EP pero ninguno con evidencias indiscutibles. El factor de riesgo replicado más frecuentemente es la exposición a metales, pesticidas o herbicidas tales como el Agente Naranja. Por otro lado, fumar y el consumo de café parecen proteger a los individuos frente a la EP (1).

La patofisiología de la EP se caracteriza por cuatro características (4):

45 (i) Una sinucleinopatía caracterizada por la acumulación anormal de proteína alfa-sinucleína en las inclusiones denominadas cuerpos de Lewy en el cerebro. La distribución de los cuerpos de Lewy en el cerebro varía de un individuo a otro, pero a menudo está asociada directamente a la expresión y al grado de los síntomas clínicos.

50 (ii) El glutamato es el neurotransmisor de excitación más abundante en el sistema nervioso de los mamíferos. En condiciones patológicas, su acumulación anormal en el hueco sináptico conduce a una sobreactivación de los receptores de glutamato. La acumulación anormal de glutamato en el hueco sináptico conduce a la sobreactivación de los receptores de glutamato que da como resultado procesos patológicos y finalmente la muerte celular neuronal. Este proceso, denominado excitotoxicidad, se observa habitualmente en tejidos neuronales durante trastornos neurológicos agudos y crónicos. Se hace cada vez más evidente que la excitotoxicidad está implicada en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson.

55 (iii) Una deficiencia de actividad dopaminérgica debida a la muerte de células generadoras de dopamina en la sustancia nigra, una región del mesencéfalo. Esto da como resultado una pérdida de movimiento muscular y del control del tono muscular, que conduce a los síntomas motores de la EP.

(iv) La degeneración de neuronas NANC (no-adrenérgicas, no-colinérgicas), serotoninérgicas y colinérgicas también se produce en los estadios finales de la enfermedad, lo que conduce a los síntomas no motores de la EP.

Como no se dispone de ensayos biológicos, la diagnosis de la EP se basa principalmente en la observación de síntomas clínicos y la exclusión de otros trastornos con características clínicas similares (3). Se requiere una confirmación post-mortem para un diagnóstico definitivo. El examen neurológico mediante imágenes neuronales puede ser útil para detectar cambios en las neuronas dopaminérgicas y para descartar otras enfermedades. Una respuesta terapéutica positiva a levodopa es otro criterio de diagnosis. Una vez realizada la diagnosis, la progresión y la gravedad de la enfermedad son clasificadas usando una escala de estadios como la Escala de Clasificación de la Enfermedad de Parkinson Unificada.

El tratamiento más ampliamente usado, especialmente en los estadios tempranos, es el precursor de dopamina levodopa (L-DOPA) (6). El fármaco lleva el neurotransmisor que falta a las neuronas dopaminérgicas, disminuyendo de este modo los síntomas motores. Sin embargo, la mayor parte del fármaco es metabolizada antes de alcanzar la barrera hematoencefálica, produciendo una variedad de efectos secundarios, especialmente efectos gastrointestinales (tales como anorexia, náuseas o vómitos), discinesia y síntomas psiquiátricos (7). Para prevenir el fenómeno de la discinesia, L-DOPA se administra habitualmente en combinación con carbidopa o benserazide (inhibidores de dopa descarboxilasa periféricos) y a menudo también con inhibidores de catecol-O-metil transferasa tales como entacapona. Estos fármacos están dirigidos a prevenir el metabolismo de L-DOPA antes de que alcance el cerebro, potenciando la actividad del fármaco (6). Aunque menos efectivo para mejorar los síntomas motores, habitualmente en los estadios tempranos de la enfermedad se emplean agonistas de dopamina tales como pergolide, cabergolina, apomorfina, o lisuride e inhibidores de monoamina oxidasa-B (implicados en la ruptura catabólica de la dopamina) tales como selegilina o rasagilina. Aunque menos efectivos, pueden ser útiles para retrasar el uso de levodopa y por tanto de la aparición de la discinesia (7).

Otros fármacos tales como anticolinérgicos y agonistas de receptor de acetilcolina nicotínicos pueden ser útiles pero su eficacia en la EP todavía debe ser confirmada (7). La investigación actual también se centra en los tratamientos neuroprotectores, pero ninguno de ellos ha proporcionado evidencia de mejoría en la degeneración. Están dirigidos contra la apoptosis (omigapil, CEP-1347), los receptores de glutamato, el receptor de adenosina A2A, los canales de calcio (isradipina), factores de crecimiento (GDNF), alfa-sinucleína y la inflamación (8).

La actual investigación farmacéutica ha demostrado un interés creciente en la terapia génica y en el trasplante neural (8).

Las patentes WO 2009/133128, WO 2009/133141, WO 2009/133142, WO 2011/054759, EP2322163, WO 2009/068668, WO 2009/153291 describen tratamientos potenciales para diversas enfermedades neurodegenerativas, entre las cuales se encuentra la EP. Linazasoro et al. discute tratamientos no dopaminérgicos de la EP (34). Jimenez-Shahed et al (35) y Fox et al (36) mencionan que el acamprosato potencialmente puede mejorar el comportamiento de los Trastornos de Control de Impulsos. Madan y Schiess (37) sugieren que la terapia intratecal con baclofeno puede frenar la discapacidad progresiva en la atrofia sistémica múltiple.

La EP sigue siendo de momento una enfermedad incurable y todavía no se ha descubierto un tratamiento efectivo que modifique la enfermedad. Por lo tanto, los tratamientos actuales están dirigidos a paliar los síntomas y a aliviar la lenta progresión de la enfermedad.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a nuevas composiciones terapéuticas para tratar el Parkinsonismo. La invención se centra, entre otros, en la identificación de combinaciones de fármacos que proporcionen efectos terapéuticos mejorados y beneficios clínicos en sujetos que presentan la condición de Parkinsonismo, particularmente en sujetos que padecen la enfermedad de Parkinson.

Más particularmente, la invención describe una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente la enfermedad de Parkinson, que comprende uno y preferiblemente al menos dos fármacos seleccionados entre acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o una sal, profármaco, derivado de cualquier pureza química, o formulación de liberación sostenida de los mismos.

Un objetivo de esta invención se refiere a una composición como la definida en las reivindicaciones.

Esta invención describe un método para tratar el Parkinsonismo, particularmente la enfermedad de Parkinson, en un sujeto que lo necesite, que comprende la administración al sujeto de al menos dos fármacos seleccionados entre acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o una sal, profármaco, derivado de cualquier pureza química, o formulación de liberación sostenida de los mismos.

Las combinaciones de fármacos preferidas para uso en la invención comprenden baclofeno y acamprosato. En una realización particular, las composiciones comprenden además Levodopa.

Las composiciones de la invención pueden comprender además uno o varios vehículo(s) o excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s), y pueden ser administrados repetidamente al sujeto. Las composiciones preferidas se administran oralmente. Además, los fármacos se pueden formular o administrar conjuntamente, por separado o secuencialmente.

- 5 La invención es adecuada para tratar el Parkinsonismo en cualquier sujeto mamífero, particularmente en un sujeto humano, en cualquier estadio de la enfermedad. La invención puede usarse, p.ej., para retardar el desarrollo de la enfermedad, para reducir, posponer o prevenir los temblores, la hipocinesia (p.ej., bradicinesia, acinesia, rigidez), la inestabilidad postural y/o el dolor, y/o para aumentar la supervivencia.

#### Breve descripción de las figuras

- 10 **Figura 1:** Efecto de la terapia de combinación de cinacalcet y mexiletina contra la toxicidad de glutamato en células corticales neuronales. La intoxicación por glutamato es prevenida de forma significativa por la combinación de cinacalcet (64 pM) y mexiletina (25,6 pM) mientras que, a dichas concentraciones, el cinacalcet y la mexiletina por sí solos no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación. \*:  $p < 0,001$ , significativamente diferente de intoxicación por glutamato; (ANOVA + test de Dunnett Post-Hoc).
- 15 **Figura 2:** Efecto de la terapia de combinación de sulfisoxazol y torasemida contra la toxicidad de glutamato en células corticales neuronales. La intoxicación por glutamato es prevenida de forma significativa por la combinación de sulfisoxazol (6,8 nM) y torasemida (400 nM) mientras que, a dichas concentraciones, el sulfisoxazol y la torasemida por sí solos no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación. \*:  $p < 0,001$ , significativamente diferente de intoxicación por glutamato; (ANOVA + test de Dunnett Post-Hoc).
- 20 **Figura 3:** Efecto de la terapia de combinación de baclofeno y acamprosato contra la toxicidad de glutamato en células corticales neuronales. La intoxicación por glutamato es prevenida de forma significativa por la combinación de baclofeno (400 nM) y acamprosato (1,6 nM) mientras que, a dichas concentraciones, el baclofeno y el acamprosato por sí solos no tienen un efecto significativo sobre la intoxicación. \*:  $p < 0,001$ , significativamente diferente de intoxicación por glutamato; (ANOVA + test de Dunnett Post-Hoc).
- 25 **Figura 4:** Efecto protector de la combinación de baclofeno y acamprosato contra la lesión isquémica. Aunque no se obtiene una protección significativa cuando se usan el baclofeno (80 nM) y el acamprosato (0,32 nM) por sí solos, se observa una protección significativa (\*:  $p < 0,0001$ ) para la combinación de los dos fármacos, a las mismas concentraciones.
- 30 **Figura 5:** Efecto protector de la combinación de cinacalcet y mexiletina contra la lesión isquémica. No se observa una protección significativa cuando se usan el cinacalcet (64 pM) y la mexiletina (25,6 pM) por sí solos, mientras que sí se observa una protección significativa (\*:  $p < 0,0001$ ) para la combinación de los dos fármacos, a las mismas concentraciones.
- 35 **Figura 6:** Efecto protector de la combinación de torasemida y sulfisoxazol contra la lesión isquémica. La combinación de sulfisoxazol (1,36 nM) y torasemida (80 nM) induce una protección significativa (\*:  $p < 0,0001$ ), 110% superior a la protección obtenida usando solo torasemida, mientras que no se obtiene protección cuando solo se usa sulfisoxazol.
- 40 **Figura 7:** Efecto de la terapia de combinación de baclofeno y acamprosato contra la lesión de 6OHDA en células neuronales dopaminérgicas. La protección aumenta correlativamente con la concentración de las mezclas. Se observa un efecto protector significativo con un aumento de la supervivencia de neuronas TH del 34% con la dosis 1 (16 nM y 64 pM respectivamente), del 46% con la dosis 2 (80 nM y 144 pM) y del 51% con la dosis 3 (400 nM y 1600 pM) (\*\*\*:  $p < 0,0001$ ; \*:  $p < 0,001$ : significativamente diferente de células intoxicadas por 6OHDA (ANOVA + test de Dunnett)).
- 45 **Figura 8:** Efecto de la terapia de combinación de baclofeno y torasemida contra la lesión de 6OHDA en células neuronales dopaminérgicas. Se observa un efecto protector significativo con un aumento de la supervivencia de neuronas TH del 50% con la dosis baja 1 (80 nM y 16 nM respectivamente), del 62% con la dosis media 2 (240 nM y 48 nM) y del 58% con la dosis elevada 3 (720 nM y 144 nM) (\*\*\*:  $p < 0,0001$ : significativamente diferente de células intoxicadas por 6OHDA (ANOVA + test de Dunnett)).
- 50 **Figura 9:** Efecto de la terapia de combinación de cinacalcet y mexiletina contra la lesión 6OHDA en células neuronales dopaminérgicas. Todas las concentraciones evaluadas producen una protección significativa contra 6OHDA. De hecho, se observa un efecto protector significativo con un aumento de la supervivencia de neuronas TH del 36% con la dosis 1 (64 pM y 5 pM respectivamente), del 38% con la dosis 2 (64 pM y 26 pM) y del 48% con la dosis 3 (1600 pM y 64 pM) (\*\*\*:  $p < 0,0001$ ; \*:  $p < 0,001$ : significativamente diferente de células intoxicadas por 6OHDA (ANOVA + test de Dunnett)).
- 55 **Figura 10:** Ensayo de tiempo de inicio, efecto de la terapia de combinación de baclofeno y acamprosato contra la lesión estereotáxica de 6OHDA en la *sustancia nigra pars compacta* izquierda. Pata izquierda: sin cambios significativos. Pata derecha: la inyección de 6OHDA prolongó marcadamente el tiempo de inicio como resultado de

la muerte de neuronas de la sustancia nigra izquierda. El tratamiento de baclofeno-acamprosato protege fuertemente de la acinesia inducida por 6OHDA y esto desde la dosis más débil 1 (dosis 1 de baclofeno-acamprosato: 0,6 mg/kg/bid y 0,04 mg/kg/bid respectivamente; dosis 2: 1,5 mg/kg/bid y 0,1 mg/kg/bid; dosis 3: 3,75 mg/kg/bid y 0,25 mg/kg/bid; \*\*\*:  $p < 0,0001$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ; \*:  $p < 0,05$ : significativamente diferente de células intoxicadas con 6OHDA (ANOVA + test de Dunnett)).

**Figura 11:** Ensayo de tiempo de reacción, efecto de la terapia de combinación de baclofeno y acamprosato contra la lesión estereotáxica de 6OHDA en la *sustancia nigra pars compacta* izquierda. Pata izquierda: sin cambios significativos. Pata derecha: la inyección de 6OHDA prolongó marcadamente el tiempo de reacción como resultado de la muerte de neuronas de la sustancia nigra izquierda. El tratamiento de baclofeno-acamprosato protege fuertemente de la acinesia inducida por 6OHDA y esto desde la dosis más débil 1. La dosis 2 y 3 alivian casi completamente la acinesia inducida por 6OHDA (dosis 1 de baclofeno-acamprosato: 0,6 mg/kg/bid y 0,04 mg/kg/bid; dosis 2: 1,5 mg/kg/bid y 0,1 mg/kg/bid; dosis 3: 3,75 mg/kg/bid y 0,25 mg/kg/bid; \*\*\*:  $p < 0,0001$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ; \*:  $p < 0,05$ : significativamente diferente de células intoxicadas con 6OHDA (ANOVA + test de Dunnett)).

### Descripción detallada de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar nuevas estrategias terapéuticas para tratar el Parkinsonismo, más específicamente la enfermedad de Parkinson. Más particularmente, la invención describe un nuevo uso de fármacos y combinaciones de fármacos y métodos, que permiten una corrección efectiva de dichas enfermedades y que pueden usarse en cualquier sujeto mamífero.

Parkinsonismo define un grupo de trastornos neurodegenerativos progresivos que se caracterizan por temblores en reposo y/o bradicinesia, asociados a rigidez, inestabilidad postural, pérdida de reflejos posturales, postura flexionada y/o el fenómeno de congelamiento (cuando los pies se quedan “pegados” temporalmente al suelo). Los ejemplos de las afecciones del Parkinsonismo incluyen la enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, atrofia sistémica múltiple, degeneración gangliónica cortical-basal, enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, demencia de Parkinson, distonía-parkinsonismo cruzados y Parkinsonismo secundario (que resulta de etiología ambiental, p.ej., toxinas, fármacos, encefalitis, tumores cerebrales, traumas de cabeza, hidrocefalo de presión normal).

La enfermedad de Parkinson es la forma más común de Parkinsonismo. La Enfermedad de Parkinson (“EP”) es un trastorno neurodegenerativo que conduce a manifestaciones motoras y no motoras y que se caracteriza por una degeneración extendida de las neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal. Las manifestaciones motoras de la EP son atribuibles a la degeneración de neuronas dopaminérgicas dentro de la sustancia nigra. Incluyen temblores, hipocinesia (p.ej., bradicinesia, acinesia, rigidez), inestabilidad postural, anomalía en la forma de caminar y alteraciones al tragar. Los síntomas no motores incluyen alteraciones de la autonomía y neuropsiquiátricas tales como la anosmia, o anomalías del sueño. En el contexto de la invención, el término EP incluye cualquiera de las anteriores manifestaciones de la enfermedad.

Tal como se usa en la presente memoria, “tratamiento” incluye la terapia, la prevención, la profilaxis, el retraso o la reducción de los síntomas provocados o de las causas del Parkinsonismo, preferiblemente de la enfermedad de Parkinson. El término tratamiento también designa un retraso o retardo de la aparición de los temblores, una reducción del dolor, una disminución o reducción de la bradicinesia, acinesia, rigidez, inestabilidad postural, andares anormales, anosmia y/o anomalías del sueño, y/o un aumento de la supervivencia. El término tratamiento incluye en particular el control de la progresión de la enfermedad y de los síntomas motores y no motores asociados. El término tratamiento incluye particularmente i) una protección contra la toxicidad producida por alfa-sinucleína, o una reducción o retraso de dicha toxicidad, y/o ii) una protección de neuronas dopaminérgicas contra la toxicidad que resulta de una acumulación anormal de glutamato, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial o neuroinflamación, o una reducción o retraso de dicha toxicidad, en los sujetos tratados.

El término “combinación o tratamiento/terapia combinatoria” designa un tratamiento en el que se administran conjuntamente al menos dos o más fármacos a un sujeto para producir un efecto biológico. En una terapia combinada según esta invención, los al menos dos fármacos pueden ser administrados juntos o por separado, al mismo tiempo o secuencialmente. Asimismo, los al menos dos fármacos pueden ser administrados a través de diferentes rutas y protocolos. Como resultado, aunque pueden formularse juntos, los fármacos de una combinación también pueden formularse por separado.

Varios procesos biológicos tales como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la neuroinflamación acompañan a la acumulación de alfa-sinucleína agregada, lo que conduce a la degeneración de neuronas dopaminérgicas. Por otro lado, la acumulación anormal de glutamato en los huecos sinápticos conduce a la sobreactivación de los receptores de glutamato, lo que da lugar a procesos patológicos y finalmente a la muerte celular. Este proceso conocido como excitotoxicidad es reconocido ahora como un factor etiológico importante implicado en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.

Los inventores han sido capaces de establecer una red subyacente a la agregación de alfa-sinucleína que constituye una red funcional principal afectada en la enfermedad de Parkinson. Los inventores han identificado módulos funcionales compuestos de varias proteínas diana, dentro de la red de agregación de alfa-sinucleína. Dichas

proteínas son funcionalmente relevantes para la génesis y control de la enfermedad de Parkinson y del Parkinsonismo, y representan valiosas dianas para terapias y en particular para terapias de combinación.

Por tanto, la invención describe el uso de fármacos particulares que, solos o preferentemente en combinación(es), modulan las rutas mencionadas para tratar el Parkinsonismo, en particular la enfermedad de Parkinson.

5 En una realización particular, la presente invención se refiere más específicamente a composiciones que usan una combinación de fármacos que inhibe la actividad de al menos dos proteínas distintas implicadas en la red de agregación de alfa-sinucleína. Las estrategias terapéuticas de la invención son efectivas para la protección de células neuronales, particularmente para la protección de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo y más particularmente en la sustancia nigra.

10 Más particularmente, la invención describe una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la enfermedad de Parkinson (EP), que comprende al menos dos fármacos seleccionados entre acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

15 De hecho, los inventores han descubierto de forma sorprendente que estos compuestos muestran una actividad protectora frente a la toxicidad por glutamato, que constituye una causa conocida de muerte cerebral en la enfermedad de Parkinson y en el Parkinsonismo. Los compuestos y las terapias de combinación de la invención también muestran una actividad protectora frente al estrés isquémico que comparte características fisiológicas comunes con la enfermedad de Parkinson (de forma destacada, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo). Más particularmente, los compuestos de la presente invención son particularmente efectivos *in vivo* e *in vitro* contra el estrés oxidativo, que es un componente de la toxicidad de alfa-sinucleína para las neuronas dopaminérgicas.

20 La invención también describe un método para el tratamiento del Parkinsonismo, en particular la enfermedad de Parkinson (EP), que comprende la administración a un sujeto que lo necesite de al menos dos compuestos seleccionados entre acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

25 El término “profármaco” tal como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier derivado funcional (o precursor) de un compuesto de la presente invención, que, cuando se administra a un sistema biológico, genera dicho compuesto como resultado de, p.ej., una reacción(es) química(s) espontánea(s), una reacción(es) química(s) catalizada(s) por enzimas, y/o una reacción(es) química(s) metabólica(s). Los profármacos habitualmente son inactivos o menos activos que el fármaco resultante y pueden usarse, por ejemplo, para mejorar las propiedades fisicoquímicas del fármaco, para dirigir al fármaco a un tejido específico, para mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del fármaco y/o para reducir efectos secundarios no deseados. Algunos de los grupos funcionales habituales que son utilizables en el diseño del profármaco incluyen, aunque sin limitación, grupos carboxílicos, hidroxilo, amina, fosfato/fosfonato y carbonilo. Los profármacos producidos típicamente a través de la modificación de dichos grupos incluyen, aunque sin limitación, ésteres, carbonatos, carbamatos, amidas y fosfatos.

30 Las guías técnicas específicas para la selección de profármacos adecuados son de conocimiento común general (29-33). Adicionalmente, la preparación de profármacos puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los especialistas de la técnica. Los métodos que pueden usarse para sintetizar otros profármacos se describen en numerosos revisiones de la materia (9; 14-20). Por ejemplo, el arbaclofeno placarbil se incluye en la base de datos ChemID plus Advance (página web: [chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/](http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/)) y el arbaclofeno placarbil es un profármaco bien conocido del baclofeno (21-22). Ejemplos específicos de profármacos de baclofeno se presentan en Hanafi *et al.*, 2011 (26), en particular ésteres de baclofeno y carbamatos de éster de baclofeno, que son de interés particular para actuar sobre el SNC. Por tanto, este tipo de profármacos son particularmente adecuados para las composiciones de esta invención. El mencionado arbaclofeno placarbil también es un profármaco bien conocido y por tanto puede usarse en lugar del baclofeno en las composiciones de la invención. En las siguientes solicitudes de patente se pueden encontrar otros profármacos de baclofeno: WO2010102071, US2009197958, WO2009096985, WO2009061934, WO2008086492, US2009216037, WO2005066122, US2011021571, WO2003077902 y WO2010120370.

Los profármacos útiles para acamprosato, tales como los ésteres de neopentil sulfonilo de éster de ácido pantoico, los profármacos de ésteres de neopentil sulfonilo o los profármacos de éster de neopentil sulfonilo de carboxilato enmascarado del acamprosato se enumera de forma destacable en los documentos WO2009033069, WO2009033061, WO2009033054, WO2009052191, WO2009033079, US 2009/0099253, US 2009/0069419, US 2009/0082464, US 2009/0082440 y US 2009/0076147.

Profármacos como los descritos anteriormente pueden usarse en lugar de los compuestos de la invención descritos en la presente memoria.

55 El término “derivado” de un compuesto incluye cualquier molécula que esté relacionada funcional y estructuralmente con dicho compuesto, tal como un ácido, amida, éster, éter, variante acetilada, variante hidroxilada, o variante alquilada (C1-C6) de dicho compuesto. El término derivado también incluye un compuesto relacionado estructuralmente que ha perdido uno o más sustituyentes, según se enumera a continuación. Por ejemplo, la

- homotaurina es un derivado desacetilado del acamprosato. Los derivados preferidos de un compuesto son moléculas que tienen un grado sustancial de similitud con dicho compuesto, según se determina mediante métodos conocidos. Compuestos similares, junto con su índice de similitud respecto a una molécula progenitora, se pueden encontrar en numerosas bases de datos, tal como en PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) o DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>). En una realización más preferida, los derivados deberían presentar un índice de similitud de Tanimoto superior a 0,4, preferiblemente superior a 0,5, más preferiblemente superior a 0,6, incluso más preferiblemente superior a 0,7, con respecto a un fármaco progenitor. El índice de similitud de Tanimoto se usa ampliamente para medir el grado de similitud estructural entre dos moléculas. El índice de similitud de Tanimoto se puede calcular utilizando un software tal como Small Molecule Subgraph Detector (23-24), disponible on-line (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/SMSD/>). Los derivados preferidos deberían estar relacionados tanto estructural como funcionalmente con un compuesto progenitor, es decir, deberían retener también al menos parte de la actividad del fármaco progenitor, más preferiblemente deberían presentar una actividad protectora sobre las neuronas dopaminérgicas frente al estrés inducido por 6OHDA y/o la toxicidad de glutamato y/o el estrés isquémico (tal como se ejemplifica en la parte experimental).
- El término derivados también incluye metabolitos de un fármaco, p.ej., una molécula que es resultado de la(s) modificación(es) (bioquímica(s)) o del procesamiento de dicho fármaco después de la administración a un organismo, habitualmente a través de sistemas enzimáticos especializados, y que presenta o retiene una actividad biológica del fármaco. Se ha descrito que los metabolitos son responsables de mucha de la acción terapéutica del fármaco progenitor. En una realización específica, un "metabolito" tal como se usa en la presente memoria designa un fármaco modificado o procesado que retiene al menos parte de la actividad del fármaco progenitor, preferiblemente que presenta una actividad protectora sobre las neuronas dopaminérgicas frente al estrés inducido por 6OHDA y/o la toxicidad de glutamato y/o el estrés isquémico. Los ejemplos de metabolitos incluyen las formas hidroxiladas de la torasemida que resultan del metabolismo hepático del fármaco (27).
- El término "sal" se refiere a una sal de adición de ácido orgánico o inorgánico, farmacéuticamente aceptable y relativamente no tóxica, de un compuesto de la presente invención. La formación de una sal farmacéutica consiste en emparejar una molécula de fármaco ácida, básica o zwitteriónica con un contraión para crear una versión de sal del fármaco. Se puede usar una amplia variedad de especies químicas en la reacción de neutralización. Las sales farmacéuticamente aceptables de la invención incluyen por tanto aquellas obtenidas haciendo reaccionar el compuesto principal, que actúa como una base, con un ácido inorgánico u orgánico para formar una sal, por ejemplo, sales de ácido acético, ácido nítrico, ácido tartárico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metano sulfónico, ácido canforsulfónico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico o ácido cítrico. Las sales farmacéuticamente aceptables de la invención también incluyen aquellas en las que el compuesto principal actúa como un ácido y se hace reaccionar con una base apropiada para formar, p.ej., sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio o colina. Aunque la mayoría de las sales de un principio activo dado son bioequivalentes, algunas pueden presentar, entre otras cosas, propiedades de solubilidad o biodisponibilidad mejoradas. La selección de la sal es hoy día una operación estándar habitual en el proceso del desarrollo de un fármaco, como indican H. Stahl y C.G. Wermuth en su manual (25).
- En una realización preferida, la designación de un compuesto pretende designar el compuesto per se, así como cualquier sal farmacéuticamente aceptable, hidrato, isómero, racemato de la misma.
- La siguiente Tabla 1 proporciona ejemplos no limitativos de número CAS de compuestos para uso en la invención, así como de sal(es), derivados, metabolitos y/o profármacos de dichos compuestos.

Tabla 1

Fármaco	Números CAS	Clase o índice de similitud de Tanimoto
acamprosato y compuestos relacionados		
acamprosato	77337-76-9; 77337-73-6	NA
homotaurina	3687-18-1	0,73
etil dimetil amonio propano sulfonato	/	0,77
taurina	107-35-7	0,5
baclofeno y compuestos relacionados		
baclofeno	1134-47-0; 66514-99-6; 69308-37-8; 70206-22-3; 63701-56-4; 63701-55-3; 28311-31-1	NA
ácido 3-(p-clorofenil)-4-hidroxitútrico	/	Metabolito
arbaclofeno placarbil	847353-30-4	Profármaco
mexiletina y compuestos relacionados		

Fármaco	Números CAS	Clase o índice de similitud de Tanimoto
mexiletina	31828-71-4; 5370-01-4	
6-hidroximetilmexiletina	53566-98-6	Metabolito
4-hidroximexiletina	53566-99-7	Metabolito
3-hidroximexiletina (MHM)	129417-37-4	Metabolito
N-hidroximexiletina glucuronida	151636-18-9	Metabolito
sulfisoxazol y compuestos relacionados		
sulfisoxazol	127-69-5; 4299-60-9	
N(4)-acetilsulfisoxazol	4206-74-0	Metabolito
acetil sulfisoxazol	80-74-0	Profármaco
sulfametoxazol	723-46-6	0,52
cinacalcet y compuestos relacionados		
cinacalcet	226256-56-0; 364782-34-3	
ácido hidrocinnámico	501-52-0	Metabolito
torasemida y compuestos relacionados		
torasemida	56211-40-6; 72810-59-4	
hidroxitorasemida	99300-68-2; 99300-67-1	Metabolitos
carboxitorasemida		Metabolito
tolbutamida	64-77-7	0,55

En una realización particular, se usa una formulación de liberación sostenida del compuesto.

Los inventores han descubierto que el acamprosato, el baclofeno, el cinacalcet, la mexiletina, el sulfisoxazol y la torasemida son particularmente eficaces en la corrección de las rutas moleculares de la agregación de alfa-sinucleína.

Como se describe en los ejemplos, las moléculas de la invención tienen un fuerte efecto, no esperado, sobre los procesos biológicos implicados en el Parkinsonismo, particularmente la enfermedad de Parkinson, y representan nuevas estrategias terapéuticas de la patología. En particular, las composiciones de la invención proporcionan un efecto inesperado sobre la toxicidad de glutamato. Adicionalmente, los fármacos y combinaciones de fármacos de la invención aumentan la supervivencia de neuronas dopaminérgicas sometidas a estrés oxidativo inducido por 6OHDA, así como a estrés isquémico, e inducen un efecto protector en las manifestaciones motoras y no motoras de la EP. De esta manera, las estrategias terapéuticas de la invención son efectivas para la protección de células neuronales, en particular para la protección de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, y más particularmente de la sustancia nigra, tal como se demuestra *in vivo*.

En una realización particular, la presente invención describe composiciones para tratar el Parkinsonismo, en particular la enfermedad de Parkinson, usando un compuesto seleccionado entre acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida.

Las combinaciones de fármacos que modulan la actividad de al menos dos proteínas distintas que están implicadas en la red de agregación de alfa-sinucleína constituyen una realización particularmente ventajosa de la invención. De hecho, los inventores han observado que los anteriores fármacos, cuando se administran en combinación, actúan sinérgicamente para proteger de forma eficiente las neuronas dopaminérgicas. En particular, las composiciones de la invención tienen un efecto no esperado sobre la toxicidad de glutamato, la muerte celular inducida por isquemia y el estrés oxidativo. Dicho efecto fuerte e inesperado sobre los procesos biológicos implicados en el Parkinsonismo, particularmente la enfermedad de Parkinson, le confiere un interés particular a estas nuevas estrategias terapéuticas combinatorias de la patología.

Por tanto, la invención describe dichas composiciones para tratar Parkinsonismo, en particular la enfermedad de Parkinson, usando al menos dos fármacos seleccionados entre acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida.

El uso de composiciones de la invención conduce a una mejoría de la EP a través de su acción sobre los síntomas tanto motores como no motores de la enfermedad. Las estrategias terapéuticas de la invención proporcionan una protección neuronal eficiente, en particular de las neuronas dopaminérgicas, frente al estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, los daños por excitotoxicidad, la neuroinflamación o la apoptosis. Más particularmente, pueden

proporcionar una protección de las neuronas de la sustancia nigra frente a la toxicidad de alfa-sinucleína agregada para reducir la velocidad o la extensión de la pérdida de células dopaminérgicas y afectar de ese modo al curso de la progresión de la enfermedad.

5 En relación a este, la invención describe una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos. La invención también describe la composición que comprende torasemida y mexiletina, o una sal o profármaco o derivado de cualquier pureza o una formulación de liberación sostenida de la misma.

10 La invención también describe una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, que comprende al menos dos compuestos seleccionados entre acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o una sal, profármaco, derivado de cualquier pureza, o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

15 La invención también describe una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, que comprende al menos un compuesto seleccionado entre acamprosato, cinacalcet y torasemida, o una sal, profármaco, derivado de cualquier pureza química, o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, y al menos un compuesto seleccionado entre baclofeno, mexiletina o sulfisoxazol, o una sal, profármaco, derivado de cualquier pureza química o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

20 Más particularmente, la invención describe una composición que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, para administración simultánea, secuencial o separada:

- baclofeno y acamprosato,
- baclofeno y cinacalcet,
- cinacalcet y acamprosato,
- mexiletina y cinacalcet,
- 25 - torasemida y baclofeno, o
- torasemida y sulfisoxazol,

o una sal(es) o profármaco(s) o derivado(s) de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la enfermedad de Parkinson.

30 Una composición particularmente preferida de la invención comprende baclofeno y acamprosato, o una sal, o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

Otra composición descrita en esta invención usa baclofeno y torasemida, o una sal, profármaco, derivado de cualquier pureza química, o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

35 Otra composición descrita en esta invención usa acamprosato y cinacalcet, o una sal(es) o profármaco(s) o derivado(s) de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida, en donde la dosis diaria de acamprosato es igual o inferior a 10 mg.

La invención también se refiere a baclofeno, o una sal, o formulaciones de liberación sostenida del mismo, para uso en combinación con acamprosato, o una sal, o formulaciones de liberación sostenida del mismo, para el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la enfermedad de Parkinson, mediante la administración combinada, separada o secuencia a un sujeto.

40 Las composiciones de fármaco preferidas de la invención comprenden por tanto 2, 3, 4 o 5 fármacos distintos, más preferiblemente 2, 3 ó 4 fármacos distintos para el tratamiento combinatorio del Parkinsonismo, particularmente de la enfermedad de Parkinson en un sujeto que lo necesite. En una realización preferida, los fármacos de la invención se usan en combinación(es) para la administración separada o secuencial, a fin de proporcionar el efecto más efectivo.

45 Los inventores han descubierto además que la combinación de al menos una combinación de fármacos seleccionada del grupo que consiste en:

- baclofeno y acamprosato,
- baclofeno y cinacalcet,
- mexiletina y cinacalcet,
- cinacalcet y acamprosato,
- 50 - torasemida y baclofeno, o
- torasemida y sulfisoxazol,

con un fármaco, diferente de los anteriores, seleccionado del grupo acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, y que potencia el efecto terapéutico de la combinación binaria y da lugar a composiciones incluso más eficientes para su uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP.

De esta manera, la invención también describe una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, que comprende cinacalcet y acamprosato en una combinación con un fármaco seleccionado entre los fármacos baclofeno, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración combinada, separada o secuencial.

5 La invención describe adicionalmente una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, que comprende baclofeno y cinacalcet en una combinación con un fármaco seleccionado entre acamprosato, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración combinada, separada o secuencial.

10 La invención también describe una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, que comprende mexiletina y cinacalcet en una combinación con un fármaco seleccionado entre acamprosato, baclofeno, sulfisoxazol y torasemida, o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración combinada, separada o secuencial.

15 La invención describe adicionalmente una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, que comprende torasemida y baclofeno en una combinación con un fármaco seleccionado entre acamprosato, sulfisoxazol, cinacalcet y mexiletina, o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración combinada, separada o secuencial.

20 La invención describe adicionalmente una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, que comprende torasemida y sulfisoxazol en una combinación con un fármaco seleccionado entre acamprosato, baclofeno, mexiletina y cinacalcet, o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración combinada, separada o secuencial.

Más particularmente, la invención describe composiciones para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos:

- baclofeno y cinacalcet y mexiletina,
- cinacalcet y acamprosato y mexiletina,
- 25 - baclofeno y acamprosato y cinacalcet,
- baclofeno y acamprosato y torasemida,
- baclofeno y acamprosato y mexiletina, o
- torasemida y baclofeno y cinacalcet,

30 o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para una administración combinada separada o secuencia.

Un objetivo adicional de esta invención reside en el uso de una composición como las definidas anteriormente para la fabricación de un medicamento para tratar el Parkinsonismo, particularmente la EP.

Como se ha indicado previamente, en una terapia de combinación de esta invención, los compuestos o fármacos pueden formularse conjuntamente o por separado, y se pueden administrar juntos, separados o secuencialmente.

35 La invención también describe un método para tratar el Parkinsonismo, particularmente la EP, comprendiendo dicho método la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto que lo necesite de una cantidad efectiva de una composición como la descrita anteriormente.

40 A este respecto, la invención también describe un método para tratar el Parkinsonismo, particularmente la EP, comprendiendo dicho método la administración simultánea, separada o secuencial a un sujeto que lo necesite de una cantidad efectiva de una combinación de fármacos como la definida anteriormente.

La invención también describe un método para tratar el Parkinsonismo, particularmente la EP, en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método la administración simultánea, separada o secuencial al sujeto de una cantidad efectiva de una composición de al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida.

45 La invención también describe un método para tratar el Parkinsonismo, particularmente la EP, en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método la administración simultánea, separada o secuencial al sujeto de una cantidad efectiva de una combinación de al menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste en acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida.

50 La invención también describe un método para tratar el Parkinsonismo, particularmente la EP, en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método la administración simultánea, separada o secuencial al sujeto de una cantidad efectiva de una combinación de al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, o de sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos:

- baclofeno y acamprosato,
- baclofeno y cinacalcet,

- cinacalcet y acamprosato,
- mexiletina y cinacalcet,
- torasemida y baclofeno, o
- torasemida y sulfisoxazol.

5 La invención también describe un método para tratar el Parkinsonismo, particularmente la EP, en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método la administración simultánea, separada o secuencia al sujeto de una cantidad efectiva de una combinación de al menos una de las siguientes combinaciones de fármaco, o sales, profármacos, derivados o formulación de liberación sostenida de los mismos:

- baclofeno y cinacalcet y mexiletina,
- 10 - cinacalcet y acamprosato y mexiletina,
- baclofeno y acamprosato y cinacalcet,
- baclofeno y acamprosato y torasemida,
- baclofeno y acamprosato y mexiletina, o
- torasemida y baclofeno y cinacalcet.

15 Las composiciones de la invención comprenden típicamente uno o varios vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Asimismo, para uso en la presente invención, los fármacos o los compuestos normalmente se mezclan con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

A este respecto, un objetivo adicional de esta invención es un método para preparar una composición farmacéutica, comprendiendo dicho método mezclar los anteriores compuestos o combinaciones de compuestos en un excipiente o vehículo apropiado.

20 Aunque muy eficaces *in vitro* e *in vivo*, dependiendo del sujeto o de la afección específica, los anteriores métodos, composiciones o terapias de combinación pueden usarse adicionalmente en conjunción o asociación o combinación con fármacos o tratamientos adicionales.

25 Las terapias adicionales usadas en conjunción con el fármaco(s) o combinación(es) de fármaco(s) según la presente invención, pueden comprender uno o más fármaco(s) que alivian los síntomas de la enfermedad de Parkinson, uno o más fármaco(s) que podrían ser usados para el tratamiento paliativo de la enfermedad de Parkinson o uno o más fármaco(s) que están siendo evaluados actualmente en el marco de ensayos clínicos para tratar la enfermedad de Parkinson.

30 Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden combinarse con fármacos dopaminérgicos tales como precursores de dopamina (preferiblemente levodopa, melevodopa), agonistas de receptor de dopamina (preferiblemente talipexol, piribedil, rotigotina, bromocriptina, pergolide, cabergolina, lisuride, pramipexol, ropinirol o apomorfina) o inhibidores de enzimas metabolizadoras de dopamina (preferiblemente selegilina, rasagilina).

35 Las composiciones de la invención también pueden combinarse con otros tratamientos conocidos para la EP, tratamientos paralelos para la EP, o el tratamiento de los síntomas no motores de la EP o, preferiblemente monosialotetrahexosilganglioside, citicolina, droxidopa mazaticol, prometazina, quetiapina, prociclidina, orfenadrina, domperidona, benztropina, trihexifenidil, biperiden, clozapina, desipramina, citalopram, nortriptilina, paroxetina, atomoxetina, venlafaxina, amantadina, donepezil, rivastigmina o memantina.

40 Dicho uso de las composiciones o combinaciones de la invención con las terapias mencionadas anteriormente permitiría reducir las dosis terapéuticas de los fármacos en cuestión, y de esta manera se reducirían, retrasarían o evitarían los efectos secundarios conocidos asociados a dichos fármacos, por ejemplo la discinesia de dosis máxima que se observa en pacientes tratados con levodopa.

45 A este respecto, un objetivo adicional de esta invención se refiere a una composición, para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, que comprende una composición de la invención como la definida anteriormente, en combinación con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en levodopa, talipexol, piribedil, rotigotina, bromocriptina, pergolide, cabergolina, lisuride, pramipexol, ropinirol, apomorfina, selegilina, rasagilina, monosialotetrahexosilganglioside, citicolina, droxidopa mazaticol, prometazina, quetiapina, prociclidina, orfenadrina, domperidona, benztropina, trihexifenidil, biperiden, clozapina, desipramina, citalopram, nortriptilina, paroxetina, atomoxetina, venlafaxina, amantadina, donepezil, rivastigmina y memantina, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

50 Por lo tanto, esta invención también describe una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente la EP, que comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o una sal(es), un profármaco(s), un derivado(s) de cualquier pureza química, o una formulación(es) de liberación sostenida de los mismos, en combinación con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en levodopa, talipexol, piribedil, rotigotina, bromocriptina, pergolide, cabergolina, lisuride, pramipexol, ropinirol, apomorfina, selegilina, rasagilina, monosialotetrahexosilganglioside, citicolina, droxidopa mazaticol, prometazina, quetiapina, prociclidina, orfenadrina, domperidona, benztropina, trihexifenidil, biperiden, clozapina, desipramina, citalopram, nortriptilina, paroxetina,

atomoxetina, venlafaxina, amantadina, donepezil, rivastigmina y memantina, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

La invención también describe una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos:

- 5
- baclofeno y levodopa,
  - torasemida y levodopa,
  - sulfisoxazol y levodopa,
  - mexiletina y levodopa, o
  - cinacalcet y levodopa.

10 o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para administración combinada, separada o secuencial.

La invención también describe una composición *per se* que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos:

- 15
- baclofeno y levodopa,
  - torasemida y levodopa,
  - sulfisoxazol y levodopa,
  - mexiletina y levodopa, o
  - cinacalcet y levodopa.

20 o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para administración combinada, separada o secuencia.

La invención también describe un método para tratar el Parkinsonismo, particularmente la EP, en un sujeto que lo necesite, que comprende la administración simultánea, separada o secuencial al sujeto de una cantidad efectiva de una combinación de al menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste en acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, en combinación con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en levodopa, talipexol, piribedil, rotigotina, bromocriptina, pergolide, cabergolina, lisuride, pramipexol, ropinirol, apomorfina, selegilina, rasagilina, monosialotetrahexosilganglioside, citicolina, droxidopa mazaticol, prometazina, quetiapina, prociclidina, orfenadrina, domperidona, benztropina, trihexifenidil, biperiden, clozapina, desipramina, citalopram, nortriptilina, paroxetina, atomoxetina, venlafaxina, amantadina, donepezil, rivastigmina y memantina, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

25

30

En una realización, la invención se refiere a una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, que comprende una cantidad efectiva de baclofeno y acamprosato o de sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, en combinación con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en levodopa, talipexol, piribedil, rotigotina, bromocriptina, pergolide, cabergolina, lisuride, pramipexol, ropinirol, apomorfina, selegilina, rasagilina, monosialotetrahexosilganglioside, citicolina, droxidopa mazaticol, prometazina, quetiapina, prociclidina, orfenadrina, domperidona, benztropina, trihexifenidil, biperiden, clozapina, desipramina, citalopram, nortriptilina, paroxetina, atomoxetina, venlafaxina, amantadina, donepezil, rivastigmina y memantina, o sales o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

35

La invención también describe un método para tratar el Parkinsonismo, particularmente la EP, en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente al sujeto una cantidad efectiva de mexiletina y cinacalcet o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, en combinación con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en levodopa, talipexol, piribedil, rotigotina, bromocriptina, pergolide, cabergolina, lisuride, pramipexol, ropinirol, apomorfina, selegilina, rasagilina, monosialotetrahexosilganglioside, citicolina, droxidopa mazaticol, prometazina, quetiapina, prociclidina, orfenadrina, domperidona, benztropina, trihexifenidil, biperiden, clozapina, desipramina, citalopram, nortriptilina, paroxetina, atomoxetina, venlafaxina, amantadina, donepezil, rivastigmina y memantina, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

40

45

La invención describe un método para tratar el Parkinsonismo, particularmente la EP, en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente al sujeto una cantidad efectiva de torasemida y baclofeno o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, en combinación con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en levodopa, talipexol, piribedil, rotigotina, bromocriptina, pergolide, cabergolina, lisuride, pramipexol, ropinirol, apomorfina, selegilina, rasagilina, monosialotetrahexosilganglioside, citicolina, droxidopa mazaticol, prometazina, quetiapina, prociclidina, orfenadrina, domperidona, benztropina, trihexifenidil, biperiden, clozapina, desipramina, citalopram, nortriptilina, paroxetina, atomoxetina, venlafaxina, amantadina, donepezil, rivastigmina y memantina, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

50

55

La invención describe un método para tratar el Parkinsonismo, particularmente la EP, en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente al sujeto una cantidad efectiva de sulfisoxazol y torasemida o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, en combinación con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en levodopa, talipexol, piribedil, rotigotina, bromocriptina, pergolide, cabergolina, lisuride, pramipexol, ropinirol, apomorfina, selegilina, rasagilina, monosialotetrahexosilganglioside, citicolina, droxidopa mazaticol, prometazina, quetiapina, prociclidina, orfenadrina, domperidona, benztropina, trihexifenidil, biperiden, clozapina, desipramina, citalopram, nortriptilina, paroxetina, atomoxetina, venlafaxina, amantadina, donepezil, rivastigmina y memantina, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

La invención también describe un método para tratar el Parkinsonismo, particularmente la EP, en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente al sujeto una cantidad efectiva de cinacalcet y acamprosato o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, en combinación con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en levodopa, talipexol, piribedil, rotigotina, bromocriptina, pergolide, cabergolina, lisuride, pramipexol, ropinirol, apomorfina, selegilina, rasagilina, monosialotetrahexosilganglioside, citicolina, droxidopa mazaticol, prometazina, quetiapina, prociclidina, orfenadrina, domperidona, benztropina, trihexifenidil, biperiden, clozapina, desipramina, citalopram, nortriptilina, paroxetina, atomoxetina, venlafaxina, amantadina, donepezil, rivastigmina y memantina, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

La invención también describe un método para tratar el Parkinsonismo, particularmente la EP, en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente al sujeto una cantidad efectiva de baclofeno y cinacalcet o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, en combinación con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en levodopa, talipexol, piribedil, rotigotina, bromocriptina, pergolide, cabergolina, lisuride, pramipexol, ropinirol, apomorfina, selegilina, rasagilina, monosialotetrahexosilganglioside, citicolina, droxidopa mazaticol, prometazina, quetiapina, prociclidina, orfenadrina, domperidona, benztropina, trihexifenidil, biperiden, clozapina, desipramina, citalopram, nortriptilina, paroxetina, atomoxetina, venlafaxina, amantadina, donepezil, rivastigmina y memantina, o sales o profármacos o derivados de cualquier pureza o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

Las composiciones preferidas descritas en esta invención, para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, siendo los fármacos de cada una de dichas combinaciones para administración combinada, separada o secuencia:

- baclofeno y acamprosato y levodopa,
- mexiletina y cinacalcet y levodopa,
- torasemida y baclofeno y levodopa,
- baclofeno y cinacalcet y levodopa,
- cinacalcet y acamprosato y levodopa, o
- sulfisoxazol y torasemida y levodopa.

La invención también describe una composición *per se* que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, siendo los fármacos de cada una de dichas combinaciones para administración simultánea, separada o secuencial:

- baclofeno y acamprosato y levodopa,
- mexiletina y cinacalcet y levodopa,
- torasemida y baclofeno y levodopa,
- baclofeno y cinacalcet y levodopa,
- cinacalcet y acamprosato y levodopa, o
- sulfisoxazol y torasemida y levodopa.

La invención también describe composiciones para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente la EP, que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, o sales, profármacos, derivados o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, siendo los fármacos de cada una de dichas combinaciones para administración combinada, separada o secuencia:

- baclofeno, cinacalcet, mexiletina y levodopa,
- cinacalcet, acamprosato, mexiletina y levodopa,
- baclofeno, acamprosato, cinacalcet y levodopa,
- baclofeno, acamprosato, torasemida y levodopa, o
- torasemida, baclofeno, cinacalcet y levodopa.

En una realización particular, cuando las composiciones o las terapias de combinación de la invención comprenden un precursor de dopamina, pueden combinarse adicionalmente con al menos un compuesto seleccionado entre

inhibidores de dopa descarboxilasa periféricos, inhibidores de catecol-O-metil transferasa o inhibidores de monoamina oxidasa. Más particularmente, cuando las composiciones o las terapias de combinación de la invención comprenden un precursor de dopamina, pueden combinarse adicionalmente con al menos un compuesto seleccionado entre carbidopa, benserazida, tolcapona, entacapona, selegilina o rasagilina.

- 5 Un objetivo adicional de esta invención reside en el uso de una composición como la definida anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP.

En otra realización, las composiciones o las terapias de combinación de la invención pueden usarse en conjunción con terapias quirúrgicas para la enfermedad de Parkinson, tales como la estimulación cerebral profunda. Más particularmente, las terapias quirúrgicas son la estimulación cerebral profunda del núcleo subtalámico o del *globus pallidus interna*.

En este sentido, la invención también describe una composición que comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, baclofeno, cinacalcet, mexiletina, sulfisoxazol y torasemida, o una sal(es), un profármaco(s), un derivado(s) de cualquier pureza química, o una formulación(es) de liberación sostenida de los mismos, para uso en combinación con estimulación cerebral profunda del núcleo subtalámico o del *globus pallidus interna*, en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP.

Los síntomas motores de la EP pueden desarrollarse de forma tardía cuando la denervación dopaminérgica del cuerpo estriado y la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra ya están produciéndose de forma extendida. Por tanto, es esencial el tratamiento de la EP antes de la aparición de los síntomas motores y como prevención para alterar la progresión y el curso de la enfermedad.

- 20 En relación a esto, en una realización preferida, se puede usar cualquiera de las composiciones o terapias de combinación para la prevención, profilaxis o retardo de los síntomas provocados, o de las causas, de la enfermedad de Parkinson.

La combinación de una detección temprana de los síntomas no motores, más particularmente de la anosmia, con técnicas de imagen (tecnología computerizada de emisión de fotón único, Tomografía de emisión de positrones) para determinar los cambios en el transportador de dopamina estriado puede ser una estrategia adecuada para identificar pacientes de EP en riesgo antes de la aparición de los síntomas motores, permitiendo de esta manera el comienzo temprano de la terapia neuroprotectora.

Algunos casos de EP pueden atribuirse a mutaciones dentro de genes tales como SNCA (alfa-sinucleína), PRKN (parkina), LRRK2 (cinasa 2 de repetición rica en leucina), PINK1 (cinasa 1 putativa inducida por PTEN), DJ-1 y ATP13A2 y once localizaciones génicas (PARK1-PARK11). En este sentido, en una realización particular, la invención se refiere al uso de las anteriores composiciones y terapias de combinación para el tratamiento de la EP en un sujeto que presenta una mutación en al menos uno de los siguientes genes: SNCA, PRKN, LRRK2, PINK1, DJ-1, ATP13A2 y PARK1 a PARK11.

Una exposición a altas concentraciones o una exposición crónica a metales tales como manganeso, cobre o plomo, o a productos químicos, tales como pesticidas (p.ej., paraquat, rotenona y maneb), son causas probables de Parkinsonismo, particularmente de EP. En este sentido, en una realización particular, la invención se refiere al uso de las anteriores composiciones o terapias de combinación en el tratamiento del Parkinsonismo, particularmente de la EP, en un sujeto expuesto, que se sospecha que ha sido expuesto o que está en riesgo de ser expuesto a productos químicos o metales que se conoce que son factores de riesgo para desarrollar EP o trastornos relacionados.

En una realización preferida, las anteriores composiciones o terapias de combinación pueden usarse en un sujeto que está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson o síntomas asociados a la enfermedad de Parkinson.

Una terapia según la invención puede ser proporcionada en el domicilio, en el despacho del doctor, en una clínica, en un departamento externo de un hospital, o en un hospital, de tal modo que el doctor puede observar los efectos de la terapia de cerca y aplicar cualquier ajuste necesario.

La duración de la terapia depende del estadio de la enfermedad tratada, de la edad y condición del paciente, y de cómo responda el paciente al tratamiento. La dosis, frecuencia y modo de administración de cada componente de la combinación se pueden controlar de forma independiente. Por ejemplo, se puede administrar un fármaco oralmente mientras que el segundo fármaco se puede administrar intramuscularmente. La terapia de combinación puede administrarse en ciclos on-off que incluyen periodos de descanso para que el cuerpo del paciente tenga la posibilidad de recuperarse de cualquier efecto secundario todavía no previsto. Los fármacos también pueden formularse juntos de tal modo que una única administración suministre todos los fármacos.

La administración de cada fármaco de la combinación puede realizarse por cualquier medio adecuado que dé como resultado una concentración del fármaco que, combinado con el otro componente, sea capaz de aliviar la afección del paciente o de tratar eficientemente la enfermedad o el trastorno.

Aunque es posible que los fármacos de la combinación sean administrados como compuestos químicos puros, es preferible presentarlos en forma de una composición farmacéutica, también denominada en este contexto formulación farmacéutica. Las posibles composiciones incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, tópica (que incluye transdérmica, bucal y sublingual), o parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica).

Más habitualmente estas formulaciones farmacéuticas se prescriben al paciente en “paquetes de paciente” que contienen un número de unidades de dosis u otros medios para la administración de dosis unitarias medidas para uso durante un periodo de tratamiento distinto en un único paquete, normalmente un paquete tipo blíster. Los paquetes de paciente presentan la ventaja sobre las prescripciones tradicionales de que el paciente siempre tiene acceso al prospecto del paquete contenido en el paquete de paciente, que normalmente no está presente en las prescripciones tradicionales. La inclusión de un prospecto de paquete ha demostrado mejorar la aceptación por parte del paciente de las instrucciones del médico. De esta manera, la invención incluye además una formulación farmacéutica, tal como se ha descrito en la presente memoria con anterioridad, en combinación con material de empaquetamiento adecuado para dichas formulaciones. En un paquete de paciente de este tipo el uso pretendido de una formulación para el tratamiento de combinación puede deducirse a partir de las instrucciones, instalaciones, provisiones, adaptaciones y/u otros medios para ayudar a usar la formulación de la forma más adecuada para el tratamiento. Dichas medidas hacen un paquete de paciente específicamente adecuado, y adaptado, para el uso en el tratamiento con la combinación de la presente invención.

El fármaco puede estar contenido, en cualquier cantidad apropiada, en cualquier sustancia vehículo adecuada. El fármaco puede estar presente en una cantidad de hasta 99% en peso del peso total de la composición. La composición puede suministrarse en una forma de dosis que sea adecuada para una ruta de administración oral, parenteral (p.ej., intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, nasal, vaginal, por inhalación, cutánea (parches) u ocular. De este modo, la composición puede estar en la forma de, p.ej., comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, disoluciones, geles que incluyen hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, apósitos, empapadores, dispositivos de administración osmótica, supositorios, enemas, inyectables, implantes, spray o aerosoles.

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

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden formularse para liberar el fármaco activo sustancialmente de forma inmediata tras la administración, o a cualquier tiempo o periodo de 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 a lo largo de un periodo de tiempo extendido; (ii) formulaciones que después de un periodo de tiempo de espera crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo a lo largo de un periodo de tiempo extendido; (iii) formulaciones que sostienen una acción del fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado manteniendo un nivel de fármaco efectivo, relativamente constante, en el cuerpo con una minimización concomitante de los efectos secundarios no deseados asociados a fluctuaciones del nivel en plasma de la sustancia farmacológica activa; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco mediante, p.ej., ubicación espacial de una composición de liberación controlada adyacente o en el tejido u órgano deseado; y (v) formulaciones que dirigen la acción del fármaco usando vehículos o derivados químicos para suministrar el fármaco a un tipo de célula diana particular.

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

Se puede utilizar cualquiera de una serie de estrategias para obtener una liberación controlada en la que la velocidad de liberación compense la velocidad del metabolismo del fármaco en cuestión. La liberación controlada se puede obtener mediante una selección apropiada de varios parámetros e ingredientes de formulación, que incluyen, p.ej., diversos tipos de composiciones y recubrimientos de liberación controlada. De esta manera, el fármaco es formulado con excipientes apropiados en una composición farmacéutica que, tras ser administrada, libera el fármaco de un modo controlado (composiciones de comprimidos o cápsulas de unidad individual o múltiple, disoluciones oleaginosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches y liposomas).

*Formas de dosis sólidas para uso oral*

Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen la composición de la invención en una mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Dichos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o rellenos inertes (p.ej., sacarosa, celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, carbonato cálcico, cloruro sódico, fosfato cálcico, sulfato cálcico o fosfato sódico); agentes granulantes y desintegrantes (p.ej., derivados de celulosa que incluyen celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, croscarmelosa sódica, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilén glicol); y agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (p.ej., ácido esteárico, sílices o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes aromatizantes, plastificantes, humectantes, agentes tamponantes, y otros similares.

Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden ser recubiertos mediante técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal, proporcionando de este modo una acción sostenida a lo largo de un periodo de tiempo más largo. El recubrimiento puede adaptarse para liberar la sustancia farmacológica activa de un modo predeterminado (p.ej., para alcanzar una formulación de liberación controlada) o puede adaptarse para no liberar la sustancia farmacológica activa hasta después de su paso por el estómago (recubrimiento entérico). El recubrimiento puede ser un recubrimiento de azúcar, un recubrimiento de película (p.ej., basado en hidroxipropil metilcelulosa, metilcelulosa, metil hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilén glicoles y/o polivinilpirrolidona), o un recubrimiento entérico (p.ej., basado en copolímeros de ácido metacrílico, acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa, acetato succinato de hidroxipropil metilcelulosa, acetato ftalato de polivinilo, shellac, y/o etilcelulosa). También se puede emplear un material de retardo temporal tal como, p.ej., gliceril monoestearato o gliceril diestearato.

Las composiciones de comprimidos sólidos pueden incluir un recubrimiento adaptado para proteger la composición de cambios químicos no deseados (p.ej., degradación química previa a la liberación de la sustancia farmacológica activa). El recubrimiento puede aplicarse sobre la forma de dosis sólida de un modo similar a como se describe en la "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology".

Los fármacos se pueden mezclar juntos en un comprimido, o pueden particionarse. Por ejemplo, un primer fármaco queda contenido en el interior del comprimido, y un segundo fármaco permanece en el exterior, de tal modo que una porción sustancial del segundo fármaco es liberada antes de la liberación del primer fármaco.

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

Las composiciones de liberación controlada para uso oral pueden, p.ej., construirse para liberar el fármaco activo a través del control de la disolución y/o la difusión de la sustancia farmacológica activa.

La liberación controlada por disolución o difusión se puede lograr mediante un recubrimiento apropiado de un comprimido, cápsula, partícula o formulación granulada de fármacos, o incorporando el fármaco en una matriz apropiada. Un recubrimiento de liberación controlada puede incluir una o más sustancias de recubrimiento mencionadas anteriormente y/o, p.ej., shellac, cera de abejas, glycowax, cera de ricino, cera carnauba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido dl-poli-láctico, acetato butirato de celulosa, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, vinil pirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metilmetacrilato, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3-butilén glicol, etilén glicol metacrilato, y/o polietilén glicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de matriz también puede incluir, p.ej., metilcelulosa hidratada, cera carnauba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, metil acrilato-metil metacrilato, 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 presentarse en la forma de comprimido o cápsula flotante (es decir, un comprimido o una cápsula que, tras administración oral, flota en la parte superior del contenido gástrico durante un determinado periodo de tiempo). Una formulación de comprimidos flotantes del fármaco(s) puede prepararse granulando una mezcla del fármaco(s) con excipientes y un 20-75% p/p de hidrocoloideos, tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. Los gránulos obtenidos pueden comprimirse entonces para conformar comprimidos. Al entrar en contacto con los jugos gástricos, el comprimido forma una barrera de gel sustancialmente impermeable al agua alrededor de su superficie. Esta barrera de gel ayuda a mantener la densidad por debajo de la unidad, permitiendo de este modo que el comprimido permanezca flotando en los jugos gástricos.

#### *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 dosis apropiadas para administración oral. La formulación de una suspensión proporciona el

ingrediente activo en una mezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión, y uno o más conservantes. Los agentes de suspensión adecuados son, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato sódico, y otros similares.

#### *Composiciones parenterales*

5 La composición farmacéutica también puede ser administrada parenteralmente mediante inyección, infusión o implantación (intravenosa, intramuscular, subcutánea o similar), en formas de dosis, formulaciones, o a través de dispositivos de administración o implantes adecuados que contienen vehículos y adyuvantes convencionales, no tóxicos y farmacéuticamente aceptables. La formulación y la preparación de dichas composiciones son bien conocidas por los especialistas en la técnica de la formulación farmacéutica.

10 Las composiciones para uso parenteral pueden proporcionarse en formas de dosis unitarias (p.ej., en ampollas de dosis individual), o en viales que contienen varias dosis y a los que se puede añadir un conservante adecuado (ver más adelante). La composición puede estar en forma de disolución, suspensión, emulsión, dispositivo de infusión o dispositivo de administración para implantación, o puede presentarse como un polvo seco a reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Aparte del fármaco(s) activo(s), la composición puede incluir vehículos y/o excipientes parenteralmente aceptables. El fármaco(s) activo(s) puede(n) incorporarse en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas, o similares, para una liberación controlada. La composición puede incluir agentes de suspensión, solubilizantes, estabilizantes, agentes de ajuste de pH y/o dispersantes.

20 Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden adoptar la forma de inyección estéril. Para preparar dichas composiciones, el fármaco(s) activo(s) adecuado(s) se disuelve(n) o se suspende(n) en un vehículo líquido parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentra el agua, el agua ajustada a un pH adecuado mediante la adición de una cantidad apropiada de ácido clorhídrico, hidróxido sódico o un tampón adecuado, 1,3-butanodiol, disolución de Ringer, y disolución isotónica de cloruro sódico. La formulación acuosa también puede contener uno o más conservantes (p.ej., metil, etil o n-propil p-hidroxibenzoato). En los casos en los que uno de los fármacos es solo moderada o ligeramente soluble en agua, se puede añadir un agente potenciador de la disolución o solubilizante, o el disolvente puede incluir un 10-60% p/p de propilén glicol o similar.

30 Las composiciones parenterales de liberación controlada pueden adoptar la forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, disoluciones oleaginosas, suspensiones oleaginosas, o emulsiones. Alternativamente, el fármaco(s) activo(s) puede(n) incorporarse en vehículos, liposomas, nanopartículas, implantes o dispositivos de infusión biocompatibles. Los materiales para uso en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, p.ej., polímeros biodegradables/bioerosionables tales como poligalactina, poli(isotubil cinaoacrilato), poli(2-hidroxietil-L-glutamina). Los vehículos biocompatibles que pueden usarse al formular una formulación parenteral de liberación controlada son carbohidratos (p.ej., dextranos), proteínas (p.ej., albúmina), lipoproteínas o anticuerpos. Los materiales para uso en implantes pueden ser no biodegradables (p.ej., polidimetil siloxano) o biodegradables (p.ej., poli(caprolactona), poli(ácido glicólico) o poli(orto ésteres)).

#### *Rutas alternativas*

Aunque menos preferidas y menos convenientes, se pueden contemplar otras rutas de administración, y por tanto otras formulaciones. En este sentido, para aplicación rectal, las formas de dosis adecuadas para una composición incluyen supositorios (de tipo emulsión o suspensión) y cápsulas rectales de gelatina (disoluciones o suspensiones).

40 En una formulación típica de supositorio, el fármaco(s) activo(s) se combina(n) con una base supositoria apropiada farmacéuticamente aceptable tal como manteca de cacao, ácidos grasos esterificados, gelatina glicerizada, y diversas bases solubles en agua o dispersables como los polietilén glicoles. Se pueden incorporar varios aditivos, potenciadores o tensioactivos.

45 Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse tópicamente sobre la piel para absorción percutánea en formas de dosis o formulaciones que contienen de forma convencional vehículos y excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que incluyen microesferas y liposomas. Las formulaciones incluyen cremas, pomadas, lociones, linimentos, geles, hidrogeles, disoluciones, suspensiones, barras, sprays, pastas, apósitos y otros tipos de sistemas de administración de fármacos transdérmicos. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir agentes emulsionantes, antioxidantes, agentes tamponantes,

50 conservantes, humectantes, potenciadores de la penetración, agentes quelantes, agentes formadores de gel, bases para pomadas, perfumes y agentes protectores de la piel.

Los conservantes, humectantes, potenciadores de la penetración pueden ser parabenos, tales como metil o propil p-hidroxibenzoato, y cloruro de benzalconio, glicerina, propilén glicol, urea, etc.

55 Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para administración tópica sobre la piel también pueden usarse en relación a una administración tópica sobre una parte del cuerpo que vaya a ser tratada, o en las proximidades de ésta. Las composiciones pueden adaptarse para una aplicación directa o para una aplicación a través de dispositivos especiales de administración de fármacos, tal como vendajes o alternativamente apósitos, compresas, esponjas, tiras u otras formas de material flexible adecuado.

*Dosis y duración del tratamiento*

- 5 Cabe destacar que los fármacos de la combinación pueden administrarse concomitantemente, tanto en la misma formulación farmacéutica como secuencialmente. Si existe una administración secuencial, el retardo en la administración del segundo (o adicional) ingrediente activo no debería ser tal que se perdiera 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 debería destinarse al uso combinado con el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. El uso pretendido de una combinación puede deducirse mediante las instalaciones, provisiones, adaptaciones y/u otros medios que ayuden a usar la combinación según la invención.
- 10 Las cantidades terapéuticamente efectivas de los fármacos en una combinación de esta invención incluyen, p.ej., cantidades que son efectivas para reducir los síntomas de la enfermedad de Parkinson, detener o frenar la progresión de la enfermedad una vez que se ha manifestado clínicamente, o la prevención o reducción del riesgo de desarrollar la enfermedad.
- 15 Aunque los fármacos activos de la presente invención pueden 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 lo más preferible una única dosis diaria de todos los fármacos en una única composición farmacéutica (forma de dosis unitaria).
- La administración puede ser de una a varias veces al día durante varios días a varios años, e incluso puede ser durante la vida del paciente. En la mayoría de los casos está indicada una administración a largo plazo crónica o al menos repetida periódicamente.
- 20 El término "forma de dosis unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas (tal como cápsulas, comprimidos, o cilindros de jeringa cargados) adecuados como dosis unitarias para sujetos humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material o materiales activos calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.
- 25 La cantidad de cada fármaco en una composición de dosis unitaria preferida depende de varios factores, que incluyen el método de administración, el peso corporal y la edad del paciente, el estadio de la enfermedad, el riesgo de efectos secundarios potenciales considerando el estado de salud general de la persona que va a ser tratada. Adicionalmente, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo sobre el perfil farmacocinético, farmacodinámico o de eficacia de un agente terapéutico) sobre un paciente particular puede afectar a la dosis usada.
- 30 Excepto cuando se responde a casos especialmente perjudiciales, donde se pueden requerir dosis mayores, la dosis preferida de cada fármaco de la combinación normalmente estará dentro del rango de dosis que no superan la dosis prescrita habitualmente para un tratamiento de mantenimiento a largo plazo, o que han demostrado ser seguras en estudios clínicos de fase 3.
- 35 Una ventaja remarcable de la invención es que cada compuesto puede usarse a bajas dosis en una terapia de combinación, a la vez que produce, en combinación, un beneficio clínico sustancial al paciente. De hecho, la terapia de combinación puede ser efectiva en dosis en las que los compuestos individualmente no tienen efecto o tienen poco efecto. Por consiguiente, una ventaja particular de la invención es la capacidad de usar dosis sub-óptimas de cada compuesto, es decir, dosis que son inferiores a las dosis terapéuticas prescritas habitualmente, preferiblemente 1/2 de las dosis terapéuticas, más preferiblemente 1/3, 1/4, 1/5, o incluso más preferiblemente 1/10 de las dosis terapéuticas. En ejemplos particulares, se usan dosis de 1/20, 1/30, 1/50, 1/100 de las dosis terapéuticas, o incluso menores.
- 40 Con dichas dosificaciones sub-terapéuticas, los compuestos no exhibirían efectos secundarios, mientras que la combinación(es) según la invención sería(n) completamente efectiva(s) para tratar la enfermedad de Parkinson.
- Una dosis preferida corresponde a cantidades del 1% y hasta el 50% de las prescritas habitualmente para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo.
- 45 La dosis más preferida puede corresponder a cantidades del 1% y hasta el 10% de las prescritas habitualmente para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo.
- A continuación se proporcionan ejemplos específicos de dosis de fármacos (Cantidad equivalente a molécula activa) para uso tal como se describe en la invención:
- 50 - acamprosato: 1000 mg o menos al día, preferiblemente menos de 500 mg al día, preferiblemente menos de 400 mg al día, más preferiblemente menos de 200 mg al día, más preferiblemente menos de 50 mg al día, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente de 1 a 50 mg al día, o incluso menos de 10 mg al día, siendo dichas dosis particularmente adecuadas para administración oral.

- baclofeno: 150 mg o menos al día, preferiblemente menos de 100 mg al día, más preferiblemente menos de 50 mg al día, más preferiblemente menos de 30 mg al día, incluso más preferiblemente entre 0,01 mg y 30 mg al día, siendo dichas dosis particularmente adecuadas para administración oral.
- 5 - cinacalcet: 150 mg o menos al día, preferiblemente menos de 100 mg al día, más preferiblemente menos de 50 mg al día, más preferiblemente menos de 36 mg al día, incluso más preferiblemente entre 0,01 mg y 25 mg al día, siendo dichas dosis particularmente adecuadas para administración oral.
- mexiletina: 120 mg o menos al día, preferiblemente menos de 60 mg al día, más preferiblemente menos de 30 mg al día, más preferiblemente menos de 15 mg al día, incluso más preferiblemente entre 6 mg y 15 mg al día, siendo dichas dosis particularmente adecuadas para administración oral.
- 10 - torasemida: 4 mg o menos al día, preferiblemente menos de 2 mg al día, más preferiblemente menos de 1 mg al día, más preferiblemente menos de 0,5 mg al día, e incluso más preferiblemente entre 0,05 mg y 0,5 mg al día, siendo dichas dosis particularmente adecuadas para administración oral.
- 15 - sulfisoxazol: 800 mg o menos al día, preferiblemente menos de 400 mg al día, más preferiblemente menos de 200 mg al día, más preferiblemente menos de 100 mg al día, incluso más preferiblemente menos de 20 mg al día, siendo dichas dosis particularmente adecuadas para administración oral.
- levodopa: 1,5 g o menos al día, preferiblemente menos de 750 mg al día, más preferiblemente menos de 375 mg al día, incluso más preferiblemente menos de 100 mg al día, siendo dichas dosis particularmente adecuadas para administración oral.

20 Cabe destacar que la cantidad del fármaco o de la combinación de fármaco administrada realmente será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, que incluyen la afección o afecciones a tratar, la composición exacta a administrar, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y la ruta elegida para la administración. Por tanto, los anteriores rangos de dosis pretenden proporcionar una guía general y un apoyo a los contenidos de la presente memoria, pero no pretenden limitar el alcance de la invención.

25 Algunos de los siguientes ejemplos se mencionan únicamente con fines comparativos y no forman parte de la presente invención.

#### EJEMPLOS

30 *Todos los procedimientos con animales han sido llevados a cabo siguiendo las guías del "National Institute of Health" (NIH) en lo referente al cuidado y uso de animales de laboratorio, y han sido aprobados por el "National Animal Experiment Board".*

#### A- PREVENCIÓN DE LA TOXICIDAD DE GLUTAMATO SOBRE CÉLULAS NEURONALES

35 La toxicidad de glutamato está implicada en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. En este conjunto de experimentos, se han evaluado compuestos candidatos para determinar su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos de toxicidad de glutamato sobre las células neuronales. Los fármacos son evaluados en primer lugar de forma individual, seguido de ensayos de evaluación de su acción combinada.

##### *Preparación de células neuronales*

La eficacia de las combinaciones de fármacos de la invención se realiza sobre células neuronales corticales primarias.

40 Se cultivaron neuronas corticales de rata como se describe en Singer et al. (30). Resumidamente, ratas hembra preñadas de 15 días de gestación fueron sacrificadas por dislocación cervical (Rats Wistar) y se extrajeron los fetos del útero. Se retiró el córtex y se colocó en medio de Leibovitz (L15) enfriado en hielo que contenía un 2% de penicilina 10,000 U/mL y estreptomina 10 mg/mL y un 1% de albúmina de suero bovino (BSA). Se disociaron los córtex mediante tripsina durante 20 minutos a 37°C (0,05%). La reacción se detuvo mediante la adición de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía ADNasa1 de grado II y un 10% de suero de ternera fetal (FCS). A continuación las células fueron disociadas mecánicamente mediante 3 pasajes en serie a través de una pipeta de 10 mL y se centrifugaron a 515 x g durante 10 minutos a +4°C. El sobrenadante se descartó y la partícula de células se re-suspendió en un medio de cultivo definido que consiste en Neurobasal suplementado con B27 (2%), L-glutamina (0,2 mM), 2% de disolución PS y 10 ng/mL de BDNF. Las células viables fueron contabilizadas en un citómetro Neubauer usando el test de exclusión de azul de tripano. Las células fueron sembradas con una densidad de 30 000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (los pocillos se pre-recubrieron con poli-L-lisina (10 µg/mL)) y se cultivaron a +37°C en una atmósfera de aire humidificado (95%)/CO<sub>2</sub> (5%).

##### *Ensayos de toxicidad de glutamato*

El efecto neuroprotector de los compuestos se determina mediante cuantificación de la red de neuritas (inmunotinción de neurofilamentos (NF)) que revela específicamente las neuronas glutamatérgicas.

Después de 12 días de cultivo de neuronas, los fármacos de las combinaciones candidatas se disuelven en medio de cultivo (+0,1% de DMSO). Las combinaciones candidatas son preincubadas entonces con neuronas durante 1 hora antes de la lesión por glutamato. Una hora después de la incubación, se añade glutamato durante 20 minutos hasta una concentración final de 40  $\mu$ M, en presencia de combinaciones candidatas, a fin de evitar diluciones adicionales de fármacos. Al final de la incubación, el medio se cambia por medio con la combinación candidata pero sin glutamato. El cultivo se fija 24 horas después de la lesión con glutamato. Como control positivo se usa MK801 (hidrógeno maleato de dizocilpina, 77086-22-7 - 20  $\mu$ M).

Tras permeabilización con saponina (Sigma), las células son bloqueadas durante 2h con PBS que contiene un 10% de suero de cabra, a continuación las células son incubadas con anticuerpo primario monoclonal de ratón contra anticuerpo de Neurofilamento (NF, Sigma). Este anticuerpo es revelado con IgG anti-ratón de cabra Alexa Fluor 488.

Los núcleos de las células son marcados con un marcador fluorescente (disolución Hoechst, SIGMA), y se cuantifica la red de neuritas. Se usan seis pocillos por condición para determinar la supervivencia neuronal en 3 cultivos diferentes.

*Resultados*

Todas las combinaciones de fármacos evaluadas proporcionan un efecto protector contra la toxicidad de glutamato para células neuronales corticales. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 2.

Como se ejemplifica en las figuras 1 a 3, las combinaciones de la invención protegen fuertemente a las neuronas frente a la toxicidad de glutamato en las condiciones experimentales descritas anteriormente. Cabe destacar que se observa una protección eficaz usando concentraciones de fármaco para las cuales los fármacos solos no presentan un efecto protector significativo o presentan un efecto menor.

De hecho, como demuestra la figura 1, la combinación mexiletina-cinacalcet protege eficazmente a las células neuronales frente a la toxicidad de glutamato, mientras que no se observa protección con los fármacos individuales. La combinación baclofeno-acamprosato (figura 3) proporciona un efecto protector contra la toxicidad de glutamato para células neuronales corticales. La combinación de baclofeno y acamprosato induce una mejoría de más del 200% en comparación con el acamprosato solo, y de más del 47% en comparación con el baclofeno usado solo.

**Tabla 2**

Combinación de fármacos	Efecto neuroprotector frente a la toxicidad de glutamato
baclofeno y torasemida	+
baclofeno-acamprosato-torasemida	+
mexiletina y cinacalcet	+
sulfisoxazol y torasemida	+
baclofeno y acamprosato	+
acamprosato y cinacalcet	+
baclofeno y cinacalcet	+

**B- EFECTO PROTECTOR FRENTE A MUERTE DE CÉLULAS NEURONALES INDUCIDA POR ISQUEMIA/HIPOXIA**

*Preparación de células corticales neuronales de rata*

Las células se preparan como se ha indicado previamente.

*Ensayos de privación de oxígeno y glucosa (modelo in vitro de isquemia)*

El efecto neuroprotector de los compuestos se determina mediante cuantificación de la red de neuritas (inmunotinción de neurofilamento (NF)) usando anticuerpo MAP2. Como control positivo se usa Riluzo, un fármaco neuroprotector (Riluteck®, 5  $\mu$ M).

Después de 10 días de cultivo de neuronas, los fármacos candidatos se disuelven en medio de cultivo (+0,1% de DMSO) y a continuación se pre-incuban con las neuronas durante 1 hora antes de la privación de oxígeno y glucosa. Una hora después de la incubación del fármaco candidato, se retira el medio y se añade medio fresco sin glucosa. Este medio está compuesto de DMEM sin glucosa (Invitrogen) suplementado con un 2% de B27, L-glutamina 0,2

mM, disolución de PS al 1%, 10 ng/mL de BDNF. Las células se transfieren a una incubadora anaerobia con 95% de N<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Después de 2 horas, se añade D-glucosa 25 mM en medio de cultivo y las células son transferidas a una incubadora clásica con un 95% de aire/5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Tras 24 horas de reperfusión de oxígeno y glucosa, las células son fijadas mediante una disolución fría de alcohol/ácido acético durante 5 minutos.

Tras permeabilización con saponina (Sigma), las células son bloqueadas durante 2 horas con PBS que contiene un 10% de suero de cabra, a continuación las células son incubadas con anticuerpo monoclonal primario de ratón control MAP2 (MAP2, Sigma). Estos anticuerpos son revelados con IgG anti-ratón de cabra Alexa Fluor 488 (sonda Molecular).

Los núcleos de las células son marcados con un marcador fluorescente (disolución Hoechst, SIGMA). Se usan seis pocillos por condición para determinar la supervivencia neuronal en 3 cultivos diferentes. Para cada condición, se toman 2 x 10 fotos por pocillo y se analizan usando un Analizador InCell TM 1000 (GE Healthcare) con un 20x de aumento.

**Resultados**

Tal como se muestra a continuación en la Tabla 3, las combinaciones de fármaco reivindicadas proporcionan un efecto protector frente a la muerte celular inducida por isquemia/hipoxia para células neuronales corticales.

**Tabla 3**

Combinación de fármacos	Efecto protector frente a isquemia/hipoxia
baclofeno y torasemida	+
baclofeno-acamprosato-torasemida	+
mexiletina y cinacalcet	+
sulfisoxazol y torasemida	+
baclofeno y acamprosato	+
acamprosato y cinacalcet	+
baclofeno y cinacalcet	+

Las figuras 4-6 muestran además que los tratamientos de combinación reivindicados y/o descritos en la invención protegen fuertemente a las neuronas frente a la privación de oxígeno y glucosa. Tal como se muestra en las figuras 4-6, se observa una protección efectiva usando concentraciones de fármaco en las que los fármacos, solos, no tienen un efecto protector significativo. Por ejemplo, se observa un efecto protector significativo de la combinación de baclofeno (80 nM) /acamprosato (0,32 nM) o de la combinación de cinacalcet (64 pM) /mexiletina (25,6 pM) o de torasemida (80 nM) /sulfisoxazol (1,36 nM), en isquemia, mientras que no se observa una protección significativa cuando se usa baclofeno, acamprosato, cinacalcet, mexiletina, torasemida y sulfisoxazol solos, a las mismas concentraciones.

Por lo tanto, estos resultados demuestran un potente efecto sinérgico de las terapias de combinación sobre el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial o la apoptosis, que subyacen en las afecciones isquémicas y en la enfermedad de Parkinson.

**C- EFECTO NEURO-PROTECTOR DE LOS FÁRMACOS FRENTE A LESIÓN 6OHDA EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS**

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) es un fármaco neurotóxico que destruye selectivamente las neuronas dopaminérgicas generando especies de oxígeno reactivo en las células. La toxicidad de 6OHDA se usa habitualmente *in vitro* e *in vivo* para estudiar el Parkinsonismo.

**Cultivo de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas**

Se cultivaron neuronas dopaminérgicas de rata como se describe en Schinelli *et al.* (31). Ratas hembra preñadas de 15 días de gestación fueron sacrificadas por dislocación cervical (Rats Wistar; Janvier) y se extrajeron los fetos del útero. Se retiraron los mesoencéfalos embrionarios y se colocaron en medio de Leibovitz (L15; PanBiotech) enfriado en hielo que contenía un 2% de penicilina-estreptomina (PS; PanBiotech) y un 1% de albúmina de suero bovino (BSA; PanBiotech). Solo se usaron las porciones ventrales del flexo mesencefálico para las preparaciones celulares, ya que ésta es la región del cerebro en desarrollo rica en neuronas dopaminérgicas. Los mesencéfalos fueron disociados mediante tripsinización durante 20 minutos a 37°C (Tripsina EDTA 1X; PanBiotech). La reacción se detuvo mediante la adición de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; PanBiotech) que contenía ADNasa I de

grado II (0,1 mg/mL; PanBiotech) y un 10% de suero de ternera fetal (FCS; Invitrogen). A continuación las células fueron disociadas mecánicamente mediante 3 pasajes en serie a través de una pipeta de 10 mL y se centrifugaron a 180 x g durante 10 minutos a +4°C sobre una capa de BSA (3,5%) en medio L15. El sobrenadante se descartó y la partícula de células se re-suspendió en un medio de cultivo definido que consiste en Neurobasal (Invitrogen) suplementado con B27 (2%; Invitrogen), L-glutamina (2 mM; PanBiotech) y 2% de disolución PS y 10 ng/mL de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, PanBiotech) y 1 ng/mL de factor neurotrófico derivado de glia (GDNF, PanBiotech). Las células viables fueron contabilizadas en un citómetro Neubauer usando el test de exclusión de azul de tripano. Las células fueron sembradas con una densidad de 40 000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (pre-recubiertos con poli-L-lisina (Greiner)) y se cultivaron a 37°C en una atmósfera de aire humidificado (95%/CO2 (5%)). Se cambió la mitad del medio cada 2 días por medio fresco. Del cinco al seis por ciento de la población de células neuronales eran neuronas dopaminérgicas.

*Exposición a 6-OHDA y compuestos de ensayo*

En el día 6 del cultivo, se retiró el medio y se añadió medio fresco, con y sin 6OHDA en las siguientes concentraciones: 20 µM durante 48 horas diluida en medio de control. Los compuestos de ensayo fueron pre-incubados durante 1h antes de la aplicación de 6-OHDA durante 48 horas.

*Evaluación del punto final: medida del número total de neuronas TH positivas*

Tras 48 horas de intoxicación con 6OHDA, las células fueron fijadas mediante una disolución de paraformaldehído al 4% (Sigma) en PBS, pH = 7,3 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas nuevamente dos veces en PBS, y a continuación permeabilizadas y los sitios no específicos fueron bloqueados con una disolución de PBS que contenía un 0,1% de saponina (Sigma) y un 1% de FCS durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron incubadas con anticuerpo monoclonal anti-tirosina hidroxilasa producido en ratones (TH, Sigma) con una dilución de 1/1000 en PBS que contenía un 1% de FCS, un 0,1% de saponina, durante 2 h a temperatura ambiente. Dichos anticuerpos fueron revelados con IgG anti-ratón de cabra Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) a una dilución de 1/800 en PBS que contenía un 1% de FCS, un 0,1% de saponina, durante 1 h a temperatura ambiente.

Para cada condición, se tomaron 2 x 10 fotos por pocillo (que representan ~ 80% del área total de pocillo) usando un InCell Analyzer™ 1000 (GE Healthcare) con un aumento de 10x. Todas las imágenes fueron tomadas en las mismas condiciones. El análisis del número de neuronas TH positivas se realizó usando el software Developer (GE Healthcare).

Los datos se expresan en porcentaje de las condiciones de control (sin intoxicación, sin 6OHDA = 100%) a fin de expresar la lesión de 6OHDA. Todos los valores se expresan como la media +/- SEM (s.e.mean) de los 3 cultivos (n = 6 pocillos por condición por cultivo). Los análisis estadísticos consisten en un ANOVA seguido de los test de Dunnett y PLSD de Fisher cuando se permitió usando el software Statview versión 5.0.

*Resultados*

Se observa un efecto neuroprotector para las combinaciones reivindicadas de la invención en el ensayo de supervivencia de neuronas TH tras 48 h de lesión de 6-OHDA sobre neuronas dopaminérgicas.

Una incubación de 48h de 6-OHDA (20 µM) con neuronas mesencefálicas produjo una intoxicación significativa de las neuronas dopaminérgicas (alrededor del -33% de las neuronas TH) en todos los experimentos (control, figuras 7-9).

Se usó BDNF como control positivo. Una hora de pre-tratamiento de BDNF a 1,85 nM protegió significativamente las neuronas dopaminérgicas de esta lesión de 6-OHDA.

Tal como se muestra a continuación en la tabla 4, las combinaciones de fármacos reivindicadas proporcionan un efecto protector contra la lesión de 6OHDA en células neuronales dopaminérgicas.

Tal como se muestra en las figuras 7-9, las combinaciones de baclofeno-acamprosato, baclofeno-torasemida y mexiletina-cinacalcet protegieron con éxito a las neuronas dopaminérgicas frente a la intoxicación de 6-OHDA, de un modo dependiente de la dosis.

**Tabla 4**

Combinación de fármacos	Efecto protector frente a acinesia estereotáxica inducida por 6OHDA
baclofeno y torasemida	+
baclofeno-acamprosato-torasemida	+
mexiletina y cinacalcet	+

Combinación de fármacos	Efecto protector frente a acinesia estereotáxica inducida por 6OHDA
sulfisoxazol y torasemida	+
baclofeno y acamprosato	+
acamprosato y cinacalcet	+
baclofeno y cinacalcet	+

#### D- EFECTOS SOBRE LA PÉRDIDA NEURONAL DOPAMINÉRGICA *IN VIVO* Y SOBRE LOS SÍNTOMAS MOTORES

##### *Cría de animales y procedimiento quirúrgico*

- 5 Se usaron ratas Wistar (5 semanas) tras un periodo de aclimatación de al menos 5 días. Se llevó a cabo una cirugía con quetamina (50 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Los animales recibieron una inyección unilateral de 12 µg de 6-OHDA (Sigma Aldrich) disueltos en 6 µL de NaCl estéril al 0,9% que contenía un 0,1% de ácido ascórbico (para proteger el 6-OHDA frente a la oxidación), con un caudal de 1 µL/min, en la *substantia nigra pars compacta* izquierda. Las coordenadas estereotáxicas del sitio de inyección fueron: anteroposterior + 2,2 mm, lateral 2,0 mm, dorsoventral + 3 mm con la barra de incisión a + 5,0 mm por encima del plano interaural, según el atlas estereotáxico de rata de De Groot (1959) (32).

##### *Tratamiento con fármaco(s)*

- 15 La primera administración del tratamiento (o de vehículo) se ha realizado el día antes de la inyección estereotáxica de 6-OHDA (para los grupos lesionados) o de vehículo y todos los 15 días previos a los ensayos de comportamiento. Durante el estudio y para cada animal, se determinó el volumen de administraciones P.O. en base al peso corporal medio de los animales del grupo correspondiente. Los pesos corporales se determinarán dos veces por semana y el volumen de administración se ajustará así en consecuencia.

- 20 Los vehículos y los compuestos han sido administrados dos veces al día a través de la ruta P.O., por la mañana y por la tarde; con ocho horas (+/- 30 minutos) de separación entre ambas administraciones, alrededor de las 9:30 AM y alrededor de las 17:30 PM.

El día de los ensayos de comportamiento, los fármacos se administraron aproximadamente 1 h para el grupo tratado con L-DOPA y aproximadamente 2 h (+/- 15 minutos) para las combinaciones de fármacos antes del ensayo de comportamiento, para cada animal.

##### *Ensayo de comportamiento*

- 25 Cada ensayo se llevó a cabo antes de la cirugía (2 o 3 días antes) para determinar el valor de nivel basal. La determinación de las funciones de comportamiento se llevó a cabo 15 días después de la inyección quirúrgica de 6-OHDA usando los dos ensayos diferentes.

- 30 Ensayo de tiempo de inicio: El animal fue mantenido por un técnico entrenado frente a una superficie plana. Solo se permitió el movimiento libre de uno de los dos miembros anteriores. Se registró el tiempo necesario para iniciar el movimiento hacia la superficie plana usando como punto de rotura 180 segundos (33).

Ensayo de pasos: La rata fue mantenida por el experimentador y solo se dejó libertad de movimiento a uno de los dos miembros anteriores sobre una superficie plana. La otra mano sujetó el miembro que no se iba a monitorizar con una zarpa tocando la mesa. A continuación el animal fue movido lentamente hacia delante y hacia atrás (5 segundos para 0,9 m) por el experimentador. Se contabilizó el número de pasos de ajuste para la zarpa derecha (33).

##### 35 *Resultados*

Se llevaron a cabo ensayos *in vivo* con las combinaciones de fármacos de la invención. Las combinaciones de fármacos evaluadas indujeron una mejoría significativa tanto en el ensayo de tiempo de inicio como en el ensayo de pasos (tabla 5).

**Tabla 5**

Combinación de fármacos	Efecto protector frente acinesia inducida por 6OHDA
baclofeno y torasemida	+
baclofeno-acamprosato-torasemida	+
mexiletina y cinacalcet	+

<b>Combinación de fármacos</b>	<b>Efecto protector frente acinesia inducida por 6OHDA</b>
sulfisoxazol y torasemida	+
baclofeno y acamprosato	+
acamprosato y cinacalcet	+
baclofeno y cinacalcet	+

Tal como se muestra en las figuras 10 y 11, las combinaciones de fármacos de la invención protegen fuertemente a las ratas de las lesiones estereotáxicas de 6OHDA. Cabe destacar que el tratamiento con la combinación de baclofeno-acamprosato da como resultado un alivio casi completo de la acinesia en el ensayo de pasos, de un modo dependiente de la dosis.

5

## REFERENCIAS

1. de Lau, L.M. y M.M. Breteler, Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 2006. 5(6): 525-35.
2. Samii, A., J.G. Nutt, y B.R. Ransom, Parkinson's disease. *Lancet*, 2004. 363(9423): p. 1783-93.
3. Savitt, J.M., V.L. Dawson, y T.M. Dawson, Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clin Invest*, 2006. 116(7): 1744-54.
4. Schapira, A.H. y P. Jenner, Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2011. 26(6): 1049-55.
5. Gao, H.M. y J.S. Hong, Gene-environment interactions: key to unraveling the mystery of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 2011. 94(1): 1-19.
6. Abbott, A., levodopa: the story so far. *Nature*, 2010. 466(7310): S6-7.
7. Rascol O., Lozano A., Stern M., Poewe W., Milestones in Parkinson's disease therapeutics. *Mov Disord*, 2011. 26(6): 1072-82.
8. Obeso J.A., Rodriguez-Oroz M.C., Goetz C.G., Marin C., Kordower J.H., Rodriguez M., Hirsch E.C., Farrer M., Schapira A.H., Halliday G., Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med*, 2010. 16(6): 653-61.
9. Ettmayer, P., Amidon, G. L., Clement, B. y Testa, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.* 47, 2393-2404 (2004).
10. Beaumont, K., Webster, R., Gardner, I. y Dack, K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the Discovery scientist. *Curr. Drug Metab.* 4, 461-485 (2003).
11. Heimbach T., Oh DM, Li LY, Rodríguez-Hornedo N., Garcia G., Fleisher D. Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *Int. J. Pharm.* 261, 81-92 (2003).
12. Yang, C. Y., Dantzig, A. H. y Pidgeon, C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm. Res.* 16, 1331-1343 (1999).
13. Steffansen B., Nielsen C.U., Brodin B., Eriksson A.H., Andersen R., Frokjaer S., Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 3-16 (2004).
14. Stella, Borchardt R, Hageman M, Oliyai R, Maag H, Tilley J, Prodrugs: Challenges and Rewards. Vol. 1-2. 2007, Nueva York: APPS Press y Springer.
15. Wermuth, CG. *The Practice of Medicinal Chemistry*. (Hardbound, 2003). Parte VI, Capítulo 33: Designing prodrugs and bioprecursors.
16. Pezron, I., Mitra A.K., Duvvuri S., Tirucherai G.S., Prodrug strategies in nasal drug delivery. *Expert Opin. Ther. Pat.*, Vol. 12, N° 3, 331-340 (2002).
17. Stella, V.J. Prodrugs as therapeutics. *Expert Opin. Ther. Pat.* 14, 277-280 (2004).
18. Stella, V. J. y Nti-Addae, K. W. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 677-694 (2007).
19. Higuchi, T.; Stella, V. eds. *Prodrugs As Novel Drug Delivery Systems*. ACS Symposium Series. American Chemical Society; Washington, DC (1975), 31.
20. Roche, E. B. *Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs*. American Pharmaceutical Association: Washington, DC (1977).
21. Lal R., Sukbuntherng J., Tai E. H., Upadhyay S., Yao F., Warren M. S., Luo W., Bu L., Nguyen S., Zamora J., Peng G., Dias T., Bao Y., Ludwikow M., Phan T., Scheuerman R. A., Yan H., Gao M., Wu Q. Q., Annamalai T., Raillard S. P., Koller K., Gallop M. A., Cundy K. C., Arbaclofen placarbil, a novel R-baclofen prodrug: improved absorption, distribution, metabolism, and elimination properties compared with R-baclofen. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. 330(3): 911-21.
22. Feng Xu, Ge Peng, Thu Phan, Usha Dilip, Jian Lu Chen, Tania Chernov-Rogan, Xuexiang Zhang, Kent Grindstaff, Thamil Annamalai, Kerry Koller, Mark A. Gallop, David J. Wustrow, Discovery of a novel potent GABAB receptor agonist; *Bioorg Med Chem Lett.* 2011 Nov 1; 21(21): 6582-5.
23. Andrew R. Leach, Valerie J. Gillet. *An Introduction to Chemoinformatics*. Springer 2007.

24. S. Asad Rahman, M. Bashton, G. L. Holliday, R. Schrader y J. M. Thornton: Small Molecule Subgraph Detector (SMSD) Toolkit, *Journal of Cheminformatics* 2009, 1:12.
25. Stahl H., Wermuth C. G. (Eds.) *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*. Wiley-VCH; 2ª edición (29 de marzo, 2011).
- 5 26. Hanafi R, Mosad S, Abouzid K, Niess R, Spahn-Langguth H. Baclofen ester and carbamate prodrug candidates: a simultaneous chromatographic assay, resolution optimized with DryLab. *J Pharm Biomed Anal.* 2011 Nov 1; 56(3): 569-76.
27. Neugebauer G, Besenfelder E, von Möllendorff E. Pharmacokinetics and metabolism of torasemide in man. *Arzneimittelforschung.* 1988 Enero; 38(1A): 164-6.
- 10 28. Kahle PJ, Waak J, Gasser T. DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free Radic Biol Med.* 2009 Nov 15; 47(10): 1354-61.
29. Lee DW, Rajagopalan S, Siddiq A, Gwiazda R, Yang L, Beal MF, Ratan RR, Andersen JK. Inhibition of prolyl hydroxylase protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity: model for the potential involvement of the hypoxia-inducible factor pathway in Parkinson disease. *J Biol Chem.* 2009 Oct 16; 284(42): 29065-76.
- 15 30. Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, y Dorsa DM. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neuroscience,* 1999. 19(7): 2455-2463.
31. Schinelli S, Zuddas A, Kopin IJ, Barker JL, di Porzio U. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine metabolism and 1-methyl-4-phenylpyridinium uptake in dissociated cell cultures from the embryonic mesencephalon. *J Neurochem.* 1988 Jun; 50(6): 1900-7.
- 20 32. Jouve L, Salin P, Melon C, Kerkerian-Le Goff L. Deep brain stimulation of the center median-parafascicular complex of the thalamus has efficient anti-parkinsonian action associated with widespread celular responses in the basal ganglia network in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2010 Jul 21; 30(29): 9919-28.
- 25 33. Olsson M, Nikkhah G, Bentlage C, Björklund A. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci.* 1995 May; 15(5 Pt 2): 3863-75.
34. Linazasoro G, Van Blercom N, Ugedo L y Ruiz Ortega JA. Pharmacological treatment of Parkinson's disease: life beyond dopamine D2/D3 receptors? *J. Neural Transm.* 2008, 115, 431-41.
- 30 35. Jimenez-Shahed J., Hunter C., Jankovic J. Acamprosate improves impulse control disorders in Parkinson's disease. *Neurology* 2008 Marzo; 70 (11 Supl. 1): A288.
36. Fox, S. H., Brotchie, J. M., y Lang, A. E. Non-dopaminergic treatments in development for Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology,* 2008 Octubre; 7(10), 927-38.
- 35 37. Madan A y Schiess MC. Intrathecal baclofen therapy slows progressive disability in multiple system atrophy. *Neuromodulation* 14, 176-8.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para uso en el tratamiento del Parkinsonismo, comprendiendo dicha composición acamprosato y baclofeno, o sales de los mismos, o una formulación de liberación sostenida de los mismos.
- 5 2. Una composición para uso de la reivindicación 1, en donde el Parkinsonismo es una afección seleccionada entre enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, atrofia sistémica múltiple, degeneración gangliónica cortical-basal, enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, demencia de Parkinson, distonia-parkinsonismo cruzados y Parkinsonismo secundario.
3. La composición para uso de la reivindicación 1, en donde el Parkinsonismo es enfermedad de Parkinson.
- 10 4. La composición para uso de la reivindicación 1 ó 3, que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos:
- baclofeno y acamprosato y cinacalcet,
  - baclofeno y acamprosato y torasemida, o
  - baclofeno y acamprosato y mexiletina,
- o las sales de los mismos, o una formulación de liberación sostenida de los mismos.
- 15 5. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además al menos un precursor de dopamina, al menos un agonista de receptor de dopamina, y/o al menos un inhibidor de enzimas metabolizadoras de dopamina.
- 20 6. La composición para uso de la reivindicación 5, en donde el al menos un precursor de dopamina se selecciona del grupo que consiste en levodopa y melevodopa, o las sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, talipexol, piribedil, rotigotina, bromocriptina, pergolide, cabergolina, lisuride, pramipexol, ropinirol o apomorfina, o las sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos, y el al menos un inhibidor de enzimas metabolizadoras de dopamina se selecciona del grupo que consiste en selegilina y rasagilina, o las sales o formulaciones de liberación sostenida de las mismas.
- 25 7. La composición para uso de la reivindicación 5 ó 6, que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, o de sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos:
- baclofeno y acamprosato y levodopa,
  - baclofeno y acamprosato y cinacalcet y levodopa,
  - baclofeno y acamprosato y torasemida y levodopa, o
  - baclofeno y acamprosato y mexiletina y levodopa.
- 30 8. La composición para uso de la reivindicación 7, que comprende además carbidopa o una sal del mismo o una formulación de liberación sostenida del mismo.
9. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 10. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los compuestos se formulan o administran conjuntamente, por separado o secuencialmente.
11. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha composición se administra repetidamente al sujeto.
12. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha composición se administra oralmente.
- 40 13. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el acamprosato se administra en una dosis inferior a 50 mg al día, más preferiblemente inferior a 10 mg al día.
14. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde se administra baclofeno en una dosis inferior a 30 mg al día.
- 45 15. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para uso en la protección de las neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal frente a la degeneración.
16. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para uso en el tratamiento de bradicinesia o de acinesia.
17. La composición para uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso en un tratamiento preventivo en un sujeto que lo necesite y que presente riesgo de Parkinsonismo.

**18.** Una composición que comprende baclofeno, acamprosato y levodopa, o cualesquier sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

**19.** La composición de la reivindicación 18, que además comprende carbidopa o una sal farmacéuticamente aceptable o una formulación de liberación sostenida del mismo.

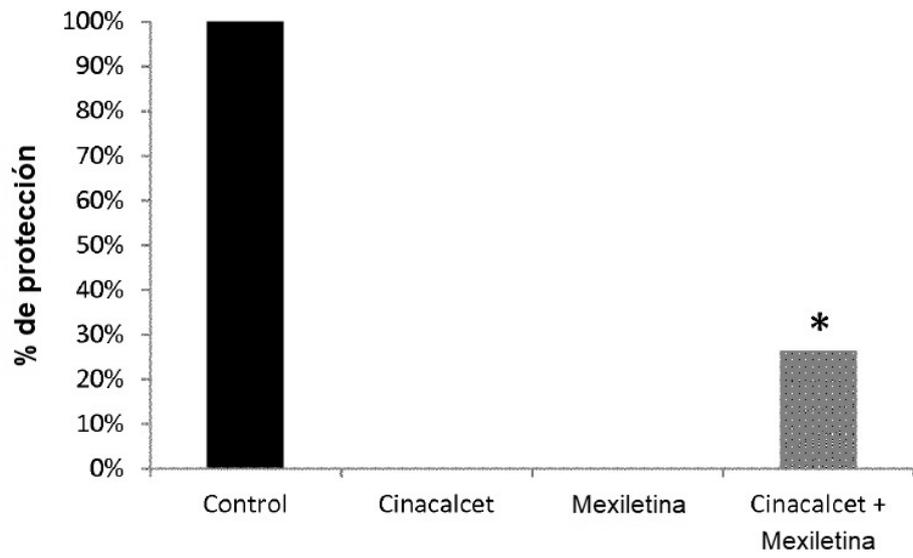


Figura 1

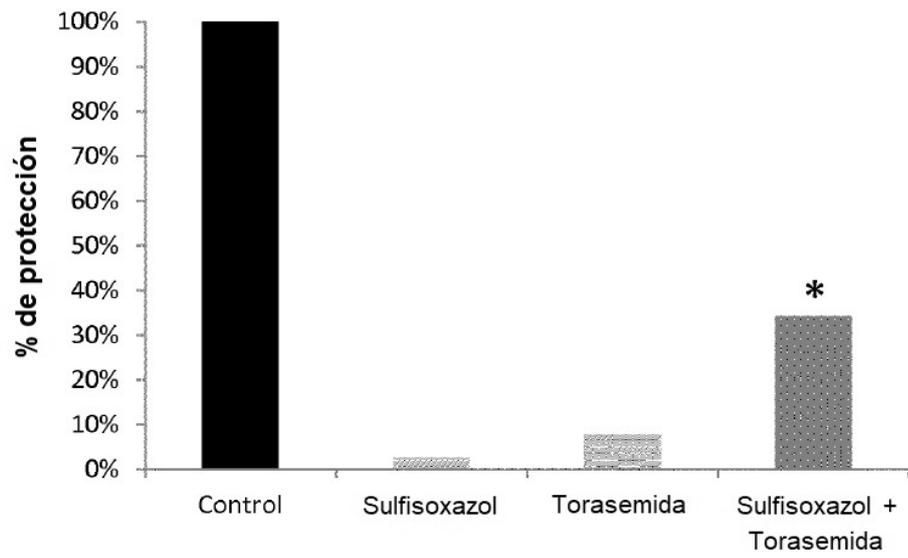


Figura 2

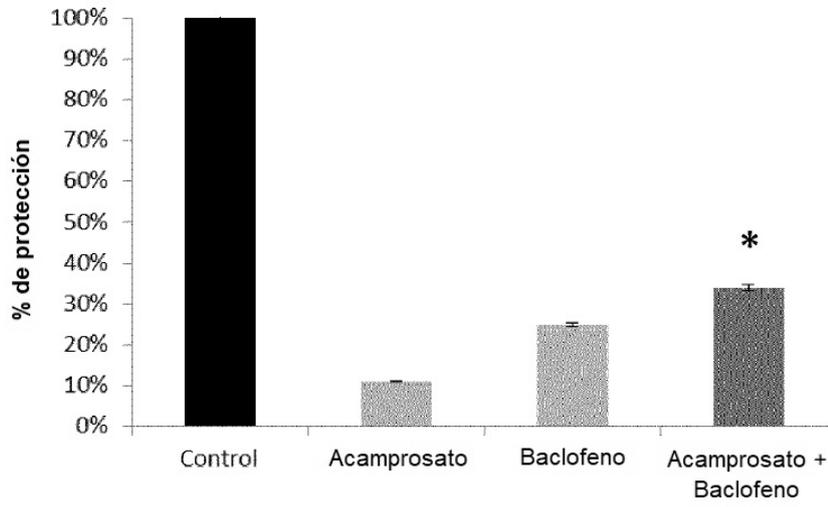


Figura 3

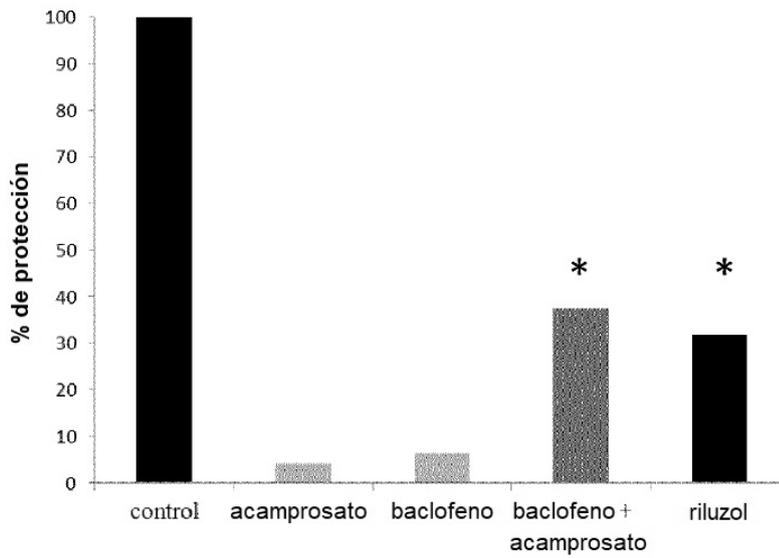


Figura 4

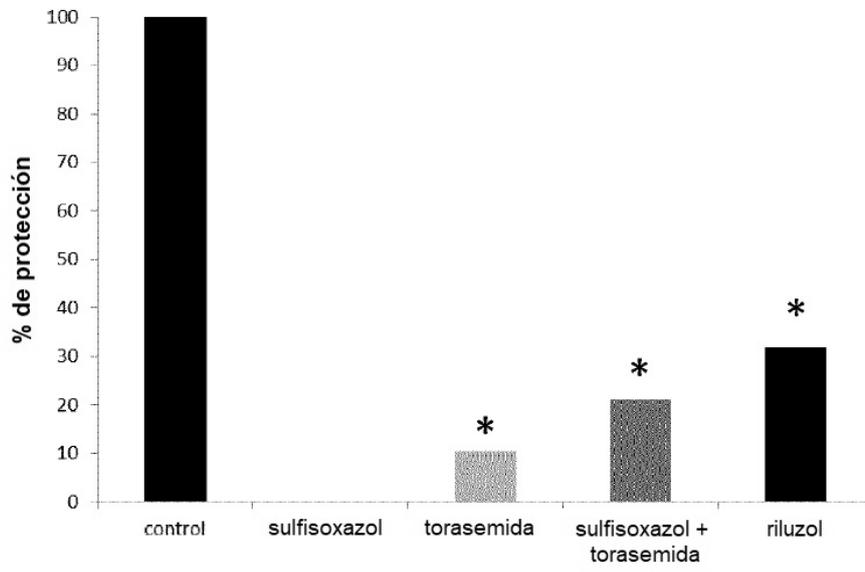


Figura 5

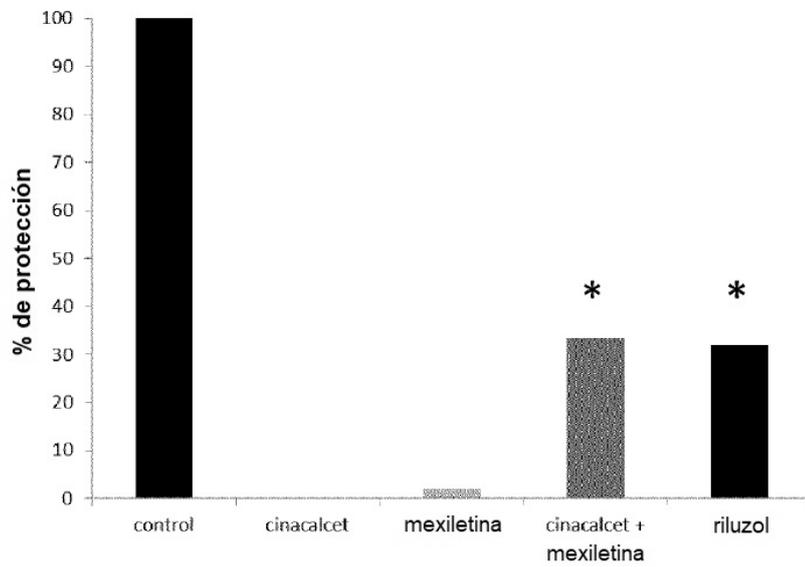


Figura 6

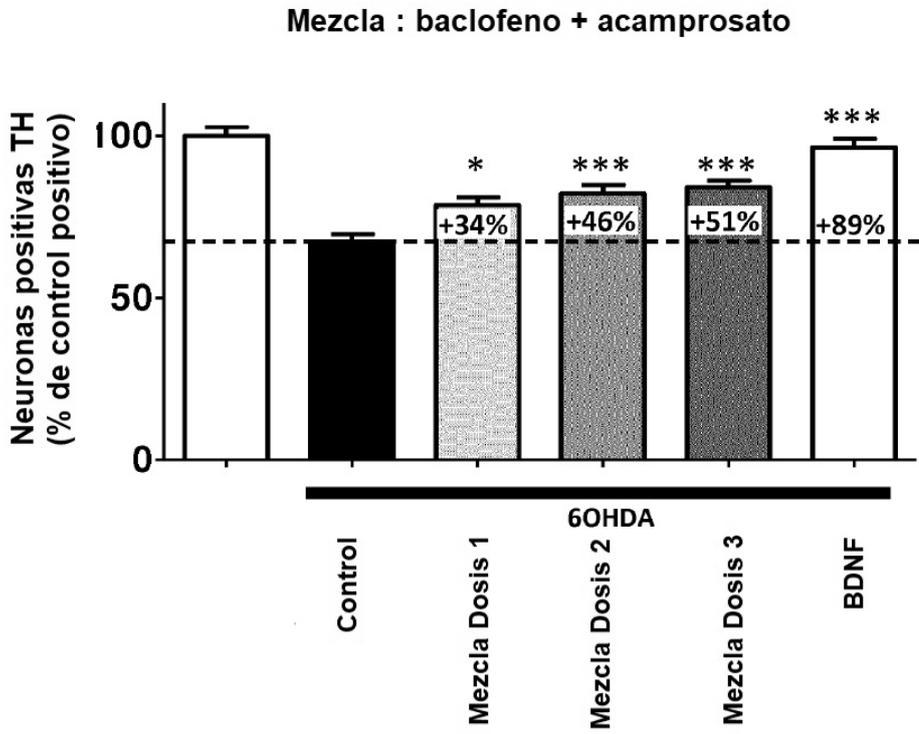


Figura 7

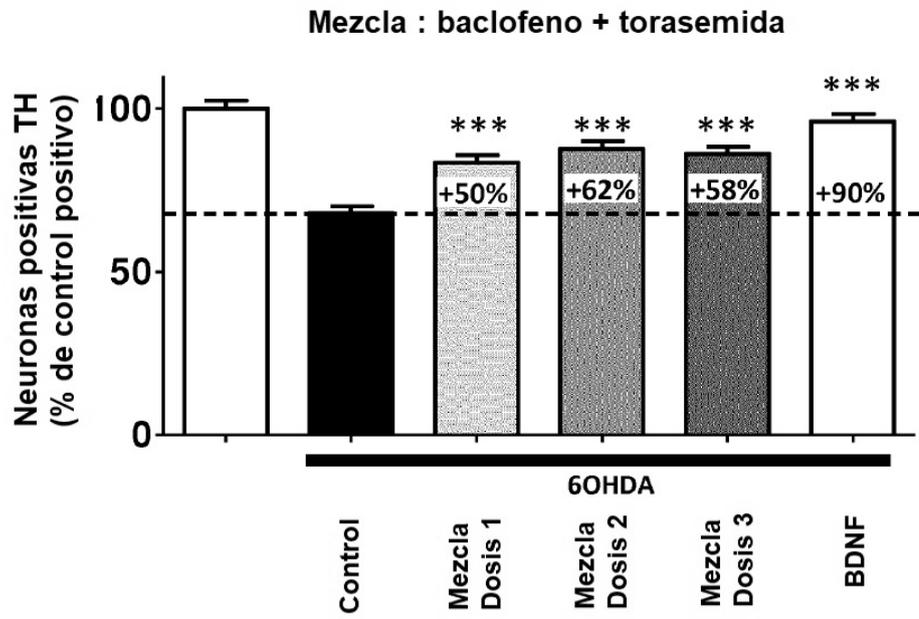


Figura 8

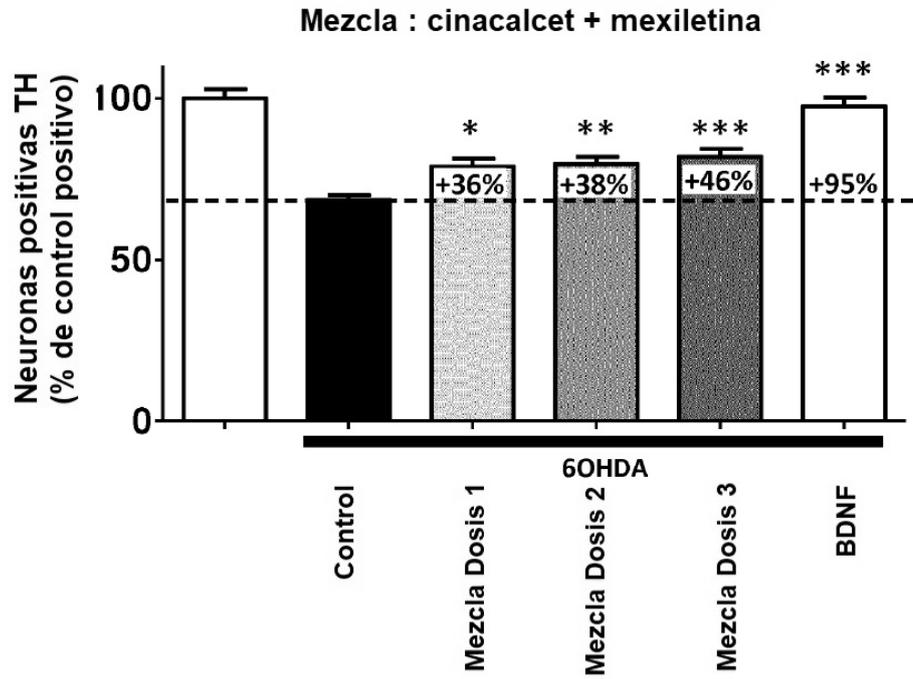


Figura 9

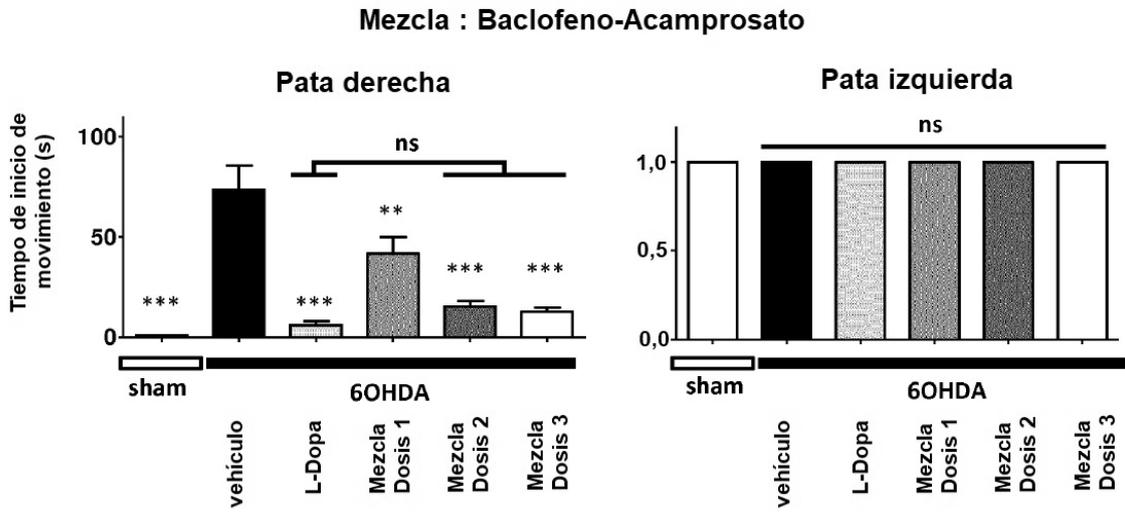


Figura 10

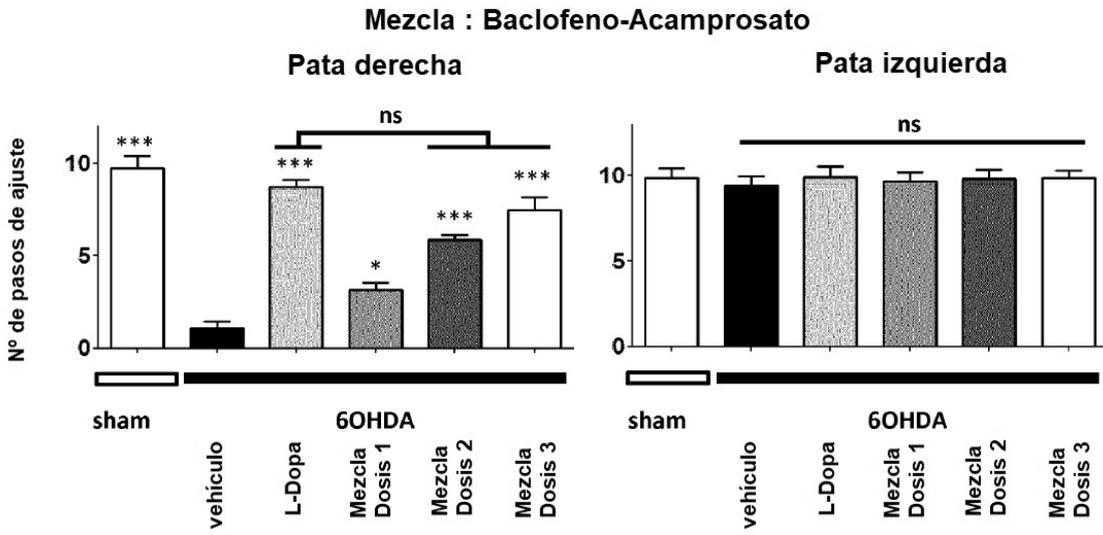


Figura 11