

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 490**

51 Int. Cl.:

A61K 31/138 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)
A61K 31/48 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61K 31/64 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2012 PCT/EP2012/053565**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12117073**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2012 E 12707741 (0)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2680836**

54 Título: **Nuevas composiciones para tratar trastornos neurológicos**

30 Prioridad:

01.03.2011 EP 11305217
29.03.2011 US 201161468658 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2018

73 Titular/es:

PHARNEXT (100.0%)
11, rue des Peupliers
92130 Issy-les-Moulineaux, FR

72 Inventor/es:

COHEN, DANIEL;
CHUMAKOV, ILYA;
NABIROCHKIN, SERGUEI;
VIAL, EMMANUEL y
GUEDJ, MICKAËL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 690 490 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 composiciones para tratar trastornos neurológicos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones para el uso en el tratamiento de enfermedades neurológicas y trastornos neurológicos. Más en particular, la invención se refiere a nuevas terapias combinadas para tales enfermedades, incluyendo la enfermedad de Alzheimer y enfermedades afines, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica y lesiones de la médula espinal.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia cortical prototípica caracterizada por un déficit de memoria junto con disfasia (trastorno del lenguaje en el que existe una deficiencia en el lenguaje y en la comprensión del lenguaje), dispraxia (discapacidad para coordinar y realizar ciertos movimientos y gestos intencionales en ausencia de deficiencias motoras o sensoriales) y agnosia (capacidad para reconocer objetos, personas, sonidos, formas u olores) atribuible a una implicación de las áreas de asociación corticales (1-4).

15 La EA es actualmente la causa más frecuente de demencia. Clínicamente, está caracterizada por un deterioro global de la función cognitiva, que se desarrolla lentamente y que deja a los pacientes en fase terminal postrados en la cama, incontinentes y dependientes de servicios de custodia. La muerte se produce, por término medio, 9 años después del diagnóstico (5).

20 La tasa de incidencia de la EA aumenta espectacularmente con la edad. Las proyecciones demográficas de las Naciones Unidas estiman que el número de personas mayores de 80 años se acercará a los 370 millones para el año 2050. Actualmente, se estima que el 50 % de las personas mayores de 85 años sufren de EA. Por lo tanto, más de 100 millones de personas en todo el mundo padecerán demencia en 50 años. La enorme cantidad de personas que requerirán cuidados constantes y otros servicios afectará gravemente a los recursos médicos, monetarios y humanos (6). El deterioro de la memoria es la primera característica de la enfermedad y afecta a la memoria episódica (memoria para acontecimientos cotidianos). La memoria semántica (memoria para significado verbal y visual) se ve afectada más tarde en la enfermedad. La característica distintiva patológica de la EA incluye placas amiloides que contienen beta-amiloide (Abeta), ovillos neurofibrilares (ONF) que contienen Tau y disfunción y pérdida neuronal y sináptica (7-9). En la última década se han propuesto dos hipótesis principales sobre la causa de la EA: la "hipótesis de la cascada amiloide", que expone que el proceso neurodegenerativo es una serie de acontecimientos desencadenados por el procesamiento anormal de la proteína precursora amiloidea (APP, por sus siglas en inglés) (10), y la "hipótesis de la degeneración citoesquelética neuronal" (11), que propone que los cambios citoesqueléticos son los acontecimientos desencadenantes. La teoría más ampliamente aceptada que explica la evolución de la EA sigue siendo la hipótesis de la cascada amiloide (12-14) y los investigadores de la EA se han centrado principalmente en determinar los mecanismos subyacentes a la toxicidad asociada con las proteínas Abeta. La remodelación y la permeabilidad microvascular, la angiogénesis aberrante y la rotura de la barrera hematoencefálica han sido identificadas como acontecimientos clave que contribuyen a la toxicidad de la APP en la cascada amiloide (15). En cambio, la proteína Tau ha recibido mucha menos atención de la industria farmacéutica que el amiloide, por intereses tanto fundamentales como prácticos. Además, el cambio en la densidad sináptica es la lesión patológica que mejor correlación tiene con el deterioro cognitivo en relación con las otras dos.

40 Algunos estudios han revelado que la patología amiloide parece desarrollarse en una manera específica de los neurotransmisores, en la que los terminales colinérgicos parecen ser los más vulnerables, seguidos de los terminales glutamatérgicos y finalmente de los terminales GABAérgicos (9). El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el sistema nervioso de los mamíferos. En condiciones patológicas, su acumulación anormal en la hendidura sináptica lleva a una sobreactivación de los receptores de glutamato (16). La acumulación anormal de glutamato en la hendidura sináptica lleva a la sobreactivación de receptores de glutamato, que tiene como resultado procesos patológicos y finalmente la muerte de la célula neuronal. Este proceso, denominado excitotoxicidad, se observa frecuentemente en tejidos neuronales durante trastornos neurológicos agudos y crónicos.

50 Se está haciendo evidente que la excitotoxicidad está implicada en la patogénesis de múltiples trastornos de diversa etiología tales como: lesiones de la médula espinal, ataques fulminantes, traumatismos craneoencefálicos, pérdida auditiva, alcoholismo y abstinencia alcohólica, neuropatía alcohólica, o dolor neuropático, así como enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington (17-19). El desarrollo de un tratamiento eficaz para estas enfermedades sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública, debido a su incidencia y a la falta de tratamientos curativos.

55 Se han ensayado antagonistas de NMDAR guiados a diversos sitios de este receptor para contrarrestar la excitotoxicidad. Los antagonistas de NMDAR no competitivos están guiados al poro del canal iónico, reduciendo así la entrada de calcio en neuronas postsinápticas. Algunos de ellos han alcanzado el estado de aprobación. Como

ejemplo, la memantina está actualmente aprobada en la enfermedad de Alzheimer moderada a grave. Se ha sometido a ensayos clínicos en otras indicaciones que incluyen un componente de excitotoxicidad tales como la dependencia del alcohol (fase II), la esclerosis lateral amiotrófica (fase III), la demencia asociada a Parkinson (fase II), la epilepsia, la enfermedad de Huntington (fase IV), la esclerosis múltiple (fase IV), la enfermedad de Parkinson (fase IV) y el traumatismo craneoencefálico (fase IV). Sin embargo, los beneficios de esta molécula son limitados para la mayoría de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, porque tiene efectos sintomáticos sólo moderados. Otra estrategia para limitar la excitotoxicidad consiste en inhibir la liberación presináptica de glutamato. El riluzol, actualmente aprobado en la esclerosis lateral amiotrófica, mostró resultados alentadores en modelos de isquemia y traumatismo craneoencefálico (20-23). En la actualidad se está ensayando en experimentos de fase II en esclerosis múltiple temprana, enfermedad de Parkinson (no muestra mejores resultados que el placebo) y lesiones de la médula espinal. En 1995, el fármaco alcanzó el estado de fármaco huérfano para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica y en 1996 para el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

Los documentos WO2009/133128, WO2009/133141, WO2009/133142 y WO2011/054759 describen moléculas que pueden utilizarse en composiciones para tratar trastornos neurológicos.

El documento 2010/085352 informa sobre el uso de análogos de los diuréticos con acción sobre el asa de Henle, incluyendo análogos de torasemida, para el tratamiento y/o la profilaxis de, entre otras cosas, la enfermedad de Alzheimer. El documento WO2008/046014 expone que los fármacos de sulfonilurea tales como la tolbutamida son útiles para tratar demencias tales como la enfermedad de Alzheimer. Estas sustancias son antagonistas del canal NCCa-ATP. El documento US2006/276411 se refiere al uso de tolbutamida para el tratamiento de lesiones de la médula espinal, lesiones cerebrales, ataques fulminantes, etc. Zao et al., 2009 (Journal of Alzheimer's Disease, 16(1):49-57) describen que es sabido que algunos fármacos antihipertensivos mejoran la enfermedad de Alzheimer.

A pesar de la investigación activa en esta área, sigue existiendo una necesidad de terapias eficaces alternativas o mejoradas para trastornos neurológicos, y en particular trastornos neurológicos relacionados con la toxicidad del glutamato y/o del beta-amiloide. La presente invención proporciona nuevos tratamientos para tales enfermedades neurológicas del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP).

Compendio de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar nuevas estrategias terapéuticas para tratar trastornos neurológicos.

La invención es el resultado, entre otras cosas, del descubrimiento inesperado por parte de los inventores de que la torasemida, sola o en combinaciones, representa nuevas terapias eficaces para el tratamiento de trastornos neurológicos.

El objetivo de esta invención se refiere a una composición y sus usos como se define en las reivindicaciones.

Más específicamente, la invención proporciona composiciones que comprenden torasemida y su uso para tratar trastornos neurológicos seleccionados entre EA y trastornos afines, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y lesiones de la médula espinal. Los trastornos afines a la EA incluyen demencia senil de tipo EA (DSTA), demencia con cuerpos de Lewis, demencia vascular, deterioro cognitivo leve (DCL) y deterioro de la memoria asociado a la edad (DMAE).

Más en particular, la invención se refiere a una composición, para el uso en el tratamiento del trastorno neurológico antes indicado, que comprende al menos torasemida, o una sal o una formulación de liberación sostenida de la misma.

Otro objetivo de la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un primer compuesto que es torasemida, o una sal o una formulación de liberación sostenida de la misma, en combinación con al menos un segundo compuesto seleccionado entre sulfisoxazol, metimazol, prilocaína, difilina, quinacrina, carbenoxolona, acamprosato, ácido aminocaproico, baclofeno, cabergolina, dietilcarbamazina, cinacalcet, cinarizina, eplerenona, fenoldopam, leflunomida, sulodexida, terbinafina, zonisamida, etomidato, fenformina, trimetazidina, mexiletina, bromocriptina, ifenprodil y moxifloxacina, sales, o una formulación de liberación sostenida de los mismos, para la administración simultánea, separada o secuencial.

Otro objetivo de la presente invención se refiere a una composición para el uso en el tratamiento del trastorno neurológico antes indicado, que comprende al menos un primer compuesto que es torasemida, o una sal o una formulación de liberación sostenida de la misma, en combinación con al menos un segundo compuesto seleccionado entre sulfisoxazol, metimazol, prilocaína, difilina, quinacrina, carbenoxolona, acamprosato, ácido aminocaproico, baclofeno, cabergolina, dietilcarbamazina, cinacalcet, cinarizina, eplerenona, fenoldopam, leflunomida, levosimendán, sulodexida, terbinafina, zonisamida, etomidato, fenformina, trimetazidina, mexiletina, bromocriptina, ifenprodil y moxifloxacina, sales, o una formulación de liberación sostenida de los mismos, para la administración simultánea, separada o secuencial.

También se describe en la presente memoria una composición que comprende al menos un primer compuesto seleccionado del grupo que consiste en torasemida, trimetazidina, mexiletina, ifenprodil, moxifloxacina y

5 bromocriptina, una o varias sales, o una o varias formulaciones de liberación sostenida de los mismos, en combinación con al menos un segundo compuesto, distinto de dicho primer compuesto, seleccionado entre sulfisoxazol, metimazol, prilocaína, difilina, quinacrina, carbenoxolona, acamproso, ácido aminocaproico, baclofeno, cabergolina, dietilcarbamazina, cinacalcet, cinarizina, eplerenona, fenoldopam, leflunomida, levosimendán, sulodexida, terbinafina, zonisamida, etomidato, fenformina, trimetazidina, mexiletina, bromocriptina, ifenprodil, torasemida, y moxifloxacina, una o varias sales, o una o varias formulaciones de liberación sostenida de los mismos, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para la administración simultánea, separada o secuencial.

10 Las composiciones de fármacos más preferidas comprenden 1, 2, 3, 4 o 5 fármacos distintos, aún más preferiblemente 2, 3 o 4. Además, las composiciones de fármacos antes indicadas pueden utilizarse también en una combinación ulterior con uno o varios fármacos o tratamientos adicionales beneficiosos para individuos con un trastorno neurológico.

También se describe en la presente memoria un método para tratar un trastorno neurológico, comprendiendo el método administrar a un individuo que lo necesite un fármaco o una composición según se ha descrito anteriormente.

15 También se describe en la presente memoria un método para tratar un trastorno neurológico, comprendiendo el método administrar simultáneamente, separadamente o secuencialmente a un individuo que lo necesite una combinación de fármacos según se ha descrito anteriormente.

20 También se describe en la presente memoria el uso de al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en torasemida, trimetazidina, mexiletina, ifenprodil, bromocriptina y moxifloxacina, o una o varias sales, o uno o varios profármacos, uno o varios derivados de cualquier pureza química, o una o varias formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para la producción de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurológico.

La invención puede utilizarse en cualquier individuo mamífero, en particular un individuo humano, en cualquier fase de la enfermedad.

Breve descripción de las figuras

25 Para todas las figuras, *: $p < 0,05$: considerablemente diferente del control (sin intoxicación); "ns": sin efecto significativo (ensayo ANOVA + Dunnett's Post-Hoc)

30 Figura 1: Efecto de pretratamiento con fármacos seleccionados contra lesiones por $A\beta_{1-42}$ humano en HBMEC. A) Validación del modelo experimental utilizado para rastreo de fármacos: 1 h de pretratamiento con VEGF 10 nM protegió de forma significativa la red capilar contra esta lesión amiloide (+70 % de red capilar en comparación con la intoxicación amiloide). La intoxicación se previene de forma significativa mediante torasemida (B) y bromocriptina (C) en dosis de tan sólo 400 nM y 3,2 pM respectivamente, mientras que para las dosis superiores e inferiores no se ha observado ningún efecto o se ha observado un efecto menor. \diamond : $p < 0,05$: considerablemente diferente de la intoxicación por amiloide.

35 Figura 2: Efecto de pretratamiento con fármacos seleccionados en liberación de LDH en ensayos de toxicidad del $A\beta_{1-42}$ en células corticales primarias de rata. A) Validación del modelo experimental utilizado para rastreo de fármacos: 1 h de pretratamiento con estradiol (150 ng/ml) protegió de forma significativa las neuronas contra esta lesión amiloide (-70 %), lo que se considera como un control positivo para la neuroprotección. Para todos los experimentos, $A\beta_{1-42}$ produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. La intoxicación se previene de forma significativa mediante bromocriptina (40 nM, -29 %) (B), trimetazidina (40 nM, -94 %) (C), ifenprodil (600 nM, -94 %) (D), mexiletina (3,2 nM, -73 %) (E), moxifloxacina (20 nM, -63 %) (F). Hay que señalar que para otras concentraciones de fármaco no se ha observado ningún efecto o se ha observado un efecto menor para dosis superiores e inferiores. \diamond : $p < 0,05$: considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

45 Figura 3: Efecto de terapia combinada de baclofeno y torasemida en la longitud total de la red capilar en cultivos de HBMEC intoxicadas con beta-amiloide. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) produce una intoxicación significativa, por encima del 40 %, en comparación con las células tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de baclofeno y torasemida (A), mientras que, en esas concentraciones, el baclofeno (B) y la torasemida (C) solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$: considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

50 Figura 4: Efecto de terapia combinada de sulfisoxazol y torasemida en la longitud total de la red capilar en cultivos de HBMEC intoxicadas con beta-amiloide. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) produce una intoxicación significativa, por encima del 40 %, en comparación con las células tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de sulfisoxazol y torasemida (A), mientras que, en esas concentraciones, el sulfisoxazol (B) y la torasemida (C) solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$: considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

5
 10
 15
 20
 25
 30

Figura 5: Efecto de terapia combinada de eplerenona y torasemida en la longitud total de la red capilar en cultivos de HBMEC intoxicadas con beta-amiloide. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) produce una intoxicación significativa, por encima del 40 %, en comparación con las células tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de eplerenona y torasemida (A), mientras que, en esas concentraciones, la torasemida (B) y la eplerenona (C) solas no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 6: Efecto de terapia combinada de bromocriptina y sulfisoxazol en la longitud total de la red capilar en cultivos de HBMEC intoxicadas con beta-amiloide. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) produce una intoxicación significativa, por encima del 40 %, en comparación con las células tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de bromocriptina y sulfisoxazol (A), mientras que, en esas concentraciones, la bromocriptina (B) y el sulfisoxazol (C) solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 7: Efecto de terapia combinada de acamprosato e ifenprodil en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de acamprosato e ifenprodil (A), mientras que, en esas concentraciones, el acamprosato (B) y el ifenprodil (C) solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 8: Efecto de terapia combinada de baclofeno y mexiletina en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de baclofeno y mexiletina (A), mientras que, en esas concentraciones, el baclofeno (B) y la mexiletina (C) solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p = 0,051$, diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 9: Efecto de terapia combinada de baclofeno y trimetazidina en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de baclofeno y trimetazidina (A), mientras que, en esas concentraciones, el baclofeno (B) y la trimetazidina (C) solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 10: Efecto de terapia combinada de cinacalcet y mexiletina en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de cinacalcet y mexiletina (A), mientras que, en esas concentraciones, el cinacalcet (B) y la mexiletina (C) solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 11: Efecto de terapia combinada de cinarizina y trimetazidina en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de cinarizina y trimetazidina (A), mientras que, en esas concentraciones, la cinarizina (B) y la trimetazidina (C) solas no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 12: Efecto de terapia combinada de trimetazidina y zonisamida en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de trimetazidina y zonisamida (A), mientras que, en esas concentraciones, la trimetazidina (B) y la zonisamida (C) solas no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 13: Efecto de terapia combinada de terbinafina y torasemida en la longitud total de la red capilar en cultivos de HBMEC intoxicadas con beta-amiloide. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) produce una intoxicación significativa, por encima del 40 %, en comparación con las células tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de terbinafina y torasemida (A), mientras que, en esas concentraciones, la terbinafina (B) y la torasemida (C) solas no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 14: Efecto de terapia combinada de cinacalcet y mexiletina en la longitud total de la red capilar en cultivos de HBMEC intoxicadas con beta-amiloide. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μM) produce una intoxicación significativa, por encima del 40 %, en comparación con las células tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de cinacalcet y mexiletina (A), mientras que, en esas concentraciones, el cinacalcet (B) y la mexiletina (C) solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 15: Efecto de terapia combinada de baclofeno y torasemida en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μM) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de baclofeno y torasemida, mientras que, en esas concentraciones, el baclofeno y la torasemida solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 16: Efecto de terapia combinada de torasemida y sulfisoxazol en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μM) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de sulfisoxazol y torasemida (A), mientras que, en esas concentraciones, la torasemida (B) y el sulfisoxazol (C) solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 17: Efecto de terapia combinada de moxifloxacina y trimetazidina en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μM) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de moxifloxacina y trimetazidina (A). La adición de moxifloxacina permite un aumento del 100 % del efecto observado para la trimetazidina (C) sola, mientras que, en la misma concentración, la moxifloxacina (B) sola no tiene ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 18: Efecto de terapia combinada de moxifloxacina y baclofeno en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μM) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de moxifloxacina y baclofeno (A), mientras que, en esas concentraciones, la moxifloxacina (B) y el baclofeno (C) solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 19: Efecto de terapia combinada de moxifloxacina y cinacalcet en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μM) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de moxifloxacina y cinacalcet (A), mientras que, en esas concentraciones, la moxifloxacina (B) y el cinacalcet (C) solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 20: Efecto de terapia combinada de moxifloxacina y zonisamida en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μM) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de moxifloxacina y zonisamida (A). La adición de moxifloxacina permite un aumento del 81 % del efecto observado para la zonisamida (C) sola, mientras que, en la misma concentración, la moxifloxacina (B) sola no tiene ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 21: Efecto de terapia combinada de moxifloxacina y sulfisoxazol en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μM) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de moxifloxacina y sulfisoxazol (A), mientras que, en esas concentraciones, la moxifloxacina (B) y el sulfisoxazol (C) solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 22: Efecto de terapia combinada de mexiletina (MEX) e ifenprodil (IFN) en la liberación de LDH en toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El péptido amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μM) produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de mexiletina 25,6 pM e ifenprodil 24 nM, mientras que, en esas concentraciones, la mexiletina y el ifenprodil solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,0572$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 23: Efecto de terapia combinada de baclofeno (BCL) y torasemida (TOR) en la longitud total de la red de neuritas en neuronas corticales intoxicadas con beta-amiloide. El péptido amiloide humano ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) produce una intoxicación significativa, por encima del 15 %, en comparación con las células tratadas con vehículo. Esta intoxicación se previene de forma significativa mediante la combinación de acamprosato y baclofeno; además, esta combinación permite un aumento del crecimiento de las neuritas. \diamond : $p < 0,05$, considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 24: Efecto de terapia combinada de cinacalcet y mexiletina contra la toxicidad del glutamato en células corticales neuronales. La intoxicación por glutamato se previene de forma significativa mediante la combinación de cinacalcet (64 pM) y mexiletina (25,6 pM), mientras que, en esas concentraciones, el cinacalcet y la mexiletina solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,001$, considerablemente diferente de la intoxicación por glutamato; (ensayo ANOVA + Dunnett Post-Hoc).

Figura 25: Efecto de terapia combinada de sulfisoxazol y torasemida contra la toxicidad del glutamato en células corticales neuronales. La intoxicación por glutamato se previene de forma significativa mediante la combinación de sulfisoxazol (6,8 nM) y torasemida (400 nM), mientras que, en esas concentraciones, el sulfisoxazol y la torasemida solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación. \diamond : $p < 0,001$, considerablemente diferente de la intoxicación por glutamato; (ensayo ANOVA + Dunnett Post-Hoc).

Figura 26: Efecto de pretratamiento con torasemida (TOR) en la liberación de LDH en ensayos de toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El $A\beta_{1-42}$ produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. La intoxicación se previene de forma significativa mediante torasemida (200 nM, -90 %) \diamond : $p < 0,0001$: considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Figura 27: Comparación de pretratamiento con acamprosato y su derivado homotaurina en la liberación de LDH en ensayos de toxicidad del $A\beta_{1-42}$ humano en células corticales primarias de rata. El $A\beta_{1-42}$ produce una intoxicación significativa en comparación con las neuronas tratadas con vehículo. La intoxicación se previene de forma igualmente significativa mediante homotaurina y acamprosato (99 %, 8 nM). \diamond : $p < 0,0001$: considerablemente diferente de la intoxicación por $A\beta_{1-42}$.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevas composiciones para tratar trastornos neurológicos. La invención describe un novedoso uso de fármacos o novedosas combinaciones de fármacos que permiten una corrección eficaz de tales enfermedades y que pueden utilizarse para el tratamiento de pacientes.

La invención es adecuada para tratar la enfermedad de Alzheimer y trastornos afines, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y lesiones de la médula espinal.

La invención es particularmente adecuada para tratar la EA y trastornos afines. En el contexto de esta invención, el concepto "trastorno afín a la EA" incluye demencia senil de tipo EA (DSTA), demencia con cuerpos de Lewis, demencia vascular, deterioro cognitivo leve (DCL) y deterioro de la memoria asociado a la edad (DMAE).

Tal como se utiliza en la presente memoria, "tratamiento" incluye la terapia, la prevención, la profilaxis, el retardo o la reducción de síntomas provocados o causados por las enfermedades o los trastornos antes indicados. El término "tratamiento" incluye en particular el control de la evolución de la enfermedad y de los síntomas asociados. El término "tratamiento" incluye en particular i) una protección contra la toxicidad causada por el beta-amiloide, o una reducción o un retardo de dicha toxicidad, y/o ii) una protección contra la excitotoxicidad del glutamato, o una reducción o un retardo de dicha toxicidad, en los individuos tratados. El término "tratamiento" designa también una mejora de los síntomas cognitivos o una protección de células neuronales.

Dentro del contexto de esta invención, cuando se nombran compuestos específicos se pretende incluir no sólo las moléculas específicamente nombradas, sino también cualesquiera sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

El término "profármaco" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualesquiera derivados (o precursores) funcionales de un compuesto de la presente invención, que, cuando se administran a un sistema biológico, generan dicho compuesto como resultado, por ejemplo, de una o varias reacciones químicas espontáneas, una o varias reacciones químicas catalizadas por enzimas, y/o una o varias reacciones químicas metabólicas. Los profármacos son normalmente inactivos o menos activos que el fármaco resultante y pueden utilizarse, por ejemplo, para mejorar las propiedades fisicoquímicas del fármaco, para guiar el fármaco a un tejido específico, para mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del fármaco y/o para reducir efectos secundarios no deseables. Algunos de los grupos funcionales comunes que son susceptibles de utilizarse en el diseño del profármaco incluyen, pero no están limitados a, grupos carboxílicos, hidroxilos, amina, fosfato/fosfonato y carbonilo. Los profármacos producidos típicamente a través de la modificación de estos grupos incluyen, pero no están limitados a, ésteres, carbonatos, carbamatos, amidas y fosfatos. Una guía técnica específica para la selección

de profármacos adecuados es un conocimiento común general (24-28). Además, la preparación de profármacos puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Se describen métodos que pueden utilizarse para sintetizar otros profármacos en numerosas reseñas sobre el tema (25; 29-35). Por ejemplo, Arbaclofen Placarbil figura en la base de datos ChemID plus Advance (<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) y Arbaclofen Placarbil es un profármaco muy conocido de baclofeno (36; 43).

El término “derivado” de un compuesto incluye cualquier molécula relacionada funcionalmente y/o estructuralmente con dicho compuesto, tal como un ácido, una amida, un éster, un éter, una variante acetilada, una variante hidroxilada o una variante alquilada (C1-C6) de tal compuesto. El término “derivado” incluye también un compuesto relacionado estructuralmente que haya perdido uno o más sustituyentes como se ha indicado anteriormente. 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, determinado mediante métodos conocidos. Pueden encontrarse compuestos similares junto con su índice de similitud con respecto a una molécula precursora en numerosas bases de datos, tales como PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) o DrugBank (<http://drugbank.ca/>). En una realización más preferida, los derivados deberían tener un índice de similitud de Tanimoto mayor de 0,4, preferiblemente mayor de 0,5, más preferiblemente mayor de 0,6, aún más preferiblemente mayor de 0,7, con respecto a una molécula precursora. El índice de similitud de Tanimoto es de uso generalizado para medir el grado de similitud estructural entre dos moléculas. El índice de similitud de Tanimoto puede calcularse mediante *software* tal como el Small Molecule Subgraph Detector (37-38) disponible en línea (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/SMSD/>). Los derivados preferidos deberían estar relacionados tanto estructuralmente como funcionalmente con un compuesto precursor, es decir que deberían conservar también al menos parte de la actividad del fármaco precursor, más preferiblemente deberían tener una actividad protectora contra la toxicidad del A β o del glutamato.

El término “derivados” incluye también metabolitos de un fármaco, por ejemplo una molécula que resulte de una o varias modificaciones (bioquímicas) o del procesamiento de dicho fármaco después de la administración a un organismo, normalmente a través de sistemas enzimáticos especializados, y que muestre o conserve una actividad biológica del fármaco. Se han descrito metabolitos responsables de gran parte de la acción terapéutica del fármaco precursor. En una realización específica, un “metabolito”, tal como se utiliza en la presente memoria, designa un fármaco modificado o procesado que conserva al menos parte de la actividad del fármaco precursor, preferiblemente que tiene una actividad protectora contra la toxicidad del A β o la toxicidad del glutamato. Entre los ejemplos de metabolitos se incluyen formas hidroxiladas de torasemida resultantes del metabolismo hepático del fármaco (base de datos Drug bank (39)).

El término “sal” se refiere a una sal de adición de ácido inorgánico u orgánico 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 iónicamente híbrida con un contraión para crear una versión de sal del fármaco. En la reacción de neutralización pueden utilizarse una amplia variedad de especies químicas. Así pues, las sales farmacéuticamente aceptables de la invención incluyen las obtenidas haciendo reaccionar el compuesto principal, funcionando como 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 canfor sulfónico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico o ácido cítrico. Las sales farmacéuticamente aceptables de la invención incluyen también aquellas en las que el compuesto principal funciona como un ácido y se hace reaccionar con una base apropiada para formar, por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio o colina. Aunque la mayoría de las sales de un determinado principio activo son bioequivalentes, algunas pueden tener, entre otras cosas, propiedades de solubilidad o biodisponibilidad aumentadas. La selección de la sal es actualmente una operación estándar frecuente en el proceso del desarrollo de fármacos, como exponen H. Stahl y C.G Wermuth en su manual (40).

El concepto “combinación” o “tratamiento combinado/terapia combinada” designa un tratamiento en el que se administran conjuntamente al menos dos o más fármacos a un individuo para causar un efecto biológico. En una terapia combinada según esta invención, los al menos dos fármacos pueden administrarse juntos o por separado, al mismo tiempo o secuencialmente. Además, los al menos dos fármacos pueden administrarse a través de diferentes vías y protocolos. Como resultado de ello, aunque pueden formularse juntos, los fármacos de una combinación pueden también formularse por separado.

Como se describe en los ejemplos, la torasemida, la trimetazidina, la mexiletina, el ifenprodil, la bromocriptina y la moxifloxacin tienen un fuerte efecto inesperado en procesos biológicos implicados en trastornos neurológicos. Además, estos compuestos también mostraron *in vivo* una capacidad muy eficaz para corregir síntomas de tales enfermedades. Estas moléculas, solas o en terapias combinadas, representan por lo tanto novedosas estrategias para tratar trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, neuropatías (por ejemplo dolor neuropático o neuropatía alcohólica), el alcoholismo o la abstinencia alcohólica y lesiones de la médula espinal. Las combinaciones de estos fármacos con otros compuestos seleccionados (véase la Tabla 2) son particularmente ventajosas, porque producen un efecto sinérgico sorprendente e inesperado en dosis en las que los fármacos solos

no tienen en esencia ningún efecto. Además, dada su eficacia, las combinaciones de fármacos descritas en la presente memoria pueden utilizarse en dosis bajas, lo que es una ventaja adicional muy importante.

5 También se describe en la presente memoria una composición para el uso en el tratamiento de la EA, trastornos afines a la EA, EM, EP, ELA, EH, neuropatías (por ejemplo dolor neuropático o neuropatía alcohólica), alcoholismo o abstinencia alcohólica o lesiones de la médula espinal, que comprende al menos torasemida, trimetazidina, mexiletina, ifenprodil, bromocriptina o moxifloxacina, o una sal o una formulación de liberación sostenida de los mismos.

10 En la Tabla 1 siguiente se indica el número CAS de cada uno de estos compuestos. La Tabla 1 menciona también, de forma no limitativa, sales, racematos, profármacos, metabolitos o derivados frecuentes de estos compuestos utilizados en las composiciones de la invención.

Tabla 1

Fármaco	Números CAS	Clase o índice de similitud de Tanimoto
Mexiletina y compuestos afines		
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 glucurónido	151636-18-9	Metabolito
Sulfisoxazol y compuestos afines		
Sulfisoxazol	127-69-5; 4299-60-9	
N(4)-acetilsulfisoxazol	4206-74-0	Metabolito
Sulfisoxazol acetilo	80-74-0	Profármaco
Sulfametoxazol	723-46-6	0,52
Cinacalcet y compuestos afines		
Cinacalcet	226256-56-0; 364782-34-3	
Ácido hidrocínámico	501-52-0	Metabolito
Torasemida y compuestos afines		
Torasemida	56211-40-6; 72810-59-4	
Hidroxitorasemida	99300-68-2; 99300-67-1	Metabolitos
Carboxitorasemida		Metabolito
Tolbutamida	64-77-7	0,55
Bromocriptina y compuestos afines		
Bromocriptina	25614-03-3; 22260-51-1	
Ifenprodil y compuestos afines		
Ifenprodil	23210-56-2; 23210-58-4	

15 Las moléculas anteriores pueden utilizarse solas o, preferiblemente, en terapias combinadas para proporcionar el beneficio clínico más eficaz. A este respecto, en la presente memoria se describe una composición para el uso en el tratamiento de un trastorno neurológico, preferiblemente EA, trastornos afines a la EA, EM, EP, ELA, EH, neuropatías (por ejemplo dolor neuropático o neuropatía alcohólica), alcoholismo o abstinencia alcohólica o lesiones

5 de la médula espinal, que comprende uno cualquiera de los compuestos anteriormente indicados en combinación con al menos un compuesto distinto seleccionado entre sulfisoxazol, metimazol, prilocaína, difilina, quinacrina, carbenoxolona, acamprosato, ácido aminocaproico, baclofeno, cabergolina, dietilcarbamazina, cinacalcet, cinarizina, eplerenona, fenoldopam, leflunomida, levosimendán, sulodexida, terbinafina, zonisamida, etomidato, fenformina, trimetazidina, mexiletina, ifenprodil, moxifloxacina, bromocriptina o torasemida, o una sal o una formulación de liberación sostenida de los mismos.

En la Tabla 2 siguiente se proporciona el número CAS específico para cada uno de estos compuestos distintos adicionales, diferentes de los de la Tabla 1:

Tabla 2

NOMBRE DEL FÁRMACO	NÚMERO CAS
Acamprosato	77337-76-9; 77337-73-6; 107-35-7; 3687-18-1
Ácido aminocaproico	60-32-2
Baclofeno	1134-47-0; 66514-99-6; 69308-37-8; 70206-22-3; 63701-56-4; 63701-55-3 ; 847353-30-4
Cabergolina	81409-90-7
Carbenoxolona	5697-56-3 o 7421-40-1
Cinarizina	298-57-7
Dietilcarbamazina	90-89-1 o 1642-54-2
Difilina	479-18-5
Eplerenona	107724-20-9
Etomidato	33125-97-2
Fenoldopam	67227-57-0 o 67227-56-9
Leflunomida	75706-12-6
Levosimendán	141505-33-1
Metimazol	60-56-0
Moxifloxacina	151096-09-2 o 186826-86-8 o 192927-63-2 o 354812-41-2
Fenformina	114-86-3 o 834-28-6
Prilocaína	721-50-6 o 14289-31-7 o 14289-32-8
Quinacrina	83-89-6 o 69-05-6 o 6151-30-0
Sulodexida	57821-29-1
Terbinafina	91161-71-6
Trimetazidina	5011-34-7 o 13171-25-0
Zonisamida	68291-97-4

10 En Hanafi et al., 2011 (41) se indican ejemplos específicos de profármacos de baclofeno, particularmente ésteres de baclofeno y carbamatos de ésteres de baclofeno que presentan un interés particular para la guía al SNC. Por lo tanto, tales profármacos son particularmente adecuados para composiciones de esta invención. El Baclofen placarbil, como se ha mencionado anteriormente, también es un profármaco muy conocido y puede así utilizarse en lugar de baclofeno en composiciones de la invención. Pueden encontrarse otros profármacos de baclofeno en las siguientes solicitudes de patente: WO2010102071, US2009197958, WO2009096985, WO2009061934, WO2008086492, US2009216037, WO2005066122, US2011021571, WO2003077902, WO2010120370.

15

Profármacos útiles para el acamprosato, tales como éster de ácido pantoico, ésteres neopentil sulfonílicos, profármacos de ésteres neopentil sulfonílicos o profármacos de acamprosato de éster neopentil sulfonílico de carboxilato enmascarado figuran en particular en los documentos WO2009033069, WO2009033061, WO2009033054, WO2009052191, WO2009033079, US 2009/0099253, US 2009/0069419, US 2009/0082464, US 2009/0082440 y US 2009/0076147.

En la presente memoria se describe también una composición que comprende:

- al menos un primer compuesto seleccionado entre una o varias sales de torasemida, trimetazidina, mexiletina, ifenprodil, bromocriptina y moxifloxacina, o una o varias formulaciones de liberación sostenida de los mismos, en combinación con

- al menos un segundo compuesto, distinto de dicho primer compuesto, seleccionado entre sulfisoxazol, metimazol, prilocaína, difilina, quinacrina, carbenoxolona, acamprosato, ácido aminocaproico, baclofeno, cabergolina, dietilcarbamazina, cinacalcet, cinarizina, eplerenona, fenoldopam, leflunomida, levosimendán, sulodexida, terbinafina, zonisamida, etomidato, fenformina, trimetazidina, mexiletina, bromocriptina, ifenprodil, torasemida, y moxifloxacina, una o varias sales o una o varias formulaciones de liberación sostenida de los mismos, para el uso en el tratamiento de un trastorno neurológico en un individuo que lo necesite.

En la presente memoria se describe también el uso de estos fármacos o composiciones para tratar la EA o un trastorno afín en un individuo que lo necesite.

En la presente memoria se describe también el uso de estos fármacos o composiciones para tratar la EM, la EP, la ELA, la EH, neuropatías (por ejemplo dolor neuropático o neuropatía alcohólica), el alcoholismo o la abstinencia alcohólica o lesiones de la médula espinal en un individuo que lo necesite.

Como se describe en los ejemplos, las terapias de composición que utilizan uno o más de los fármacos anteriormente mencionados llevan a una corrección eficaz de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurológicas. Como está ilustrado en la sección experimental, las composiciones que comprenden al menos torasemida, trimetazidina, mexiletina, ifenprodil, bromocriptina y moxifloxacina proporcionan un importante efecto terapéutico y biológico para prevenir los efectos tóxicos de la proteína o el péptido amiloide β ($A\beta$) en células humanas. Además, *in vivo*, estas composiciones llevan a una mejora de los síntomas cognitivos, así como a una inhibición de las rutas moleculares disparadas por una intoxicación por $A\beta$, incluyendo la excitotoxicidad del glutamato. Por lo tanto, representan novedosos y potentes métodos para tratar tal enfermedad. La sección experimental muestra además que las composiciones anteriormente mencionadas son también eficaces i) a la hora de proteger de manera sinérgica *in vitro* células neuronales contra la toxicidad del glutamato, y ii) a la hora de conferir beneficios clínicos en modelos *in vivo* para enfermedades relacionadas con la excitotoxicidad del glutamato.

Más preferiblemente, las composiciones de fármacos de la invención pueden comprender 1, 2, 3, 4 o 5 fármacos distintos, aún más preferiblemente 2, 3 o 4 fármacos distintos, para un tratamiento combinado de la enfermedad de Alzheimer (EA), trastornos afines a la EA, ELA o lesiones de la médula espinal en un individuo que lo necesite. En una realización preferida, los fármacos de la invención se utilizan en una o varias combinaciones para la administración combinada, separada o secuencial, con el fin de proporcionar el efecto más eficaz.

En una realización concreta, la composición comprende (i) torasemida y (ii) un compuesto seleccionado entre bromocriptina, baclofeno, sulfisoxazol, eplerenona o terbinafina, o una sal o una formulación de liberación sostenida de dichos compuestos (i) y (ii).

En la presente memoria se describe también una composición que comprende (i) trimetazidina y (ii) un compuesto seleccionado entre baclofeno, cinarizina, zonisamida o moxifloxacina, o una sal o una formulación de liberación sostenida de dichos compuestos (i) y (ii).

En la presente memoria se describe también una composición que comprende (i) moxifloxacina y (ii) un compuesto seleccionado entre baclofeno, cinacalcet, zonisamida, sulfisoxazol o trimetazidina, o una sal o una formulación de liberación sostenida de dichos compuestos (i) y (ii).

En la presente memoria se describe también una composición que comprende (i) mexiletina y (ii) un compuesto seleccionado entre baclofeno, cinacalcet, ifenprodil o levosimendán, o una sal o una formulación de liberación sostenida de dichos compuestos (i) y (ii).

En la presente memoria se describe también una composición que comprende (i) ifenprodil y (ii) un compuesto seleccionado entre acamprosato, levosimendán o mexiletina, o una sal o una formulación de liberación sostenida de dichos compuestos (i) y (ii).

En la presente memoria se describen también composiciones para el uso en el tratamiento de un trastorno neurológico tal como la enfermedad de Alzheimer (EA), trastornos afines a la EA, EM, EP, ELA, EH, neuropatías (por ejemplo dolor neuropático o neuropatía alcohólica), alcoholismo o abstinencia alcohólica o lesiones de la

médula espinal, que comprende una de las siguientes combinaciones de fármacos, para una administración combinada, separada o secuencial:

- baclofeno y torasemida,
- eplerenona y torasemida,
- 5 - acamprosato e ifenprodil,
- baclofeno y mexiletina,
- baclofeno y trimetazidina,
- bromocriptina y sulfisoxazol,
- cinacalcet y mexiletina,
- 10 - cinarizina y trimetazidina,
- sulfisoxazol y torasemida,
- trimetazidina y zonisamida,
- levosimendán y mexiletina
- levosimendán e ifenprodil,
- 15 - levosimendán y trimetazidina,
- levosimendán y moxifloxacina,
- terbinafina y torasemida,
- moxifloxacina y trimetazidina,
- moxifloxacina y baclofeno,
- 20 - moxifloxacina y cinacalcet,
- moxifloxacina y zonisamida,
- moxifloxacina y sulfisoxazol,
- mexiletina e ifenprodil,
- baclofeno y trimetazidina y torasemida,
- 25 - baclofeno y cinacalcet y torasemida,
- baclofeno y acamprosato y torasemida,
- levosimendán y baclofeno y trimetazidina,
- levosimendán y ácido aminocaproico y trimetazidina,
- levosimendán y terbinafina y trimetazidina, o
- 30 - levosimendán y sulfisoxazol y trimetazidina.

Los ejemplos de composiciones preferidas según la invención comprenden al menos una de las siguientes combinaciones de compuestos, para una administración combinada, separada o secuencial:

- baclofeno y torasemida,
- sulfisoxazol y torasemida,
- 35 - eplerenona y torasemida,
- terbinafina y torasemida,
- baclofeno y trimetazidina y torasemida,

- baclofeno y cinacalcet y torasemida,
- baclofeno y acamprosato y torasemida,
- sulfisoxazol y trimetazidina y torasemida y zonisamida,
- sulfisoxazol y mexiletina y torasemida y cinacalcet,

- 5 - baclofeno y acamprosato y torasemida y dietilcarbamazina, o
 - baclofeno y acamprosato y torasemida e ifenprodil.

10 Como se describe en la sección experimental, las terapias combinadas de la invención antes mencionadas inducen un fuerte efecto neuroprotector contra la toxicidad del A β y proporcionan resultados positivos en rendimientos conductuales y ensayos bioquímicos *in vivo*. Los resultados muestran que las composiciones de la invención i) corrigen eficazmente rutas moleculares disparadas, *in vivo*, por agregados de A β y ii) llevan a una mejora de deficiencias neurofisiológicas observadas en animales enfermos como una supervivencia de las neuronas o una integridad sináptica.

15 Además, los resultados presentados muestran también que las terapias combinadas anteriores tienen un importante efecto sinérgico neuroprotector contra la excitotoxicidad del glutamato (figuras 24 y 25, tabla 8), una ruta que está implicada en diversas enfermedades neurológicas como la EA, la EM, la EP, la ELA, la EH, neuropatías (por ejemplo dolor neuropático o neuropatía alcohólica), alcoholismo o abstinencia alcohólica o lesiones de la médula espinal. Estas terapias proporcionan resultados positivos en modelos *in vivo* e *in vitro* para estas enfermedades.

Además, los resultados *in vivo* muestran también que las composiciones de la invención restituyen eficazmente la integridad de la barrera hematoencefálica, que se sabe que se ve afectada en diversas enfermedades neurológicas.

20 En la presente memoria se describe también una composición como se ha definido anteriormente para tratar un trastorno neurológico tal como la enfermedad de Alzheimer (EA), trastornos afines a la EA, EM, EP, ELA, EH, neuropatías (por ejemplo dolor neuropático o neuropatía alcohólica), alcoholismo o abstinencia alcohólica o lesiones de la médula espinal.

25 En la presente memoria se describe también el uso de una composición como se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno neurológico tal como la enfermedad de Alzheimer (EA), trastornos afines a la EA, EM, EP, ELA, EH, neuropatías (por ejemplo dolor neuropático o neuropatía alcohólica), alcoholismo o abstinencia alcohólica o lesiones de la médula espinal.

30 En la presente memoria se describe también un método para tratar un trastorno neurológico tal como la enfermedad de Alzheimer (EA), trastornos afines a la EA, EM, EP, ELA, EH, neuropatías (por ejemplo dolor neuropático o neuropatía alcohólica), alcoholismo o abstinencia alcohólica o lesiones de la médula espinal, que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de una composición como se ha descrito anteriormente.

35 Como se ha indicado previamente, los compuestos en un tratamiento combinado o una composición de la presente invención pueden formularse juntos o por separado, y administrarse juntos, por separado o secuencialmente y/o repetidamente.

A este respecto, un objeto concreto de esta invención es una composición para el uso en un método para tratar la EA, un trastorno afín a la EA, ELA o lesiones de la médula espinal en un individuo, que comprende administrar simultáneamente, separadamente o secuencialmente a un individuo que necesite tal tratamiento una cantidad eficaz de una composición como se ha descrito anteriormente.

40 En una realización preferida, la invención se refiere a una composición para el uso en un método para tratar la enfermedad de Alzheimer (EA), un trastorno afín a la EA, ELA o lesiones de la médula espinal en un individuo que lo necesite, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de torasemida, o una sal o una o varias formulaciones de liberación sostenida de la misma, preferiblemente en una combinación como se ha descrito anteriormente.

45 En otra realización, esta invención se refiere a una composición para el uso en un método para tratar la enfermedad de Alzheimer (EA), un trastorno afín a la EA, ELA o lesiones de la médula espinal en un individuo que lo necesite, que comprende administrar simultáneamente, separadamente o secuencialmente al individuo al menos un primer compuesto seleccionado del grupo que consiste en torasemida, sales o cualquier formulación de la misma, en combinación con al menos un segundo compuesto seleccionado entre sulfisoxazol, metimazol, prilocaína, difilina, quinacrina, carbenoxolona, acamprosato, ácido aminocaproico, baclofeno, cabergolina, dietilcarbamazina, cinacalcet, cinarizina, eplerenona, fenoldopam, leflunomida, levosimendán, sulodexida, terbinafina, zonisamida, etomidato, fenformina, trimetazidina, mexiletina, bromocriptina, ifenprodil y moxifloxacina, sales o cualquier formulación de los mismos.

50

En otra realización más, la invención se refiere a una composición para el uso en un método para tratar la enfermedad de Alzheimer (EA), un trastorno afín a la EA, ELA o lesiones de la médula espinal, que comprende administrar a un individuo que lo necesite al menos un primer compuesto seleccionado del grupo que consiste en torasemida, sales o cualquier formulación de la misma, en combinación con al menos un segundo compuesto seleccionado entre sulfisoxazol, metimazol, prilocaína, difilina, quinacrina, carbenoxolona, acamprosato, ácido aminocaproico, baclofeno, cabergolina, dietilcarbamazina, cinacalcet, cinarizina, eplerenona, fenoldopam, leflunomida, levosimendán, sulodexida, terbinafina, zonisamida, etomidato, fenformina, trimetazidina, mexiletina, bromocriptina, ifenprodil y moxifloxacina, sales o cualquier formulación de los mismos.

Aunque son muy eficaces *in vitro* e *in vivo*, dependiendo del individuo o del estado específico, los métodos y las composiciones de la presente invención pueden utilizarse además junto con fármacos o tratamientos adicionales beneficiosos en relación con el estado neurológico tratado en los individuos. A este respecto, en una realización concreta, el o los fármacos o las composiciones según la presente invención pueden combinarse adicionalmente con extractos de *Ginkgo Biloba*. Entre los extractos adecuados se incluyen, sin limitación, extractos de *Ginkgo Biloba*, extractos de *Ginkgo Biloba* mejorados (por ejemplo enriquecidos en ingredientes activos o con un nivel reducido de contaminantes) o cualquier fármaco que contenga extractos de *Ginkgo Biloba*.

Los extractos de *Ginkgo Biloba* pueden utilizarse en una composición que comprenda al menos torasemida.

En realizaciones preferidas, los extractos de *Ginkgo Biloba* se utilizan en combinación con una cualquiera de las siguientes combinaciones de fármacos:

- baclofeno y torasemida

- eplerenona y torasemida

- sulfisoxazol y torasemida,

- terbinafina y torasemida,

- baclofeno y trimetazidina y torasemida,

- baclofeno y cinacalcet y torasemida,

- baclofeno y acamprosato y torasemida,

- sulfisoxazol y trimetazidina y torasemida y zonisamida,

- sulfisoxazol y mexiletina y torasemida y cinacalcet,

- baclofeno y acamprosato y torasemida y dietilcarbamazina,

- baclofeno y acamprosato y torasemida e ifenprodil

- .

Otras terapias utilizadas junto con uno o varios fármacos o una o varias combinaciones de fármacos según la presente invención pueden comprender uno o varios fármacos que mejoren los síntomas de la enfermedad de Alzheimer, de un trastorno afín a la EA, de la ELA o de lesiones de la médula espinal, o uno o varios fármacos que puedan utilizarse para un tratamiento paliativo de estos trastornos.

Por ejemplo, pueden utilizarse combinaciones de la invención junto con donepezilo (CAS: 120014-06-4), gabapentina (CAS: 478296-72-9; 60142-96-3), rivastigmina (123441-03-2) o memantina (CAS: 19982-08-2).

Otro objeto de esta invención es un método para preparar una composición farmacéutica, comprendiendo el método mezclar los compuestos antes indicados en un excipiente o vehículo apropiado.

La duración de la terapia depende de la fase de la enfermedad o trastorno que se esté tratando, de la combinación utilizada, de la edad y el estado del paciente y de cómo responda el paciente al tratamiento. La dosis, la frecuencia y el modo de administración de cada componente de la combinación pueden controlarse independientemente. Por ejemplo, un fármaco puede administrarse por vía oral, mientras que el segundo fármaco puede administrarse por vía intramuscular. La terapia combinada puede administrarse en ciclos intermitentes que incluyan periodos de descanso, de manera que el cuerpo del paciente tenga oportunidad de recuperarse de cualesquiera efectos secundarios aún imprevistos. Los fármacos pueden también formularse juntos, de tal manera que una administración proporcione todos los fármacos.

La administración de cada fármaco de la combinación puede realizarse mediante cualquier medio adecuado que tenga como resultado una concentración del fármaco que, combinada con el otro componente, pueda mejorar el estado del paciente o tratar eficazmente la enfermedad o el trastorno.

Aunque es posible administrar los ingredientes activos de la combinación como la sustancia química pura, es preferible presentarlos como una composición farmacéutica, también denominada en este contexto formulación farmacéutica. Entre las posibles composiciones se incluyen las adecuadas para la administración por vía oral, rectal, tópica (incluyendo transdérmica, bucal y sublingual) o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica).

Más frecuentemente, estas formulaciones farmacéuticas se prescriben al paciente en “paquetes de paciente” que contienen varias unidades de dosificación u otros medios para la administración de dosis unitarias fijas para el uso durante un periodo de tratamiento definido en un solo paquete, normalmente un envase blíster. En relación con las prescripciones tradicionales, en las que un farmacéutico divide el suministro para un paciente de un producto farmacéutico a partir de un suministro a granel, los paquetes de paciente tienen la ventaja de que el paciente tiene siempre acceso al prospecto contenido en el paquete de paciente, normalmente ausente en las prescripciones tradicionales. Se ha comprobado que la inclusión de un prospecto mejora la adaptabilidad del paciente a las instrucciones del médico. Así pues, la invención incluye además una formulación farmacéutica, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, en combinación con un material de envasado adecuado para dichas formulaciones. En tal paquete de paciente, el uso previsto de una formulación para el tratamiento combinado puede inferirse mediante instrucciones, recursos, previsiones, adaptaciones y/u otros medios que ayuden a utilizar la formulación del modo más adecuado para el tratamiento. Tales medidas hacen que un paquete de paciente sea específicamente adecuado y esté específicamente adaptado para el uso para el tratamiento con la combinación de la presente invención.

El fármaco puede estar contenido, en una cantidad apropiada, en cualquier sustancia de soporte adecuada (por ejemplo excipiente, vehículo, soporte), que puede representar el 1-99 % en peso del peso total de la composición. La composición puede estar prevista en una forma de dosificación que sea adecuada para una vía de administración oral, parenteral (por ejemplo intravenosa, intramuscular), rectal, cutánea, nasal, vaginal, mediante inhalación, sobre la piel (parche) u ocular. Así pues, la composición puede estar en forma de, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles incluyendo hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, emplastos, pociones, dispositivos de liberación osmótica, supositorios, enemas, inyectables, implantes, nebulizadores o aerosoles.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse según la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20ª ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y Encyclopedía 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 manera inmediata con la administración, o después de la administración en cualquier momento o periodo de tiempo predeterminado.

Las formulaciones de liberación controlada incluyen (i) formulaciones que crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado; (ii) formulaciones que, después de un periodo de retraso predeterminado, crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un periodo de tiempo prolongado; (iii) formulaciones que mantienen la acción del fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado manteniendo un nivel eficaz y relativamente constante del fármaco en el cuerpo con una minimización concomitante de efectos secundarios no deseables asociados a fluctuaciones en el nivel plasmático de la sustancia del fármaco activo; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco mediante, por ejemplo, colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente al tejido u órgano enfermo o en el mismo; y (v) formulaciones que guían la acción del fármaco utilizando vehículos o derivados químicos para suministrar el fármaco a un tipo concreto de célula diana.

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

Puede aplicarse cualquiera de varias estrategias con el fin de conseguir una liberación controlada en la que la velocidad de liberación sea mayor que la velocidad del metabolismo del fármaco en cuestión. Puede conseguirse una liberación controlada mediante una selección apropiada de diversos ingredientes y parámetros de formulación, incluyendo, por ejemplo, diversos tipos de revestimientos y composiciones de liberación controlada. Así pues, el fármaco se formula con excipientes apropiados para obtener una composición farmacéutica que, al administrarla, libere el fármaco de una manera controlada (composiciones de cápsula o comprimido unitario simple o múltiple, soluciones en aceite, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches y liposomas).

Formas sólidas de dosificación para el uso oral

Las formulaciones para el uso oral incluyen comprimidos que contengan el o los ingredientes activos en una mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluentes inertes o cargas (por ejemplo sacarosa, celulosa microcristalina, almidones incluyendo almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro de sodio, fosfato de calcio o fosfato de sodio); agentes de granulación y desintegración (por ejemplo derivados de la celulosa incluyendo celulosa microcristalina, almidones incluyendo almidón de patata, croscarmelosa sódica, alginatos o ácido algínico); aglutinantes (por ejemplo, goma arábiga, ácido algínico, alginato de sodio, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol); y agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo ácido esteárico, sílices o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, aromatizantes, plastificantes, humectantes, amortiguadores y similares.

Los comprimidos pueden no estar revestidos o pueden estar revestidos mediante técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal y de este modo proporcionar una acción mantenida durante un periodo más largo. El revestimiento puede estar adaptado para liberar la sustancia del fármaco activo en un patrón predeterminado (por ejemplo con el fin de lograr una formulación de liberación controlada) o puede estar adaptado para no liberar la sustancia del fármaco activo hasta haber pasado el estómago (revestimiento entérico). El revestimiento puede ser un revestimiento de azúcar, un revestimiento de película (por ejemplo basado en hidroxipropil metilcelulosa, metilcelulosa, metil hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona) o un revestimiento entérico (por ejemplo basado en un copolímero de ácido metacrílico, ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa, succinato de acetato de hidroxipropil metilcelulosa, ftalato de acetato de polivinilo, goma laca y/o etilcelulosa). Puede emplearse un material de retardo tal como, por ejemplo, monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones sólidas de comprimido pueden incluir un revestimiento adaptado para proteger la composición contra cambios químicos no deseados (por ejemplo degradación química antes de la liberación de la sustancia del fármaco activo). El revestimiento puede aplicarse sobre la forma sólida de dosificación de manera similar a como se describe en la Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

En el comprimido pueden estar mezclados entre sí diversos fármacos, o éstos pueden estar divididos. Por ejemplo, el primer fármaco está contenido en el interior del comprimido, y el segundo fármaco se halla en el exterior, de tal manera que se libere una parte considerable del segundo fármaco antes de la liberación del primer fármaco.

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

Las composiciones de liberación controlada para uso oral pueden, por ejemplo, elaborarse para que liberen el fármaco activo controlando la disolución y/o la difusión de la sustancia del fármaco activo.

La liberación controlada por disolución o difusión puede lograrse mediante un revestimiento apropiado de una formulación de comprimido, cápsula, pelet o granulado de fármacos, o incorporando el fármaco en una matriz apropiada. Un revestimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de revestimiento mencionadas anteriormente y/o, por ejemplo, goma laca, cera de abejas, glycowax, cera de ricino, cera de carnauba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido dl-polláctico, acetato butirato de celulosa, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, vinilpirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metilmetacrilato, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3 butilenglicol, metacrilato de etilenglicol y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de la matriz puede incluir también, por ejemplo, metilcelulosa hidratada, cera de carnauba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, metil acrilato-metil metacrilato, cloruro de polivinilo, polietileno y/o fluorocarburo halogenado.

Una composición de liberación controlada que contenga uno o más de los fármacos de las combinaciones reivindicadas puede presentarse también en forma de un comprimido o cápsula flotante (es decir un comprimido o una cápsula que, con la administración oral, flota encima del contenido gástrico durante un cierto periodo de tiempo). Una formulación de comprimido flotante del o de los fármacos puede prepararse granulando una mezcla del o de los fármacos con excipientes y un 20-75 % p/p de hidrocoloides, tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. Los gránulos obtenidos pueden entonces comprimirse para obtener comprimidos. Al contacto con el jugo gástrico, el comprimido forma una barrera de gel sustancialmente impermeable al agua alrededor de su superficie. Esta barrera de gel participa a la hora de mantener una densidad de menos de uno, permitiendo así al comprimido permanecer flotando en el jugo gástrico.

Líquidos para administración por vía oral

Los polvos, polvos dispersables o gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua son formas de dosificación convenientes para la administración por vía oral. La formulación en forma de suspensión prevé el ingrediente activo en una mezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más agentes de conservación. Como agentes de suspensión son adecuados, por ejemplo, la carboximetilcelulosa sódica, la metilcelulosa, el alginato de sodio y similares.

Composiciones parenterales

La composición farmacéutica puede administrarse también por vía parenteral mediante inyección, infusión o implantación (intravenosa, intramuscular, subcutánea o similares) en formas de dosificación, formulaciones, o a través de dispositivos de liberación adecuados o implantes que contengan vehículos y coadyuvantes convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables. La formulación y la preparación de tales composiciones son bien conocidas por los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica.

Las composiciones para el uso parenteral pueden estar previstas en formas de dosificación unitarias (por ejemplo en ampollas monodosis), o en frascos que contengan varias dosis y a los que puede añadirse un agente de conservación adecuado (véase posteriormente). La composición puede presentarse en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión o un dispositivo de liberación para la implantación o puede presentarse en forma de un polvo seco que haya de reconstituirse con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Aparte del o de los fármacos activos, la composición puede incluir vehículos y/o excipientes adecuados aceptables desde el punto de vista parenteral. El o los fármacos activos pueden estar incorporados en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas o similares para una liberación controlada. La composición puede incluir agentes de suspensión, solubilización, estabilización, ajuste del pH y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden presentarse en la forma adecuada para una inyección estéril. Para preparar tal composición, el o los fármacos activos adecuados se disuelven o suspenden en un vehículo líquido aceptable desde el punto de vista parenteral. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se incluyen agua, agua ajustada a un pH adecuado mediante adición de una cantidad apropiada de ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o un tampón adecuado, 1,3-butanodiol, solución Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. La formulación acuosa puede contener también uno o varios agentes de conservación (por ejemplo p-hidroxibenzoato de n-propilo, etilo o metilo). En los casos en los que uno de los fármacos sea sólo moderadamente o ligeramente soluble en agua, puede añadirse un agente de aumento de disolución o de solubilización, o el disolvente puede incluir un 10-60 % p/p de propilenglicol o similares.

Las composiciones parenterales de liberación controlada pueden presentarse en forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, soluciones en aceite, suspensiones en aceite o emulsiones. Como alternativa, el o los fármacos activos pueden estar incorporados en vehículos biocompatibles, liposomas, nanopartículas, implantes, o dispositivos de infusión. Los materiales para el uso en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, por ejemplo, polímeros biodegradables/bioerosionables tales como poligalactina, poli-(isobutil cianoacrilato), poli(2-hidroxietil-L-glutamina). Los vehículos biocompatibles que pueden utilizarse a la hora de formular una formulación parenteral de liberación controlada son carbohidratos (por ejemplo dextranos), proteínas (por ejemplo albúmina), lipoproteínas o anticuerpos. Los materiales para el uso en implantes pueden ser no biodegradables (por ejemplo polidimetil siloxano) o biodegradables (por ejemplo poli(caprolactona), poli(ácido glicólico) o poli(orto ésteres)).

Vías alternativas

Aunque se prefieren menos y son menos convenientes, pueden contemplarse otras vías de administración y por lo tanto otras formulaciones. A este respecto, para el uso rectal, las formas de dosificación adecuadas para una composición incluyen supositorios (de tipo emulsión o suspensión) y cápsulas de gelatina rectales (soluciones o suspensiones). En una formulación típica de supositorio, el o los fármacos activos se combinan con una base de supositorio apropiada farmacéuticamente aceptable, tal como manteca de cacao, ácidos grasos esterificados, gelatina glicerina y diversas bases solubles en agua o dispersables como los polietilenglicoles. Pueden incorporarse diversos aditivos, potenciadores o tensioactivos.

Las composiciones farmacéuticas pueden también administrarse por vía tópica sobre la piel para una absorción percutánea en formas de dosificación o formulaciones que contengan vehículos y excipientes convencionalmente no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo microesferas y liposomas. Las formulaciones incluyen cremas, pomadas, lociones, linimentos, geles, hidrogeles, soluciones, suspensiones, barras, nebulizadores, pastas, emplastos y otros tipos de sistemas de liberación transdérmica de fármacos. Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir agentes emulsionantes, antioxidantes, agentes de tamponación, agentes de conservación, humectantes, potenciadores de la penetración, agentes quelantes, agentes formadores de gel, bases de pomadas, perfumes y agentes protectores de la piel.

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

5 Las composiciones farmacéuticas anteriormente descritas para la administración tópica sobre la piel pueden utilizarse también en conexión con una administración tópica sobre la parte del cuerpo que se ha de tratar o cerca de la misma. Las composiciones pueden estar adaptadas para una aplicación directa o para una aplicación por medio de dispositivos especiales de liberación de fármacos tales como vendajes o, como alternativa, emplastos, almohadillas, esponjas, bandas u otras formas de material flexible adecuado.

Dosis y duración del tratamiento

10 Se apreciará que los fármacos de la combinación pueden administrarse de manera concomitante, en la misma formulación farmacéutica o en una formulación farmacéutica diferente o secuencialmente. Si se realiza una administración secuencial, la demora en administrar el segundo ingrediente activo (o el ingrediente activo adicional) no debería ser tal que se pierda el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. Un requisito mínimo para una combinación según esta descripción es que la combinación debería estar destinada a un uso combinado con el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. El uso previsto de una combinación puede inferirse mediante recursos, previsiones, adaptaciones y/u otros medios que ayuden a utilizar la combinación según la invención.

20 Aunque los fármacos activos de la presente invención pueden administrarse en dosis divididas, por ejemplo dos o tres veces al día, se prefiere una sola dosis diaria de cada fármaco de la combinación, prefiriéndose en máxima medida una sola dosis diaria de todos los fármacos en una sola composición farmacéutica (forma de dosificación unitaria).

El concepto "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas (tales como cápsulas, comprimidos o cilindros de jeringa cargados) adecuadas como dosis unitarias para individuos 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 necesario.

25 Por lo general, la administración es repetida. Puede ser una o varias veces al día durante un tiempo de varios días a varios años y puede incluso ser durante toda la vida del paciente. En la mayoría de los casos está indicada una administración crónica o al menos repetida periódicamente a largo plazo.

Adicionalmente, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo en la farmacocinética, la farmacodinámica o el perfil de eficacia de un producto terapéutico) sobre un paciente concreto puede influir en la dosis utilizada.

30 Excepto cuando respondan a casos especialmente perjudiciales en los que puedan requerirse dosis mayores, la dosis preferida de cada fármaco de la combinación se halla normalmente dentro del intervalo de dosis no superiores a las normalmente prescritas para un tratamiento de mantenimiento a largo plazo o que hayan demostrado ser seguras en estudios clínicos de fase 3.

35 Una ventaja notable de la invención es que cada compuesto puede utilizarse en dosis bajas en una terapia combinada, produciendo al mismo tiempo, en combinación, un beneficio clínico considerable para el paciente. La terapia combinada puede de hecho ser eficaz en dosis en las que los compuestos no tienen individualmente ningún efecto importante. Por consiguiente, una ventaja concreta de la invención consiste en la capacidad para utilizar dosis subóptimas de cada compuesto, es decir dosis que son menores que las dosis terapéuticas normalmente prescritas, 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 concretos se utilizan dosis de tan sólo 1/20, 1/30, 1/50, 1/100, o incluso menores, de las dosis terapéuticas.

En tales dosis subóptimas, los compuestos solos serían sustancialmente inactivos, mientras que la o las combinaciones según la invención son totalmente eficaces.

45 Una dosis preferida corresponde a cantidades desde un 1 % hasta un 50 % de las normalmente prescritas para un tratamiento de mantenimiento a largo plazo.

La dosis más preferida puede corresponder a cantidades desde un 1 % hasta un 10 % de las normalmente prescritas para un tratamiento de mantenimiento a largo plazo.

A continuación se ofrecen ejemplos específicos de dosis de fármacos para el uso en la invención:

50 - bromocriptina por vía oral desde aproximadamente 0,01 hasta 10 mg al día, preferiblemente menos de 5 mg al día, más preferiblemente menos de 2,5 mg al día, aún más preferiblemente menos de 1 mg al día, siendo tales dosis particularmente adecuadas para la administración por vía oral,

- ifenprodil por vía oral desde aproximadamente 0,4 hasta 6 mg al día, preferiblemente menos de 3 mg al día, más preferiblemente menos de 1,5 mg al día, aún más preferiblemente menos de 0,75 mg al día, siendo tales dosis particularmente adecuadas para la administración por vía oral,
- 5 - mexiletina por vía oral desde aproximadamente 6 hasta 120 mg al día, preferiblemente menos de 60 mg al día, más preferiblemente menos de 30 mg al día, aún más preferiblemente menos de 15 mg al día, siendo tales dosis particularmente adecuadas para la administración por vía oral,
- moxifloxacin por vía oral desde aproximadamente 4 hasta 40 mg al día, preferiblemente menos de 20 mg al día, más preferiblemente menos de 10 mg al día, aún más preferiblemente menos de 5 mg al día, siendo tales dosis particularmente adecuadas para la administración por vía oral,
- 10 - torasemida por vía oral desde aproximadamente 0,05 hasta 4 mg al día, preferiblemente menos de 2 mg al día, más preferiblemente menos de 1 mg al día, aún más preferiblemente menos de 0,5 mg al día, siendo tales dosis particularmente adecuadas para la administración por vía oral,
- 15 - trimetazidina por vía oral desde aproximadamente 0,4 hasta 6 mg al día, preferiblemente menos de 3 mg al día, más preferiblemente menos de 1,5 mg al día, aún más preferiblemente menos de 0,75 mg al día, siendo tales dosis particularmente adecuadas para la administración por vía oral,
- acamprosato por vía oral desde aproximadamente 1 hasta 400 mg al día,
- ácido aminocaproico por vía oral desde aproximadamente 0,1 g hasta 2,4 g al día,
- baclofeno por vía oral desde aproximadamente 0,15 hasta 15 mg al día,
- dietilcarbamazina por vía oral desde aproximadamente 0,6 hasta 600 mg al día,
- 20 - cinacalcet por vía oral desde aproximadamente 0,3 hasta 36 mg al día,
- cinarizina por vía oral desde aproximadamente 0,6 hasta 23 mg al día,
- eplerenona por vía oral desde aproximadamente 0,25 hasta 10 mg al día,
- leflunomida por vía oral desde aproximadamente 0,1 hasta 10 mg al día,
- levosimendán por vía oral desde aproximadamente 0,04 hasta 0,8 mg al día,
- 25 - sulfisoxazol por vía oral desde aproximadamente 20 hasta 800 mg al día,
- sulodexida por vía oral desde aproximadamente 0,05 hasta 40 mg al día,
- terbinafina por vía oral desde aproximadamente 2,5 hasta 25 mg al día,
- zonisamida por vía oral desde aproximadamente 0,5 hasta 50 mg al día.

30 Se entenderá que la cantidad del fármaco realmente administrada será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes incluyendo el estado o los estados que se hayan de tratar, la composición exacta que se haya de administrar, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y la vía de administración elegida. Por lo tanto, los intervalos de dosificación anteriormente indicados están destinados a proporcionar una orientación general y ayuda para las enseñanzas de la presente memoria, pero no están destinados a limitar el alcance de la invención.

35 Los ejemplos siguientes se ofrecen con fines de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

Algunas de las combinaciones ensayadas no están incluidas en el alcance reivindicado y sirven sólo con fines de comparación.

40 El cuidado y la cría de animales, así como las experimentaciones, se llevan a cabo según la directrices del Committee for Research and Ethical Issue del I.A.S.P. (1983).

A) Tratamiento de enfermedades relacionadas con la toxicidad del A β

45 En esta serie de experimentos se han ensayado los compuestos candidatos en cuanto a su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos del A β ₁₋₄₂ humano. El A β ₁₋₄₂ es el péptido de longitud completa que constituye agregados hallados en biopsias de pacientes humanos que sufren de EA. Los fármacos se ensayan en primer lugar individualmente, a lo que siguen ensayos de su acción combinada. El efecto se determina en diversos tipos de células, para documentar ulteriormente la actividad de los compuestos en modelos *in vitro* que ilustran diferentes

características fisiológicas de la EA. También se llevan a cabo estudios *in vivo* en un modelo de ratón para EA, confirmando este efecto protector mediante una evaluación del efecto de los compuestos en i) el rendimiento cognitivo de los animales y ii) en características moleculares distintivas (inducción de apoptosis, inducción de estrés oxidativo, inducción de ruta de inflamación) de la EA.

5 I. Los compuestos previenen la toxicidad del A β ₁₋₄₂ humano

I.1. Protección contra la toxicidad del A β ₁₋₄₂ en un modelo de célula endotelial microvascular de cerebro humano

Se utilizaron cultivos de células endoteliales microvasculares de cerebro humano para estudiar la protección proporcionada por el o los compuestos candidatos contra la toxicidad del A β ₁₋₄₂.

10 Se descongelaron rápidamente en un baño de agua a +37 °C células cerebrales endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC (por sus siglas en inglés), ScienCell Ref: 1000, congeladas en el paso 10). El sobrenadante se puso inmediatamente en 9 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (MEMD; Pan Biotech ref: P04-03600) que contenía un 10 % de suero fetal bovino (SFB; GIBCO ref 10270-106). La suspensión celular se centrifugó a 180 x g durante 10 minutos a +4 °C y los pellets se suspendieron en medio libre de suero CSC (CSC serum free, Cell System, Ref: SF-4Z0-500-R, lote 51407-4) con un 1,6 % de RocketFuel libre de suero (Cell System, Ref: SF-4Z0-500-R, lote 54102), un 2 % de penicilina 10.000 U/ml y estreptomina 10 mg/ml (PS; Pan Biotech ref: P06-07100 lote 133080808) y se sembraron en una densidad de 20.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos (matrigel layer biocoat angiogenesis system, BD, Ref 354150, lote A8662) en un volumen final de 100 μ l. En un soporte de matrigel, las células cerebrales endoteliales comenzaron espontáneamente el proceso de morfogénesis de red capilar (33).

20 Se llevaron a cabo tres cultivos separados por estado, 6 pocillos por estado.

Compuestos candidatos y tratamiento de amiloide- β ₁₋₄₂ humano

Brevemente, se reconstituyó péptido A β ₁₋₄₂ (Bachem, ref: H1368 lote 1010533) en un medio de cultivo definido a 20 μ M (solución madre) y se agitó lentamente a +37 °C durante 3 días a oscuras para su agregación. El medio de control se preparó en las mismas condiciones.

25 Después de 3 días, este péptido amiloide humano agregado se utilizó en HBMEC a 2,5 μ M diluido en medio de control (tiempo de incubación óptimo). El péptido A β ₁₋₄₂ se añadió 2 horas después de una siembra de HBMEC en matrigel durante 18 horas de incubación.

30 Una hora después de la siembra de HBMEC en matrigel se disolvieron los compuestos de ensayo y VEGF-165 en medio de cultivo (+ 0,1 % DMSO) y luego se preincubaron con HBMEC durante 1 hora antes de la aplicación de A β ₁₋₄₂ (en un volumen final por pocillo de cultivo de 100 μ l). Una hora después de la incubación de compuestos de ensayo o VEGF (dos horas después de la siembra de células en matrigel), se añadieron 100 μ l de péptido A β ₁₋₄₂ hasta una concentración final de 2,5 μ M diluido en medio de control en presencia de compuestos de ensayo o VEGF (en un volumen total/pocillo de 200 μ l), con el fin de evitar posteriores diluciones de fármaco.

Organización de placas de cultivo

35 Para todos los experimentos de este estudio se utilizó como compuesto de referencia VEGF-165, del que se sabe que es una isoforma proangiogénica de VEGF-A. VEGF-165 es una de las isoformas de VEGF más abundantes implicadas en la angiogénesis. VEGF se utilizó como compuesto de ensayo de referencia a 10 nM.

Se evaluaron las siguientes condiciones:

- Control negativo: medio solo + 0,1 % DMSO
- 40 • Intoxicación: amiloide- β ₁₋₄₂ (2,5 μ M) durante 18 h
- Control positivo: VEGF-165 (10 nM) (1 compuesto de referencia/cultivo) 1 h antes de la adición de A β ₁₋₄₂ (2,5 μ M) durante un tiempo de incubación de 18 h
- Compuestos de ensayo: compuesto de ensayo 1 h antes de la adición de A β ₁₋₄₂ (2,5 μ M) durante un tiempo de incubación de 18 h

45 Cuantificación de la red capilar

Se tomaron 2 fotografías por pocillo con una lente 4x utilizando InCell AnalyzerTM 1000 (GE Healthcare) en transmisión de luz. Todas las imágenes se tomaron en las mismas condiciones. El análisis de las redes de angiogénesis se realizó utilizando *software Developer* (GE Healthcare). Se evaluó la longitud total de la red capilar.

Procesamiento de datos

Todos los valores se expresan como media \pm e.e. media de los 3 cultivos ($n = 6$ por estado). Los análisis estadísticos se realizaron en las diferentes condiciones llevando a cabo un ANOVA seguido de la prueba de Dunnett cuando estaba permitido (*software* Statview versión 5.0). Los valores (como %) insertados en los gráficos muestran la evolución de la toxicidad amiloide. De hecho, la toxicidad amiloide se tomó como el 100 % y el efecto del compuesto de ensayo se calculó como % de esta toxicidad amiloide.

Resultados

Los resultados se muestran en la figura 1. Demuestran que los fármacos ensayados solos inducen un considerable efecto protector contra la toxicidad causada por el péptido A β 1-42:

- la torasemida, en una dosis baja de por ejemplo 400 nM, induce un fuerte efecto protector;
- la bromocriptina, en una dosis baja de por ejemplo 3,2 nM, induce un fuerte efecto protector.

Los resultados muestran también que, inesperadamente, las concentraciones de fármaco superiores o inferiores en comparación con las concentraciones de fármaco antes mencionadas pueden empeorar o más bien tener menos efecto o no tener ningún efecto en la toxicidad del A β ₁₋₄₂ en este modelo.

I.2 Protección contra la toxicidad del A β ₁₋₄₂ en células neuronales corticales primarias

Compuesto de ensayo y tratamiento de amiloide- β 1-42 humano

Se cultivaron neuronas corticales de rata como describen Singer et al. (42). Se dio muerte a ratas hembra brevemente preñadas de 15 días de gestación mediante luxación cervical (Rats Wistar) y se extrajeron los fetos del útero. Se extrajo el córtex y se colocó éste en medio helado de Leibovitz (L15) que contenía un 2 % de penicilina 10.000 U/ml y estreptomina 10 mg/ml y un 1 % de albúmina de suero bovino (ASB). Los córtex se disociaron mediante tripsina durante 20 min. a 37 °C (0,05 %). La reacción se detuvo mediante la adición de medio de Eagle modificado por Dulbecco (MEMD) que contenía DNasa1 grado II y un 10 % de suero fetal bovino (SFB). Luego, las células se disociaron mecánicamente mediante 3 pasos en serie a través de una pipeta de 10 ml y se centrifugaron a 515 x g durante 10 min. a +4 °C. Se depuso el sobrenadante y se resuspendió el pelet de células en un medio de cultivo definido que consistía en Neurobasal complementado con B27 (2 %), L-glutamina (0,2 mM), un 2 % de solución PS y 10 ng/ml de BDNF. Se contaron las células viables en un citómetro Neubauer utilizando la prueba de exclusión de azul tripán. Las células se sembraron en una densidad de 30.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (los pocillos estaban revestidos previamente con poli-L-lisina (10 μ g/ml)) y se cultivaron a +37 °C en una atmósfera de aire humidificado (95 %)/CO₂ (5 %).

Brevemente, se reconstituyó péptido A β ₁₋₄₂ en un medio de cultivo definido a 40 μ M (solución madre) y se agitó lentamente a +37 °C durante 3 días a oscuras para su agregación. El medio de control se preparó en las mismas condiciones.

Después de 3 días, la solución se utilizó en neuronas corticales primarias de la siguiente manera:

Después de 10 días de cultivo neuronal, se disolvió fármaco en medio de cultivo (+0,1 % DMSO) y luego se preincubó con neuronas durante 1 hora antes de la aplicación de A β ₁₋₄₂ (en un volumen final por pocillo de cultivo de 100 μ l). Una hora después de la incubación del o de los fármacos, se añadieron 100 μ l de péptido A β ₁₋₄₂ hasta una concentración final de 10 μ M diluido en presencia del o de los fármacos, con el fin de evitar posteriores diluciones del o de los fármacos. Se intoxicaron neuronas corticales durante 24 horas. Se llevaron a cabo tres cultivos separados por estado, 6 pocillos por estado.

Como control positivo y compuestos de referencia, respectivamente, se utilizaron BDNF (50 ng/ml) y estradiol- β (150 nM).

Organización de placas de cultivo

Como control positivo se utilizó estradiol- β a 150 nM.

El estradiol- β se disolvió en medio de cultivo y se preincubó durante 1 h antes de la aplicación de amiloide- β ₁₋₄₂ agregado.

Se evaluaron las siguientes condiciones:

- PLACA DE CONTROL: 12 pocillos/estado
 - Control negativo: medio solo + 0,1 % DMSO
 - Intoxicación: amiloide- β ₁₋₄₂ (10 μ M) durante 24 h
 - Compuesto de referencia: estradiol (150 nM) 1 h

- PLACA DE FÁRMACO: 6 pocillos/estado
 - Control negativo: medio solo + 0,1 % DMSO
 - Intoxicación: amiloide- β_{1-42} (10 μ M) durante 24 h
 - Fármaco: fármaco - 1 h seguido de amiloide- β_{1-42} (10 μ M) durante 24 h

5 Ensayo de actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH)

24 horas después de la intoxicación, se retiró el sobrenadante y se analizó éste con el Cytotoxicity Detection Kit (LDH, Roche Applied Science, ref: 11644793001, lote: 11800300). Este ensayo colorimétrico para la cuantificación de la toxicidad celular está basado en la medición de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada del citosol de células moribundas al sobrenadante.

10 Procesamiento de datos

Todos los valores se expresan como media \pm e.e. media de los 3 cultivos (n = 6 por estado). Los análisis estadísticos se realizaron en las diferentes condiciones (ANOVA seguido de la prueba de Dunnett cuando estaba permitido, *software* Statview versión 5.0).

Resultados

15 Los resultados obtenidos para fármacos individuales seleccionados en los ensayos de toxicidad en células neuronales corticales primarias se presentan en las figuras 2 y 26. Demuestran que los fármacos ensayados solos inducen un considerable efecto protector contra la toxicidad causada por el péptido A β 1-42:

- la trimetazidina, en una dosis baja de por ejemplo 40 nM, induce un fuerte efecto protector;
- la mexiletina, en una dosis de tan sólo 3,2 nM, induce un fuerte efecto protector;
- 20 - la bromocriptina, en una dosis de tan sólo 40 nM, induce un fuerte efecto protector;
- el ifenprodil, en una dosis de tan sólo 600 nM, induce un fuerte efecto protector;
- la moxifloxacina, en una dosis de tan sólo 20 nM, induce un fuerte efecto protector;
- la torasemida, en una dosis de 200 nM, induce un fuerte efecto protector,
- la homotaurina, en una dosis de 8 nM, induce un fuerte efecto protector.

25 Los resultados obtenidos muestran también que, inesperadamente, las concentraciones de fármaco superiores o inferiores a las indicadas anteriormente pueden empeorar o más bien tener menos efecto protector o no tener ningún efecto protector en la toxicidad del A β_{1-42} para células neuronales.

II. Las terapias combinadas previenen la toxicidad del A β_{1-42} humano

II.1 Efecto de terapias combinadas en la toxicidad del péptido A β_{1-42} humano en células HBMEC humanas

30 Se evalúa en células humanas la eficacia de combinaciones de fármacos de la invención. El protocolo utilizado en estos ensayos es el mismo que el descrito en la sección I.1 anterior.

Resultados

35 Todas las combinaciones de fármacos ensayadas proporcionan un efecto protector contra la toxicidad del péptido A β_{1-42} humano en el modelo HBMEC, como se muestra posteriormente en la tabla 3 y se ejemplifica en las figuras 3 a 6 y las figuras 13 y 14. Los resultados muestran claramente que la intoxicación por péptido amiloide humano agregado (A β_{1-42} 2,5 μ M) se previene de forma significativa mediante combinaciones de la invención, mientras que, en esas concentraciones, los fármacos solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación en las condiciones experimentales anteriormente descritas.

40

Tabla 3:

COMBINACIÓN DE FÁRMACOS	Efecto protector en células HBMEC intoxicadas con A β ₁₋₄₂
Baclofeno y torasemida	+
Eplerenona y torasemida	+
Bromocriptina y sulfisoxazol	+
Sulfisoxazol y torasemida	+
Terbinafina y torasemida	+
Mexiletina y cinacalcet	+
Baclofeno y trimetazidina y torasemida	+
Baclofeno y cinacalcet y torasemida	+
Baclofeno y acamprosato y torasemida	+
Sulfisoxazol y trimetazidina y torasemida y zonisamida	+
Sulfisoxazol y mexiletina y torasemida y cinacalcet	+
Baclofeno y acamprosato y torasemida y dietilcarbamazina	+
Baclofeno y acamprosato y torasemida e ifenprodil	+
Levosimendán y baclofeno y trimetazidina	+
Levosimendán y ácido aminocaproico y trimetazidina	+
Levosimendán y terbinafina y trimetazidina	+
Levosimendán y sulfisoxazol y trimetazidina	+

Como está ejemplificado en las Figuras 3 a 6, 13 y 14, las siguientes combinaciones de fármacos proporcionan efectos protectores particularmente interesantes contra la toxicidad del péptido A β ₁₋₄₂ humano en células HBMEC intoxicadas:

5

- baclofeno y torasemida,
- sulfisoxazol y torasemida,
- torasemida y eplerenona,
- sulfisoxazol y bromocriptina,

10

- terbinafina y torasemida, o
- cinacalcet y mexiletina.

II.2 Efecto de terapias combinadas en la toxicidad del péptido A β ₁₋₄₂ humano en células neuronales corticales primarias

15

Se evalúa en células neuronales corticales primarias la eficacia de combinaciones de fármacos de la invención. El protocolo utilizado en estos ensayos es el mismo que el descrito en la sección I.2 anterior.

Resultados

Todas las combinaciones de fármacos ensayadas proporcionan un efecto protector contra la toxicidad del péptido A β ₁₋₄₂ humano en células neuronales corticales primarias, como se muestra posteriormente en la tabla 4 y se ejemplifica en las figuras 7 a 12 y 16 a 22. Los resultados muestran claramente que la intoxicación por péptido

amiloide humano agregado ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) se previene de forma significativa mediante combinaciones de la invención, mientras que, en esas concentraciones, los fármacos solos no tienen ningún efecto significativo en la intoxicación en las condiciones experimentales anteriormente descritas.

Tabla 4:

COMBINACIONES DE FÁRMACOS	Efecto protector en células neuronales corticales primarias intoxicadas con $A\beta_{1-42}$
Acamprosato e ifenprodil	+
Baclofeno y mexiletina	+
Baclofeno y trimetazidina	+
Baclofeno y torasemida	+
Cinacalcet y mexiletina	+
Cinarizina y trimetazidina	+
Trimetazidina y zonisamida	+
Levosimendán y mexiletina	+
Levosimendán e ifenprodil	+
Levosimendán y trimetazidina	+
Levosimendán y moxifloxacina	+
Mexiletina e ifenprodil	+
Moxifloxacina y baclofeno	+
Moxifloxacina y cinacalcet	+
Moxifloxacina y trimetazidina	+
Moxifloxacina y sulfisoxazol	+
Moxifloxacina y zonisamida	+
Torasemida y sulfisoxazol	+
Baclofeno y trimetazidina y torasemida	+
Baclofeno y cinacalcet y torasemida	+
Baclofeno y acamprosato y torasemida	+
Sulfisoxazol y trimetazidina y torasemida y zonisamida	+
Sulfisoxazol y mexiletina y torasemida y cinacalcet	+
Baclofeno y acamprosato y torasemida y dietilcarbamazina	+
Baclofeno y acamprosato y torasemida e ifenprodil	+
Levosimendán y baclofeno y trimetazidina	+
Levosimendán y ácido aminocaproico y trimetazidina	+
Levosimendán y terbinafina y trimetazidina	+
Levosimendán y sulfisoxazol y trimetazidina	+

Como está ejemplificado en las Figuras 7 a 12 y 15 a 22, las siguientes combinaciones de fármacos proporcionan efectos protectores particularmente interesantes contra la toxicidad del péptido A β ₁₋₄₂ humano en células neuronales corticales primarias intoxicadas:

- acamprosato e ifenprodil
- 5 - baclofeno y mexiletina,
- baclofeno y torasemida,
- baclofeno y trimetazidina,
- cinacalcet y mexiletina,
- cinarizina y trimetazidina,
- 10 - trimetazidina y zonisamida,
- mexiletina e ifenprodil,
- moxifloxacin y baclofeno,
- moxifloxacin y cinacalcet,
- moxifloxacin y trimetazidina,
- 15 - moxifloxacin y sulfisoxazol,
- moxifloxacin y zonisamida, o
- torasemida y sulfisoxazol.

II.4 Protección del crecimiento de neuritas contra la toxicidad del A β ₁₋₄₂

Compuestos de ensayo y tratamiento de A β ₁₋₄₂

- 20 Se cultivan neuronas corticales primarias de rata como se ha descrito anteriormente.

Después de 10 días de cultivo, las células se incuban con fármacos. Después de 1 hora, las células se intoxican mediante 2,5 μ M de beta-amiloide (1-42; Bachem) en medio definido sin BDNF, pero junto con fármacos. Las neuronas corticales se intoxican durante 24 horas. Como control positivo (neuroprotector) se utiliza BDNF (10 ng/ml). Se llevaron a cabo tres cultivos independientes por estado, 6 pocillos por estado.

- 25 Longitud de neuritas

Después de 24 horas de intoxicación, se retira el sobrenadante y se fijan las neuronas corticales mediante una solución fría de etanol (95 %) y ácido acético (5 %) durante 5 min. Después de una permeabilización con un 0,1 % de saponina, las células se bloquean durante 2 h con PBS que contiene un 1 % de suero fetal bovino. Luego, las células se incuban con anticuerpo monoclonal anti-proteínas asociadas a microtúbulos 2 (MAP-2; Sigma). Este anticuerpo se revela con IgG de cabra antirratón Alexa Fluor 488 (sonda molecular). Los núcleos de las neuronas se marcaron mediante un marcador fluorescente (solución Hoechst, SIGMA).

- 30

Se tomaron 10 fotografías por pocillo utilizando InCell AnalyzerTM 1000 (GE Healthcare) con 20 aumentos. Todas las fotografías se toman en las mismas condiciones. El análisis de la red de neuritas se realiza utilizando *software* Developer (GE Healthcare) con el fin de evaluar la longitud total de la red de neuritas.

- 35 Resultados

La combinación de baclofeno y torasemida induce un efecto protector significativo contra la toxicidad del péptido A β ₁₋₄₂ humano (mejora de un 531 % de la red de neuritas) en células neuronales corticales primarias, como se muestra en la figura 23. Los resultados muestran claramente que la intoxicación por péptido amiloide humano (A β ₁₋₄₂ 2,5 μ M) se previene de manera significativa mediante la combinación y que, además, la combinación aumenta la red de neuritas en comparación con el control.

- 40

Por lo tanto, esta combinación permite una protección eficaz de las células neuronales corticales y de redes neuronales celulares contra la toxicidad del péptido A β ₁₋₄₂ humano. Además, tal aumento de la red de neuritas confirma la eficacia de tales fármacos en trastornos neurológicos como las lesiones de la médula espinal.

III. Los compuestos previenen la toxicidad del A β ₂₅₋₃₅ humano *in vivo*

Animales

A lo largo de todo el estudio se utilizan ratones Swiss macho. Los animales están guardados en jaulas de plástico, con libre acceso a comida de laboratorio y agua, excepto durante los experimentos conductuales, y se mantienen en un entorno regulado, con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (luz a las 8:00 a.m.). Los experimentos conductuales se llevan a cabo en una sala experimental insonorizada y con regulación de aire, a la que los ratones habían sido habituados al menos 30 min. antes de cada experimento.

Preparación e inyección de péptido amiloide

Se disolvieron el péptido A β ₂₅₋₃₅ y péptido A β ₂₅₋₃₅ *scrambled* (aleatorizado) en agua bidestilada estéril y se almacenaron los mismos a -20 °C hasta su uso. Una observación por microscopía óptica indicaba que la incubación del péptido A β ₂₅₋₃₅, pero no del péptido A β ₂₅₋₃₅ *scrambled*, llevaba a la presencia de dos tipos de precipitados insolubles, estructuras similares a fibrillas birrefringentes y agregados globulares amorfos. Luego se administran los péptidos β -amiloides por vía intracerebroventricular (i.c.v.). Brevemente, se anestesia cada ratón ligeramente con éter y se inserta una aguja de acero inoxidable de calibre unilateralmente 1 mm a la derecha del punto de la línea media equidistante de cada ojo, a una distancia igual entre los ojos y las orejas y perpendicular al plano del cráneo. Se suministran péptidos o vehículo gradualmente en un plazo de aproximadamente 3 s. Los ratones presentaron un comportamiento normal en el plazo de 1 min. después de la inyección. El sitio de administración se controla inyectando tinta china en experimentos preliminares. Ni la inserción de la aguja ni la inyección del vehículo tuvieron una influencia significativa en la supervivencia, las respuestas conductuales o las funciones cognitivas.

Tratamiento con fármaco o con fármacos

El día -1, es decir 24 h antes de la inyección de péptido A β ₂₅₋₃₅, se administran fármacos, combinación de fármacos o la solución de vehículo *per os* mediante gavaje dos veces al día (a las 8:00 am y a las 6:00 pm).

El día 0 (a las 10:00 am) se inyecta a los ratones por vía i.c.v. péptido A β ₂₅₋₃₅ o péptido A β ₂₅₋₃₅ *scrambled* (control) en un volumen final de 3 μ l (3mM).

Entre el día 0 y el día 7 se administran fármacos, combinación de fármacos o la solución de vehículo *per os* mediante gavaje una o dos veces al día (a las 8:00 am y a las 6:00 pm). Un grupo de animales recibe donepezilo (compuesto de referencia - 1 mg/kg/día) *per os* mediante gavaje en una sola inyección (a las 8:00 am). Los fármacos se solubilizan en agua y se preparan al momento justo antes de cada administración por gavaje.

El día 7 se ensayan todos los animales en cuanto al rendimiento de alternancia espontánea en la prueba del laberinto en Y, un índice de la memoria funcional espacial.

Los días 7 y 8 se evalúa la memoria contextual a largo plazo de los animales utilizando el procedimiento de evitación pasiva de tipo *step-down* (descenso).

El día 8 los animales son sacrificados. Se disecciona su cerebro y se mantiene éste a -80 °C para un posterior análisis.

Se observan resultados positivos en rendimientos conductuales y en ensayos bioquímicos realizados 7 días después de la inyección icv de péptido A β ₂₅₋₃₅, en particular para las combinaciones que figuran en la tabla 5.

Tabla 5:

COMBINACIONES DE FÁRMACOS	Resultados en ensayos bioquímicos y/o conductuales
Baclofeno y torasemida	+
Mexiletina y cinacalcet	+
Sulfisoxazol y torasemida	+
Baclofeno y trimetazidina y torasemida	+
Baclofeno y cinacalcet y torasemida	+
Baclofeno y acamprosato y torasemida	+
Sulfisoxazol y trimetazidina y torasemida y zonisamida	+
Sulfisoxazol y mexiletina y torasemida y cinacalcet	+

COMBINACIONES DE FÁRMACOS	Resultados en ensayos bioquímicos y/o conductuales
Baclofeno y acamprosato y torasemida y dietilcarbamazina	+
Baclofeno y acamprosato y torasemida e ifenprodil	+
Levosimendán y baclofeno y trimetazidina	+
Levosimendán y ácido aminocaproico y trimetazidina	+
Levosimendán y terbinafina y trimetazidina	+
Levosimendán y sulfisoxazol y trimetazidina	+

IV. Los compuestos mejoraban los rendimientos conductuales y cognitivos de animales intoxicados

Se intoxicaron animales como en la sección anterior.

Rendimientos de alternancia espontánea-prueba del laberinto en Y

- 5 El día 7 se ensayaron todos los animales en cuanto al rendimiento de alternancia espontánea en el laberinto en Y, un índice de la memoria funcional espacial. El laberinto en Y está hecho de cloruro de polivinilo gris. Cada brazo tiene 40 cm de longitud, 13 cm de altura, 3 cm de anchura en la parte inferior, 10 cm de anchura en la parte superior, y converge en un ángulo igual. Se coloca cada ratón en el extremo de un brazo y se le permite moverse libremente por el laberinto durante una sesión de 8 min. Se comprueba visualmente la serie de entradas en un brazo, incluyendo posibles retornos al mismo brazo. Una alternancia se define como entradas en los tres brazos en ocasiones consecutivas. Por lo tanto, el número de alternancias máximas es el número total de entradas en un brazo menos dos y el porcentaje de alternancia se calcula como (alternancias reales / alternancias máximas) x 100. Los parámetros incluyen el porcentaje de alternancia (índice de memoria) y el número total de entradas en un brazo (índice de exploración). Los animales que muestran un comportamiento extremo (porcentaje de alternancia < 25 % o > 85 % o número de entradas en un brazo < 10) se deponen. Normalmente, éstos representan un 0-5 % de los animales. Este ensayo sirve incidentalmente para analizar en el nivel conductual el impacto y el efecto amnésico inducido en ratones mediante la inyección de Aβ25-35.

Ensayo de evitación pasiva

- 20 El aparato es una caja de dos compartimentos (15 x 20 x 15 cm de altura) con uno iluminado, con paredes de cloruro de polivinilo blancas, y el otro oscuro, con paredes de cloruro de polivinilo negras y un suelo de rejilla. Una puerta de guillotina separa cada compartimento. Una lámpara de 60 W colocada 40 cm por encima del aparato ilumina el compartimento blanco durante el experimento. Podían alimentarse al suelo de rejilla estímulos eléctricos plantares aleatorizados (0,3 mA durante 3 s) utilizando un aleatorizador generador de estímulos eléctricos (Lafayette Instruments, Lafayette, EE.UU.). La puerta de guillotina está inicialmente cerrada durante la sesión de adiestramiento. Se coloca a cada ratón en el compartimento blanco. Después de 5 s se levanta la puerta. Cuando el ratón entra en el compartimento oscuro y coloca todas sus patas sobre el suelo de rejilla, la puerta se cierra y se suministra el estímulo eléctrico plantar durante 3 s. Se registran la latencia de paso a través, es decir el tiempo de espera hasta entrar en el compartimento oscuro, y el número de vocalizaciones. El ensayo de retención se lleva a cabo 24 h después del adiestramiento. Se coloca de nuevo a cada ratón en el compartimento blanco. Después de 5 s se levanta la puerta; la latencia de paso a través y la latencia de escape, es decir el tiempo consumido para volver al compartimento blanco, se registran hasta los 300 s.

Se observan resultados positivos para cada una de las combinaciones ensayadas que figuran en la Tabla 6.

Tabla 6

Combinación de fármacos	Ensayo LABERINTO EN Y	Evitación pasiva	
		Latencia de escape	Latencia de paso a través
Baclofeno-torasemida	+	+	+
Baclofeno-acamprosato-torasemida	+	+	+

Combinación de fármacos	Ensayo LABERINTO EN Y	Evitación pasiva	
		Latencia de escape	Latencia de paso a través
Mexiletina y cinacalcet	+	+	+
Sulfisoxazol y torasemida	+	+	+

V. Los compuestos de la invención mejoran los problemas neurofisiológicos de las enfermedades neurológicas

Se ensayan terapias combinadas en el modelo *in vivo* de intoxicación por A β . Se evalúan sus efectos en diversos parámetros afectados en enfermedades neurológicas:

- 5 - nivel de expresión de caspasas 3 y 9, considerado como un indicador de apoptosis,
- peroxidación de lípidos, considerado como un marcador para el nivel de estrés oxidativo,
- ensayo de expresión de GFAP, considerado como un marcador del nivel de inflamación cerebral,
- integridad de la barrera hematoencefálica,
- integridad sináptica total (sinaptofisina ELISA).

10 Integridad de la barrera hematoencefálica

El diseño experimental con respecto a la intoxicación de animales por A β es el mismo que en la parte III.

El efecto protector potencial de las terapias combinadas en la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) se analiza en ratones a los que se les ha inyectado por vía intracerebroventricular (i.c.v.) péptido amiloide- β 25-35 oligomérico (A β 25-35) o péptido de control A β 25-35 *scrambled* (Sc.A β), 7 días después de la inyección.

- 15 El día 7 después de la inyección de A β 25-35 se someten los animales a ensayo para determinar la integridad de la BHE utilizando el método AE (azul de Evans). Se sabe que el colorante AE se une a la albúmina sérica después de una inyección periférica, y dicho colorante se ha utilizado como trazador para la albúmina sérica.

- 20 Se inyecta por vía intraperitoneal (i.p.) colorante AE (2 % en solución salina, 4 ml/kg) 3 h antes de la perfusión transcárdica. Luego se anestesia los ratones con i.p. 200 μ l de premezcla de quetamina 80 mg/kg, xilazina 10 mg/kg, se abre el tórax. Se realiza a los ratones una perfusión transcárdica con 250 ml de solución salina durante aproximadamente 15 min. hasta que el fluido procedente del atrio derecho se vuelve incoloro. Después de una decapitación, se extrae el cerebro y se disecciona éste en tres regiones: córtex cerebral (izquierdo + derecho), hipocampo (izquierdo + derecho), diencefalo. Luego se pesa cada región cerebral para una medición cuantitativa de extravasación de AE-albúmina.

- 25 Se homogeneizan muestras en solución salina tamponada con fosfato y se mezclan las mismas mediante formación de vórtice después de añadir ácido tricloroacético al 60 % para precipitar la proteína. Las muestras se enfrían a 4 °C y luego se centrifugan durante 30 min. a 10.000 g, 4 °C. Se mide el sobrenadante a 610 nm en cuanto a absorbancia de AE utilizando un espectrofotómetro.

El AE se cuantifica tanto

- 30 - en forma de μ g/mg de tejido cerebral utilizando una curva estándar, obtenida mediante la concentración conocida de AE-albúmina,
- como en forma de μ g/mg de proteína.

Como se menciona en la tabla 7, las terapias combinadas de la invención son eficaces a la hora de mantener la integridad de la BHE, en comparación con animales intoxicados no tratados.

35 Integridad sináptica total (sinaptofisina ELISA)

Se ha elegido como marcador de la integridad sináptica la sinaptofisina, que se somete a ensayo utilizando un kit ELISA comercial (USCN, Ref. E90425Mu). Se preparan muestras de tejidos de hipocampo y se homogeneizan éstas en un tampón de extracción específico según la descripción del fabricante y de la bibliografía de referencia.

- 40 Se lavan los tejidos en PBS helada (0,02 moles/l, pH 7,0-7,2) para eliminar el exceso de sangre minuciosamente y se pesan antes de congelarlos en nitrógeno y almacenarlos a -80 °C. Se cortan los tejidos en trozos pequeños y se homogeneizan en 1 ml de solución salina tampón fosfato (PBS) helada con un homogeneizador de vidrio. La

suspensión resultante se somete a ultrasonidos con un disruptor ultrasónico de células o se somete a dos ciclos de congelación-descongelación para romper adicionalmente las membranas celulares. Luego, los productos de homogeneización se centrifugan durante 5 min. a 5.000 g y el sobrenadante se somete inmediatamente a ensayo.

Todas las muestras se ensayan por triplicado.

- 5 La cuantificación de las proteínas se lleva a cabo con el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (ácido bicinconínico) (Pierce, nº ref. 23227) para evaluar el rendimiento de extracción y permitir una normalización.

Luego se calculan a partir de diluciones de curva estándar las concentraciones totales de proteínas, que sirven para normalizar los resultados del ELISA.

- 10 Los resultados (Tabla 7) muestran que las terapias combinadas son eficaces a la hora de mantener un nivel total de sinaptofisina en el cerebro de los animales tratados, en comparación con los animales intoxicados no tratados.

Ensayo de estrés oxidativo

- 15 Se sacrifican ratones mediante decapitación y se extraen rápidamente ambos hipocampos, que se pesan y se mantienen en nitrógeno líquido hasta ser sometidos a ensayo. Después de la descongelación, los hipocampos se homogeneizan en metanol frío (1/10 p/v) y se centrifugan a 1.000 g durante 5 min. y el sobrenadante se coloca en un tubo eppendorf. El volumen de reacción de cada producto de homogeneización se añade a FeSO₄ 1 mM, H₂SO₄ 0,25 M, naranja de xilenol 1 mM y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de leer la absorbancia a 580 nm (A580 1), se añaden a la muestra 10 µl de hidroperóxido de cumeno 1mM (CHP) y se incuba durante 30 min. a temperatura ambiente, para determinar el nivel de oxidación máximo. La absorbancia se mide a 580 nm (A580 2). El nivel de peroxidación de lípidos se determina como equivalentes de CHP (CHPE) según: CHPE = A580 1/A580 2 x [CHP] y se expresa como equivalentes de CHP por peso de tejido y como porcentaje de datos del grupo de control.

Los resultados (Tabla 7) muestran que las terapias combinadas son eficaces a la hora de reducir el estrés oxidativo total inducido por Aβ en el cerebro de los animales tratados, en comparación con los animales intoxicados no tratados.

- 25 Ensayo de inducción de ruta de caspasa y ensayo de expresión de GFAP

- 30 Se sacrifican ratones mediante decapitación y se extraen rápidamente ambos hipocampos, que se lavan en PBS helada (0,02 moles/l, pH 7,0-7,2) para eliminar el exceso de sangre minuciosamente, se pesan y se mantienen en nitrógeno líquido hasta ser sometidos a ensayo. Se cortan los tejidos en trozos pequeños y se homogeneizan en 1 ml de PBS helada con un homogeneizador de vidrio. La suspensión resultante se somete a ultrasonidos con un disruptor ultrasónico de células o se somete a dos ciclos de congelación-descongelación para romper adicionalmente las membranas celulares. Luego, los productos de homogeneización se centrifugan a 5.000 g durante 5 min. y el sobrenadante se somete inmediatamente a ensayo.

Los experimentos se realizan con ensayos comerciales: caspasa-3 (USCN - E90626Mu), caspasa-9 (USCN - E90627Mu), GFAP (USCN - E90068).

- 35 La cuantificación de las proteínas se lleva a cabo con el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (ácido bicinconínico) (Pierce, nº ref. 23227) para evaluar el rendimiento de extracción y permitir una normalización.

Los resultados (Tabla 7) muestran que las terapias combinadas tienen un efecto positivo en marcadores de apoptosis e inflamación en el cerebro de los animales tratados, en comparación con los animales intoxicados no tratados.

40 Tabla 7

Combinación de fármacos	Ruta de caspasa	Estrés oxidativo	Expresión de GFAP	Integridad de BHE	Integridad sináptica total
Baclofenotorasemida	+	+	+	+	+
Baclofenocamprosatorasemida	+	+	+	+	+
Mexiletina y cinacalcet	+	+	+	+	+

Combinación de fármacos	Ruta de caspasa	Estrés oxidativo	Expresión de GFAP	Integridad de BHE	Integridad sináptica total
Sulfisoxazol y torasemida	+	+	+	+	+

B) Prevención de la toxicidad del glutamato en células neuronales

5 En este conjunto adicional de experimentos se ensayaron compuestos candidatos en cuanto a su capacidad para prevenir o reducir los efectos tóxicos de la toxicidad del glutamato en células neuronales. La toxicidad del glutamato está implicada en la patogénesis de enfermedades neurológicas o trastornos neurológicos tales como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, neuropatías, alcoholismo o abstinencia alcohólica o lesiones de la médula espinal. Los fármacos se ensayan en primer lugar individualmente, a lo que siguen ensayos de su acción combinada.

Métodos

10 Se ensaya en células neuronales corticales primarias la eficacia de combinaciones de fármacos de la invención. El protocolo utilizado en estos ensayos es el mismo que el descrito anteriormente en la sección A.I.2.

Ensayos de toxicidad del glutamato

Se evalúa el efecto neuroprotector de compuestos mediante una cuantificación de la red de neuritas (inmunotinción de neurofilamentos (NF)) que revela específicamente las neuronas glutamatérgicas.

15 Después de 12 días de cultivo de las neuronas, se disuelven fármacos de las combinaciones candidatas en medio de cultivo (+0,1 % DMSO). Luego se preincuban las combinaciones candidatas con neuronas durante 1 hora antes de la lesión por glutamato. Una hora después de la incubación se añade glutamato durante 20 min., hasta una concentración final de 40 µM, en presencia de combinaciones candidatas, con el fin de evitar posteriores diluciones de fármaco. Al final de la incubación se cambia el medio por medio con combinación candidata, pero sin glutamato.

20 El cultivo se fija 24 horas después de la lesión por glutamato. Como control positivo se utiliza MK801 (hidrogenomaleato de dizocilpina, 77086-22-7 - 20 µM).

Después de una permeabilización con saponina (Sigma), se bloquean las células durante 2 h con PBS que contiene suero de cabra al 10 %, luego se incuban las células con anticuerpo primario monoclonal de ratón contra anticuerpo antineurofilamentos (NF, Sigma). Este anticuerpo se revela con IgG de cabra antirratón Alexa Fluor 488.

25 Se marcan los núcleos de las células mediante un marcador fluorescente (solución Hoechst, SIGMA) y se cuantifica la red de neuritas. Se utilizan seis pocillos por estado para evaluar la supervivencia neuronal en 3 cultivos diferentes.

Resultados

Todas las combinaciones de fármacos ensayadas proporcionan un efecto protector contra la toxicidad del glutamato para las células neuronales corticales. Los resultados se muestran en la Tabla 8 siguiente.

30 Como está ejemplificado en las figuras 24 y 25, las combinaciones de la invención protegen fuertemente las neuronas contra la toxicidad del glutamato en las condiciones experimentales anteriormente descritas. Cabe destacar que se observa una protección eficaz utilizando concentraciones de fármacos en las que los fármacos utilizados solos no tienen ningún efecto protector significativo o tienen un menor efecto protector.

Tabla 8

Combinación de fármacos	Efecto neuroprotector contra la toxicidad del glutamato
Baclofeno-torasemida	+
Baclofeno-acamprosato-torasemida	+
Mexiletina y cinacalcet	+
Sulfisoxazol y torasemida	+

35

C) Mejora de otros trastornos relacionados con la excitotoxicidad del glutamato utilizando combinaciones de la invención

El efecto protector *in vitro* antes mencionado contra la toxicidad del glutamato de los fármacos y las combinaciones de fármacos de la invención, combinado con los efectos protectores ejemplificados en la presente memoria en diversos modelos de EA, movió a los inventores a ensayar estos fármacos y estas combinaciones en algunos modelos de otras enfermedades en cuya patogénesis también está implicada la toxicidad del glutamato, como la EM, la ELA y el dolor neuropático.

5

I) Efecto protector de combinaciones en un modelo *in vivo* de esclerosis múltiple

Para demostrar el efecto beneficioso de composiciones de la invención en el tratamiento de la esclerosis múltiple, se utiliza un modelo en el que unos ratones inmunizados con glucoproteína de mielina de oligodendrocitos (inmunizados con MOG (por sus siglas en inglés)) desarrollan EAE progresiva.

10 Animales y sustancias químicas

Se compran ratones hembra C57L/6J (8 semanas de edad) a Janvier (Francia); después de dos semanas de habituación, los ratones hembra (10 semanas de edad) desarrollan parálisis crónica después de una inmunización con péptido MOG (glucoproteína de mielina de oligodendrocitos). La encefalomiелitis experimental se induce con el kit de Hooke MOG₃₅₋₅₅/CFA Emulsion PTX (toxina pertussis) para inducción de EAE (EK-0110, EK-0115; laboratorios Hooke). El kit de control es CK-0115 (laboratorios Hooke).

15

Procedimiento experimental

La encefalomiелitis experimental se induce mediante el procedimiento siguiente:

El día 0 se llevan a cabo dos inyecciones subcutáneas de 0,1 ml cada una; una en la parte superior del lomo del ratón y otra en la parte inferior del lomo. Cada inyección contiene 100 µg de péptido MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), 200 µg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra inactivados y se emulsiona en coadyuvante completo de Freund (CFA (por sus siglas en inglés) (laboratorios Hooke). La emulsión proporciona el antígeno necesario para expandir y diferenciar las células T autoinmunes específicas de MOG.

20

Se llevan a cabo dos inyecciones intraperitoneales de 500 ng de toxina pertussis en PBS (kit de Hooke) 2 horas (día 0) y 24 horas (día 1) después de la inyección de MOG. La toxina pertussis aumenta el desarrollo de la EAE proporcionando coadyuvante adicional.

25

Los ratones desarrollan EAE 8 días después de la inmunización y permanecen paralizados crónicamente a lo largo de la duración del experimento. Después de la inmunización se observa diariamente a los ratones en cuanto a síntomas clínicos en un procedimiento ciego. Se mantiene a los animales en una instalación libre de patógenos convencional y todos los experimentos se llevan a cabo de acuerdo con las directrices prescritas y aprobadas por el comité local permanente de bioética.

30

Grupos experimentales y tratamiento con fármacos:

Antes de la inmunización se homogeneizan por peso grupos de ratones hembra según se ha descrito:

- Grupo de control: inyección de vehículo en las mismas condiciones que los ratones EAE (desde el día -1 hasta el día 28, diariamente se administra placebo)
- Grupo EAE: inyección de MOG (día 0) + inyecciones de toxina pertussis (día 0 y 1) - desde el día -1 hasta el día 28, diariamente se administra placebo por vía oral
- EAE + control positivo: inyección de MOG (día 0) + inyecciones de toxina pertussis (día 0 y 1) - desde el día -1 hasta el día 28, diariamente se administra dexametazona por vía oral
- EAE + grupo de tratamiento: inyección de MOG (día 0) + inyecciones de toxina pertussis (día 0 y 1). Los tratamientos comienzan un día antes de la inmunización y duran hasta el día 28.

35

40

Las puntuaciones clínicas se miden los días 0-5-8-9-12-14-16-19-21-23-26-28.

Durante todo el proceso se utiliza *software* Statistica (Statsoft Inc.) para el análisis estadístico. Para analizar la puntuación de enfermedad clínica se emplean análisis ANOVA y pruebas t de Student. $P < 0,05$ se considera significativo.

45

Se compararon los retrasos en la aparición de la enfermedad, la puntuación clínica y el retraso de la muerte entre cada grupo con el grupo "inmu" de referencia con curvas de Kaplan-Meier y un modelo Cox (paquete R "survival"). Los valores p resultantes son unilaterales y ensayan la hipótesis de que sea mejor que el grupo "inmu" de referencia.

La puntuación clínica total se compone de la puntuación de cola, la puntuación de extremidades posteriores, la puntuación de extremidades anteriores y la puntuación de vejiga como se describe a continuación:

ES 2 690 490 T3

Puntuación de cola:

Puntuación=0	Un ratón normal mantiene su cola erguida cuando se mueve.
Puntuación=1	Si el extremo de la cola está flácido con tendencia a caer.
Puntuación=2	Si la cola está completamente flácida y se arrastra sobre la mesa.

Puntuación de extremidades posteriores:

Puntuación=0	Un ratón normal camina con energía y no arrastra las patas
Puntuación=1	Cualquiera de las dos pruebas siguientes es positiva: A - Prueba de volteo: sujetando la cola entre el pulgar y el dedo índice, voltear el animal sobre su lomo y observar el tiempo que necesita para enderezarse. Un ratón sano se girará inmediatamente. Un retraso sugiere debilidad en las extremidades posteriores. B - Colocar el ratón sobre la parte superior de la jaula de alambre y observarlo mientras cruza de un lado a otro. Si una o ambas extremidades resbalan frecuentemente entre las barras, se considera que existe una parálisis parcial.
Puntuación=2	Las dos pruebas anteriores son positivas.
Puntuación=3	Una o ambas extremidades posteriores muestran signos de parálisis, pero se conservan algunos movimientos; por ejemplo: el animal puede agarrarse y sujetarse al lado inferior de la parte superior de la jaula de alambre durante un breve instante antes de soltarse.
Puntuación=4	Cuando ambas extremidades posteriores están paralizadas y el ratón las arrastra al moverse.

5 Puntuación de extremidades anteriores:

Puntuación=0	Un ratón normal utiliza sus patas delanteras activamente para agarrar y caminar y mantiene su cabeza erguida.
Puntuación=1	Caminar es posible, pero difícil debido a una debilidad en una o ambas patas, por ejemplo se considera que las patas delanteras están débiles cuando el ratón tiene dificultad para agarrarse al lado inferior de la parte superior de la jaula de alambre. Otro signo de debilidad es la cabeza gacha.
Puntuación=2	Cuando una extremidad anterior está paralizada (imposibilidad de agarrar y el ratón da vueltas alrededor de la extremidad paralizada). En este momento, la cabeza ha perdido también gran parte de su tono muscular.
Puntuación=3	El ratón no puede moverse y es incapaz de alcanzar la comida y el agua.

Puntuación de vejiga:

Puntuación=0	Un ratón normal tiene pleno control de su vejiga.
Puntuación=1	Se considera que un ratón es incontinente cuando la parte inferior de su cuerpo está empapada de orina.

10 La puntuación total para cada animal se determina mediante la suma de todas las categorías antes mencionadas. La puntuación máxima para animales vivos es de 10.

Resultados-las terapias combinadas son eficaces en un modelo de EM

En los ratones del "grupo EAE + tratamiento" se observa una mejora significativa de la puntuación clínica total, en particular para las combinaciones que figuran en la Tabla 9.

Combinación de fármacos	Mejora de la puntuación clínica total en animales con EAE
Baclofeno-torasemida	+
Baclofeno-acamprosato-torasemida	+
Mexiletina y cinacalcet	+
Sulfisoxazol y torasemida	+

II. Efecto protector de combinaciones en modelos de ELA

Se ensayan terapias combinadas según la presente invención *in vitro*, en un modelo de cocultivo, e *in vivo*, en un modelo de ratón de ELA. En esta sección se presentan los protocolos y resultados.

5 II.1 Efecto protector contra la toxicidad del glutamato en cultivos primarios de cocultivo de nervio y músculo

Cocultivos primarios de células nerviosas y musculares

Se prepara músculo humano según un método previamente descrito a partir de partes de biopsia de un paciente sano (44). Las células musculares se establecen a partir de células disociadas (10.000 células por pocillo), se extienden en placas de 48 pocillos revestidas con gelatina al 0,1 % y se cultivan en un medio de proliferación que consiste en una mezcla de medio MEM y medio M199.

Inmediatamente después de la fusión de células satélite se colocan sobre la monocapa de músculo, a 1 explante por pocillo (en la zona central), cortes transversales enteros de médulas espinales de embriones de ratas Wistar de 13 días de edad con ganglios de la raíz dorsal (DRG (por sus siglas en inglés)) unidos. Los DRG son necesarios para lograr una buena proporción de inervaciones. Los cultivos inervados se mantienen en medio mixto. Después de 24 h en el cocultivo usual, se observan neuritis surgiendo de los explantes de médula espinal, que entran en contacto con miotubos e inducen las primeras contracciones después de 8 días. Después, rápidamente, las fibras musculares inervadas situadas cerca de los explantes de médula espinal se contraen prácticamente de manera continua. Las fibras inervadas son morfológicamente y espacialmente distintas de las no inervadas y podían distinguirse fácilmente de las mismas.

20 Se realiza un cocultivo (6 pocillos por estado).

Lesión por glutamato

El día 27 se incuban cocultivos con compuestos candidatos o riluzol una hora antes de la intoxicación con glutamato (60 μ M) durante 20 min. Luego se lavan los cocultivos y se añaden compuestos candidatos o riluzol durante 48 h adicionales. Después de este tiempo de incubación se incuban los cocultivos sin fijar con α -bungarotoxina acoplada con Alexa 488 en una concentración de 500 nmoles/l durante 15 min. a temperatura ambiente. Luego se fijan los cocultivos mediante PFA durante 20 min. a temperatura ambiente. Después de una permeabilización con un 0,1 % de saponina, los cocultivos se incuban con anticuerpo antineurofilamentos (NF).

Estos anticuerpos se detectan con IgG de cabra antirratón Alexa Fluor 568 (sonda molecular). Los núcleos de las neuronas se marcan con un marcador fluorescente (solución Hoechst).

30 Los criterios de valoración son (1) longitud total de neuritas, (2) número de unidades motoras, (3) área total de unidades motoras, que son indicativos de la supervivencia y funcionalidad de las motoneuronas.

Para cada estado se toman 2 x 10 fotografías por pocillo utilizando InCell Analyzer™ 1000 (GE, Healthcare) con 20 aumentos. Todas las imágenes se toman en las mismas condiciones.

Resultados

35 Los fármacos de la invención protegen eficazmente las motoneuronas y las unidades motoras en el modelo de cocultivo. Además, se observa una mejora de la protección cuando los fármacos se utilizan en combinación para las combinaciones de fármacos que figuran en la tabla 10.

40

Tabla 10

Combinación de fármacos	Efecto protector contra la intoxicación por glutamato en cocultivos de músculo/nervio
Baclofeno-torasemida	+
Baclofeno-acamprosato-torasemida	+
Mexiletina y cinacalcet	+
Sulfisoxazol y torasemida	+

II.2 - Las terapias combinadas son eficaces en el modelo de ratón con ELA

5 Se llevan a cabo experimentos en ratones macho. En este conjunto de experimentos para reproducir la ELA se eligen ratones macho transgénicos B6SJL-Tg(SOD1)²Gur/J y su control (respectivamente SN2726 y SN2297 de Jackson Laboratories, Ben Harbor, EE.UU. y distribuidos por Charles River en Francia).

Los ratones enfermos expresan el transgén *SOD1-G93A*, diseñado con un gen *SOD1* humano mutante (una sola sustitución de aminoácido de glicina por alanina en el codón 93) conducido por su promotor de *SOD1* humano endógeno. Los ratones de control expresan el gen *SOD1* humano de control.

10 Administración de fármacos

Se administran a los ratones dosis con tratamiento de fármacos candidatos diluido en vehículo desde el día 60 después del nacimiento hasta la muerte. Las soluciones diluidas de fármacos candidatos se preparan con agua a temperatura ambiente justo antes de comenzar la administración.

- En agua potable:

15 Se añade riluzol en agua potable en una concentración final de 6 mg/ml (ajustada al peso corporal medio de cada grupo) en ciclodextrina al 5 %. Dado que un ratón bebe aproximadamente 5 ml/día, la dosis administrada estimada es de 30 mg/kg/día, que es una dosis que se ha demostrado que aumenta la supervivencia de los ratones.

- Se utiliza ciclodextrina como vehículo en la concentración final del 5 %, diluida en agua a temperatura ambiente a partir de una solución madre (ciclodextrina 20 %).

20 • Administración oral (*per os*):

- Se administran combinaciones de fármacos *per os*, diariamente.

- Se utiliza ciclodextrina como vehículo en la concentración final del 5 %, diluida en agua a temperatura ambiente a partir de una solución madre (ciclodextrina 20 %).

Observación clínica

25 La observación clínica de cada ratón se lleva a cabo diariamente, desde el primer día de tratamiento (60 días de edad) hasta la muerte (o el sacrificio). La observación clínica consiste en estudiar ensayos conductuales: inicio de parálisis, "pérdida de extensión", "pérdida de reflejo de enderezamiento" y observación de la marcha general:

- Inicio de parálisis: La observación consiste en la observación de la parálisis de cada extremidad. El inicio de la parálisis corresponde al día de los primeros signos de parálisis.

30 - El ensayo de pérdida de extensión consiste en una notificación de temblores o sacudidas y la posición de las extremidades posteriores (colgantes o extendidas hacia fuera) cuando el ratón está suspendido de la cola.

- El ensayo de pérdida de reflejo de enderezamiento evalúa la capacidad del ratón para enderezarse en un plazo de 30 segundos después de ser girado hacia cada lado. El reflejo de enderezamiento se ha perdido cuando el ratón es incapaz de enderezarse. La pérdida de reflejo de enderezamiento determina el estadio final de la enfermedad: si el ratón es incapaz de enderezarse se le aplica la eutanasia.

35 Resultados-Las terapias combinadas son eficaces en un modelo *in vivo* de ELA

En los animales enfermos tratados con los fármacos y las combinaciones de fármacos de la invención se observa una mejoría de la enfermedad. En particular, las combinaciones de fármacos que figuran en la Tabla 11 mejoran eficazmente la puntuación clínica de estos animales durante los diferentes estadios de la enfermedad.

Tabla 11:

Combinación de fármacos	Efecto en la puntuación clínica en animales enfermos
Baclofeno-torasemida	+
Baclofeno-acamprosato-torasemida	+
Mexiletina y cinacalcet	+
Sulfisoxazol y torasemida	+

III) Efecto protector de combinaciones de la invención en neuropatía inducida por oxaliplatino como modelo *in vivo* del dolor neuropático

- 5 Se ensayan *in vivo* terapias combinadas de la presente invención, en modelos adecuados de neuropatía periférica, es decir el modelo agudo de neuropatía inducida por oxaliplatino y el modelo crónico de neuropatía inducida por oxaliplatino. En esta sección se presentan los animales, protocolos y resultados.

Cría de animales

- 10 En la parte experimental del tratamiento con oxaliplatino (D₀) se utilizan ratas Sprague-Dawley (CERJ, Francia) con un peso de 150 - 175 g. Los animales están guardados en una instalación para animales de acceso limitado en una sala con control de temperatura (19,5 °C - 24,5 °C) y humedad relativa (45 % - 65 %), con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad, con acceso *ad libitum* a comida de laboratorio granulada estándar y agua durante todo el estudio. Los animales están guardados en un número de 4 o 5 por jaula, y antes de cualquier ensayo se observa un periodo de aclimatación de una semana.

- 15 Diseño experimental

En todos los experimentos se utilizan los cuatro grupos siguientes de ratas:

Grupos de control:

Grupo 1: vehículo de oxaliplatino (agua destilada), i.p. / vehículo de combinación o combinaciones candidatas (agua destilada), p.o. diariamente.

- 20 Grupo 2: oxaliplatino (agua destilada), i.p. / vehículo de combinación o combinaciones candidatas (agua destilada), p.o. diariamente.

Grupo 3: oxaliplatino 3 mg/kg i.p. / un solo fármaco en agua destilada, p.o. diariamente x 9.

Grupos de composición ensayados:

Grupo 4: oxaliplatino 3 mg/kg i.p. / combinación o combinaciones candidatas en agua destilada, p.o. diariamente x 9.

- 25 Grupo 5: oxaliplatino 3 mg/kg i.p. / gabapentina (100 mg/kg) en agua destilada, p.o. los días de ensayo (es decir D₁ y D₈).

El vehículo y los elementos ensayados se suministran diariamente desde el D-1 hasta el D7 (el día antes del último día de ensayo), mientras que la gabapentina se administra los días de ensayo (120 minutos antes del ensayo).

- 30 Todos los tratamientos se administran en un orden codificado y aleatorio cuando es posible. Las dosis se expresan en términos de sustancia activa libre.

Inducción de neuropatía

La neuropatía aguda se induce mediante una sola inyección intraperitoneal de oxaliplatino (3 mg/kg).

- 35 La neuropatía periférica crónica se induce mediante inyecciones intraperitoneales repetidas de oxaliplatino (3 mg/kg, i.p.) los días 0, 2, 4 y 7 (CD = 12 mg/kg, i.p.). La neuropatía crónica en humanos es acumulativa también y se observa más frecuentemente en pacientes que han recibido dosis totales de oxaliplatino > o = 540 mg/m², lo que corresponde a ~15 mg/kg como dosis acumulativa en ratas (Cersosimo R.J. 2005).

La neuropatía dolorosa inducida por oxaliplatino en ratas reproduce los síntomas de dolor en pacientes tratados con oxaliplatino:

- La hiperalgesia térmica es el primer síntoma. Puede medirse con la prueba de la acetona o con la prueba de inmersión de la cola.
- La hiperalgesia mecánica aparece más tarde. Puede cuantificarse con la prueba de Von Frey o la prueba de presión en la pata.

5 Dosificación a animales y ensayos

Todas las combinaciones de fármacos se administran desde el día antes de la primera inyección intraperitoneal de oxaliplatino 3 mg/kg (D-1) y se continúan diariamente por vía oral hasta el D7. Durante los días de ensayo (es decir D1 y D7), las combinaciones de fármacos se administran después del ensayo. Los animales del grupo tratado con referencia (gabapentina) reciben dosis sólo durante los días de ensayo.

10 Prueba de la acetona

Se evalúa la alodinia por frío utilizando la prueba de la acetona midiendo las respuestas a una estimulación térmica no nociceptiva el D1 (alrededor de 24 h después de la primera inyección de oxaliplatino 3 mg/kg (efecto agudo de oxaliplatino)) y el D8 (efecto crónico de oxaliplatino).

15 En la prueba de la acetona se mide la latencia de retirada de la pata trasera después de la aplicación de una gota de acetona a la superficie plantar de ambas patas traseras (tiempo de reacción) y se puntúa la intensidad de la respuesta (puntuación para frío). El tiempo de reacción al efecto de enfriamiento de la acetona se mide en un plazo de 20 segundos (límite) después de la aplicación de acetona. Las respuestas a la acetona se clasifican también con respecto a la siguiente escala de 4 puntos: 0 (sin respuesta); 1 (retirada rápida, movimiento rápido de la pata); 2 (retirada prolongada o movimiento rápido marcado de la pata); 3 (movimiento rápido repetido de la pata con lamedura o mordedura).

20 Para cada grupo experimental, los resultados se expresan como:

- El tiempo de reacción definido como el tiempo expresado en segundos necesario para provocar una reacción de la pata (media de 6 mediciones para cada rata juntas \pm EEM).

25 - La puntuación para frío acumulativa definida como la suma de las 6 puntuaciones de cada rata juntas \pm EEM. La puntuación mínima es 0 (sin respuesta a ninguno de los 6 experimentos) y la puntuación máxima posible es 18 (movimiento rápido repetido y lamedura o mordedura de patas en cada uno de los seis experimentos).

Análisis estadísticos

30 Se lleva a cabo una prueba de Student, unilateral, tipo 3. El nivel de significación se ajusta como $p < 0,05$; todos los grupos se comparan con el grupo enfermo+vehículo (grupo tratado con oxaliplatino). En las figuras se muestran las medias y el error estándar de la media.

Resultados

35 El oxaliplatino induce una disminución significativa en el tiempo de reacción de retirada de la pata después de la aplicación de acetona (grupo enfermo + vehículo) en el transcurso del tiempo. Esta disminución es progresiva y significativa desde el día 1 (modelo agudo de neuropatía inducida por oxaliplatino) hasta el día 8 (modelo crónico), en comparación con el grupo de vehículo.

- Efecto antialodínico en el modelo agudo de neuropatía inducida por oxaliplatino

40 Las combinaciones de fármacos ensayadas en el modelo agudo de neuropatía inducida por oxaliplatino se evalúan con la prueba de la acetona. La Tabla 12 presenta combinaciones de fármacos (Grupo 4) que inducen una disminución significativa en la puntuación para frío acumulativa y un aumento significativo del tiempo de reacción, en comparación con el grupo tratado con oxaliplatino-vehículo (Grupo 2). En conclusión, estas combinaciones de fármacos protegen a los animales contra la neuropatía aguda inducida por oxaliplatino.

Tabla 12

Combinaciones de fármacos ensayadas en modelo agudo de neuropatía (Grupo 4)	Variación de la puntuación para frío en comparación con el Grupo 2	Tiempo de reacción en comparación con el Grupo 2	Efecto antialodínico
. Baclofeno-torasemida	disminución	aumento	+
. Baclofeno-acamprosato-torasemida	disminución	aumento	+
. Mexiletina y cinacalcet	disminución	aumento	+
. Sulfisoxazol y torasemida	disminución	aumento	+

+ = efecto antialodínico obtenido en el Grupo 4 de ratas, después de análisis de las puntuaciones para frío acumulativas y análisis del tiempo de reacción en pruebas de la acetona, en el modelo agudo inducido por oxaliplatino.

5

- Efecto antialodínico en el modelo crónico de neuropatía inducida por oxaliplatino

Las combinaciones de fármacos utilizadas en el modelo crónico de neuropatía inducida por oxaliplatino se evalúan con la prueba de la acetona.

10

La Tabla 13 presenta combinaciones de fármacos para las cuales el tiempo de reacción y la puntuación para frío en la prueba de la acetona medidos en el Grupo 4 (animales tratados con combinaciones de fármacos y oxaliplatino) están respectivamente aumentado y disminuida de forma significativa después del tratamiento en el modelo crónico de neuropatía, en comparación con el grupo tratado con oxaliplatino-vehículo (Grupo 2). En conclusión, estas combinaciones de fármacos protegen a los animales contra la neuropatía crónica inducida por oxaliplatino.

Tabla 13

Combinaciones de fármacos ensayadas en modelo crónico de neuropatía (Grupo 4)	Variación de la puntuación para frío en comparación con el Grupo 2	Tiempo de reacción en comparación con el Grupo 2	Efecto antialodínico
Baclofeno-torasemida	disminución	aumento	+
Baclofeno-acamprosato-torasemida	disminución	aumento	+
Mexiletina y cinacalcet	disminución	aumento	+
Sulfisoxazol y torasemida	disminución	aumento	+

15

+ = efecto antialodínico obtenido en el Grupo 4 de ratas, después de análisis de las puntuaciones para frío acumulativas y análisis del tiempo de reacción en pruebas de la acetona, en el modelo crónico inducido por oxaliplatino.

Referencias

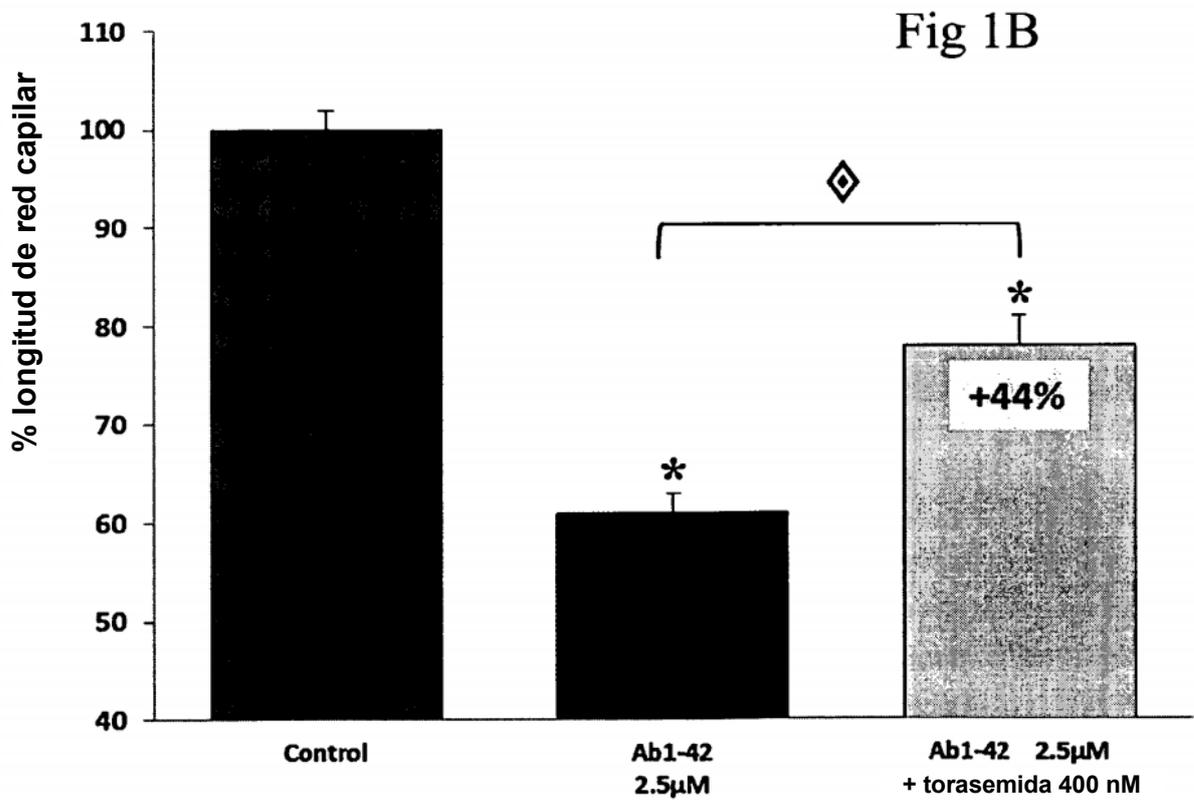
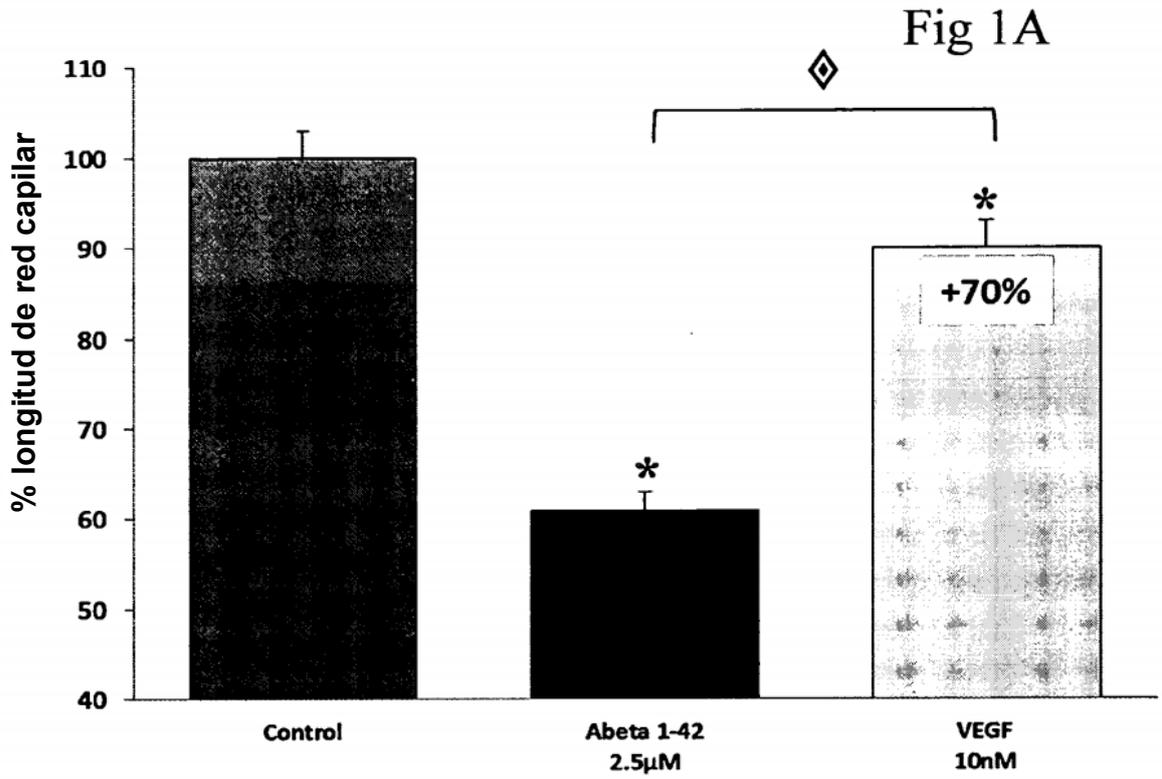
1. Crook R. et al. (1998). A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med.* 4(4): 452-5.
- 5 2. Houlden H., Baker M., et al. (2000). Variant Alzheimer's disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques is caused by PS-1 mutations that lead to exceptionally high amyloid-beta concentrations. *Ann Neurol.* 48(5): 806-8.
3. Kwok J.B., Taddei K., et al. (1997). Two novel presenilin-1 mutations in early-onset Alzheimer's disease pedigrees and preliminary evidence for association of presenilin-1 mutations with a novel phenotype. *Neuroreport.* 8(6): 1537-42.
- 10 4. Verkkoniemi A., Kalimo H., et al. (2001). Variant Alzheimer disease with spastic paraparesis: neuropathological phenotype. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60(5): 483-92.
- 5 5. Citron M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5(9): 677-85.
6. Suh Y.H. and Checler F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev.* 54(3): 469-525.
- 15 7. Glenner G.G., Wong C.W., et al. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol.* 2(6): 357-69.
8. Ballatore C., Lee V.M., et al. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8(9): 663-72.
9. Bell K.F. and Claudio Cuello A. (2006). Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 545(1): 11-21.
- 20 10. Hardy J.A. and Higgins G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256(5054): 184-5.
11. Braak H. and Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82(4): 239-59.
- 25 12. Golde T.E. (2005). The Abeta hypothesis: leading us to rationally-designed therapeutic strategies for the treatment or prevention of Alzheimer disease. *Brain Pathol.* 15(1): 84-7.
13. Hardy J. and Selkoe D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297(5580): 353-6.
14. Selkoe D.J. (2000). The genetics and molecular pathology of Alzheimer's disease: roles of amyloid and the presenilins. *Neurol Clin.* 18(4): 903-22.
- 30 15. Zlokovic B. V., The Blood Brain Barrier In Health And Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron review.* 2008, 57, 178-201.
16. Budd Haeberlein, S.L. and S.A. Lipton, Excitotoxicity in neurodegenerative disease, in *Encyclopedia of neuroscience*, L.R. Squire, Editor. 2009, Elsevier. p. 77-86.
17. Hughes, J.R., Alcohol withdrawal seizures. *Epilepsy Behav.* 2009. 15(2): p. 92-7.
- 35 18. Kim, A.H., G.A. Kerchner, and C. DW, Blocking Excitotoxicity, in *CNS Neuroprotection*, F.W. Marcoux and D.W. Choi, Editors. 2002, Springer: New York. p. 3-36.
19. Hama A, Sagen J., Antinociceptive effect of riluzole in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *J Neurotrauma.* 2011 Jan;28(1):127-34.
- 40 20. Lees, K.R., et al., Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection (GAIN International) in patients with acute stroke: a randomised controlled trial. *GAIN International Investigators. Lancet.* 2000. 355(9219): p. 1949-54.
21. Malgouris, C., et al., Riluzole, a novel antiglutamate, prevents memory loss and hippocampal neuronal damage in ischemic gerbils. *J Neurosci.* 1989. 9(11): p. 3720-7.
22. Wahl, F., et al., Effect of riluzole on focal cerebral ischemia in rats. *Eur J Pharmacol.* 1993. 230(2): p. 209-14.
- 45 23. Wahl, F., et al., Riluzole reduces brain lesions and improves neurological function in rats after a traumatic brain injury. *Brain Res.* 1997. 756(1-2): p. 247-55.

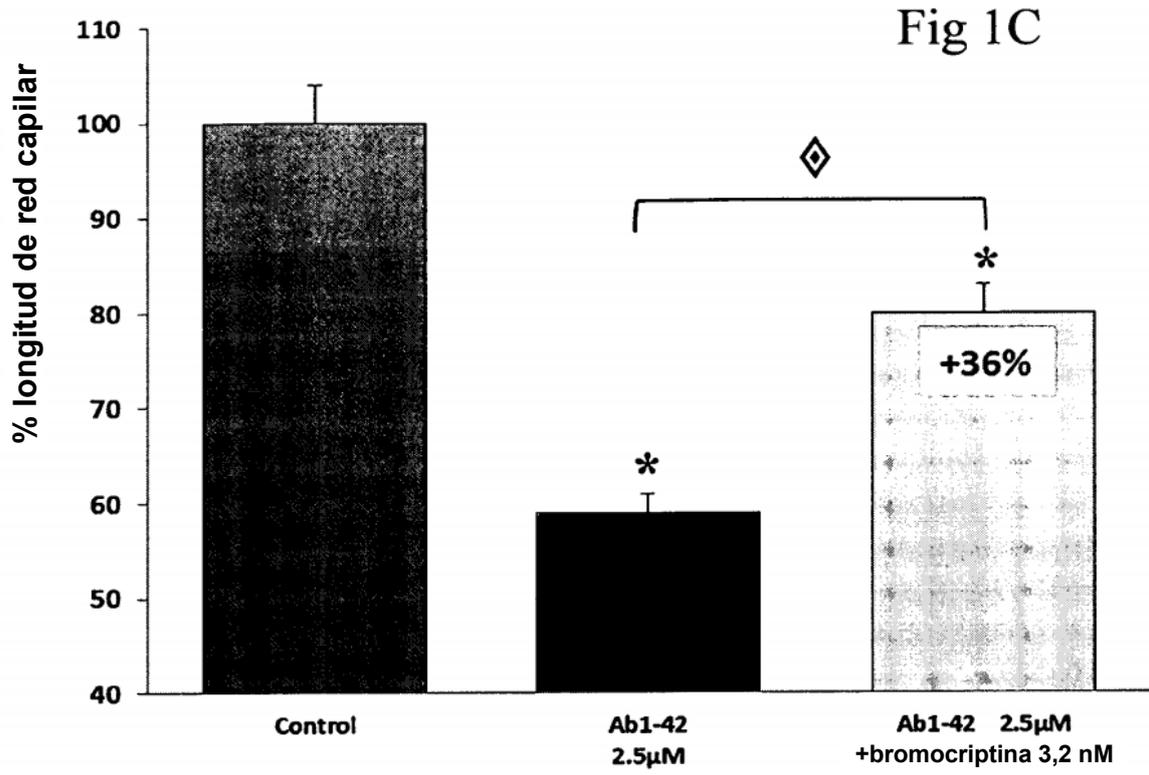
24. Etmayer, P., Amidon, G. L., Clement, B. & Testa, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.* 47, 2393-2404 (2004).
25. Beaumont, K., Webster, R., Gardner, I. & Dack, K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr. Drug Metab.* 4, 461-485 (2003).
- 5 26. Heimbach, T. et al. Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *Int. J. Pharm.* 261, 81-92 (2003).
27. Yang, C. Y., Dantzig, A. H. & Pidgeon, C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm. Res.* 16, 1331-1343 (1999).
- 10 28. Steffansen, B. et al. Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 3-16 (2004).
29. Stella, V. et al. *Prodrugs: Challenges and Rewards* (AAPS, New York, 2007).
30. Wermuth, CG. *The Practice of Medicinal Chemistry*. (Hardbound, 2003). Part VI, Chap 33: Designing prodrugs and bioprecursors.
31. Pezron, I. et al. Prodrug strategies in nasal drug delivery. *Expert Opin. Ther. Pat.*, Vol. 12, No. 3, 331-340 (2002).
- 15 32. Stella, V. J. Prodrugs as therapeutics. *Expert Opin. Ther. Pat.* 14, 277-280 (2004).
33. Stella, V. J. & Nti-Addae, K. W. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 677-694 (2007).
34. Higuchi, T.; Stella, V. eds. *Prodrugs As Novel Drug Delivery Systems*. ACS Symposium Series. American Chemical Society: Washington, DC (1975). 31.
- 20 35. Roche, E. B. *Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs*. American Pharmaceutical Association: Washington, DC (1977).
36. Lal, R., et al., 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): p. 911-21.
37. Andrew R. Leach, Valerie J. Gillet. *An Introduction to Chemoinformatics*. Springer 2007.
- 25 38. S. Asad Rahman, M. Bashton, G. L. Holliday, R. Schrader and J. M. Thornton: Small Molecule Subgraph Detector (SMSD) Toolkit, *Journal of Cheminformatics* 2009, 1:12 doi:10.1186/1758-2946-1-12
39. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, Gautam B, Hassanali M. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res.* 36, Issuesuppl 1. D901-D906 (2008).
- 30 40. Stahl H., Wermuth C. G. (Eds.) *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*. Wiley-VCH; 2 edition (March 29, 2011).
41. 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. 56(3): p.569-76.
- 35 42. Singer C., Figueroa-Masot X., Batchelor R., and Dorsa D. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neuroscience*, 1999. 19(7):2455-2463.
43. 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.)
- 40 44. Braun S, Croizatb B, Lagrangec MC, Wartera JM, Poindron P. Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord-human muscle cocultures. Volume 136, Issues 1-2, March 1996, Pages 17-23.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende torasemida, o una sal o una formulación de liberación sostenida de la misma, para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA) o un trastorno afín a la EA seleccionado entre demencia senil de tipo EA (DSTA), demencia con cuerpos de Lewy, demencia vascular, deterioro cognitivo leve (DCL) y deterioro de la memoria asociado a la edad (DMAE), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o lesiones de la médula espinal (LME) en un individuo que lo necesite.
2. La composición para el uso según la reivindicación 1, que además comprende al menos un compuesto seleccionado entre sulfisoxazol, metimazol, prilocaína, difilina, quinacrina, carbenoxolona, acamprosato, ácido aminocaproico, baclofeno, cabergolina, dietilcarbamazina, cinacalcet, cinarizina, eplerenona, fenoldopam, leflunomida, levosimendán, sulodexida, terbinafina, zonisamida, etomidato, fenformina, trimetazidina, mexiletina, ifenprodil, moxifloxacina o bromocriptina, o una sal o una formulación de liberación sostenida de los mismos.
3. La composición para el uso según la reivindicación 2, comprendiendo dicha composición al menos una de las siguientes combinaciones de compuestos:
- baclofeno y torasemida,
 - sulfisoxazol y torasemida,
 - eplerenona y torasemida,
 - terbinafina y torasemida,
 - baclofeno y trimetazidina y torasemida,
 - baclofeno y cinacalcet y torasemida,
 - baclofeno y acamprosato y torasemida,
 - sulfisoxazol y trimetazidina y torasemida y zonisamida,
 - sulfisoxazol y mexiletina y torasemida y cinacalcet,
 - baclofeno y acamprosato y torasemida y dietilcarbamazina, o
 - baclofeno y acamprosato y torasemida e ifenprodil,
 - o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.
4. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
5. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los compuestos de dicha composición se formulan o se administran juntos, por separado o secuencialmente.
6. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, administrándose dicha composición repetidamente al individuo.
7. Una composición que comprende torasemida o una sal o una formulación de liberación sostenida de la misma, en combinación con al menos un segundo compuesto seleccionado entre sulfisoxazol, metimazol, prilocaína, difilina, quinacrina, carbenoxolona, acamprosato, ácido aminocaproico, baclofeno, cabergolina, dietilcarbamazina, cinacalcet, cinarizina, eplerenona, fenoldopam, leflunomida, sulodexida, terbinafina, zonisamida, etomidato, fenformina, trimetazidina, mexiletina, bromocriptina, ifenprodil y moxifloxacina, una o varias sales o una o varias formulaciones de liberación sostenida de los mismos, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para la administración simultánea, separada o secuencial.
8. La composición según la reivindicación 7, comprendiendo dicha composición al menos una de las siguientes combinaciones de compuestos:
- baclofeno y torasemida,
 - sulfisoxazol y torasemida,
 - eplerenona y torasemida,
 - terbinafina y torasemida,
 - baclofeno y trimetazidina y torasemida,

- baclofeno y cinacalcet y torasemida,
 - baclofeno y acamprosato y torasemida,
 - sulfisoxazol y trimetazidina y torasemida y zonisamida,
 - sulfisoxazol y mexiletina y torasemida y cinacalcet,
- 5
- baclofeno y acamprosato y torasemida y dietilcarbamazina, o
 - baclofeno y acamprosato y torasemida e ifenprodil.
9. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tratamiento incluye proteger células neuronales en dicho individuo.
- 10
10. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tratamiento incluye proteger células endoteliales microvasculares de cerebro humano contra la toxicidad del beta amiloide 1-42 en dicho individuo.
11. La composición para el uso según la reivindicación 10, que además comprende un compuesto seleccionado entre baclofeno, sulfisoxazol, eplerenona o terbinafina, o una sal o una formulación de liberación sostenida de los mismos.
- 15
12. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tratamiento incluye proteger el crecimiento de neuritas de neuronas corticales contra la toxicidad del beta amiloide 1-42 en dicho individuo.
13. La composición para el uso según la reivindicación 12, en donde el individuo padece una lesión de la médula espinal (LME).
- 20
14. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el tratamiento incluye proteger neuronas corticales contra la toxicidad del glutamato en dicho individuo.
15. La composición para el uso según la reivindicación 14, que además comprende baclofeno o sulfisoxazol; o baclofeno y acamprosato, o sales o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.
16. La composición para el uso según la reivindicación 14 o 15, en donde el individuo padece EA, ELA o LME.
- 25





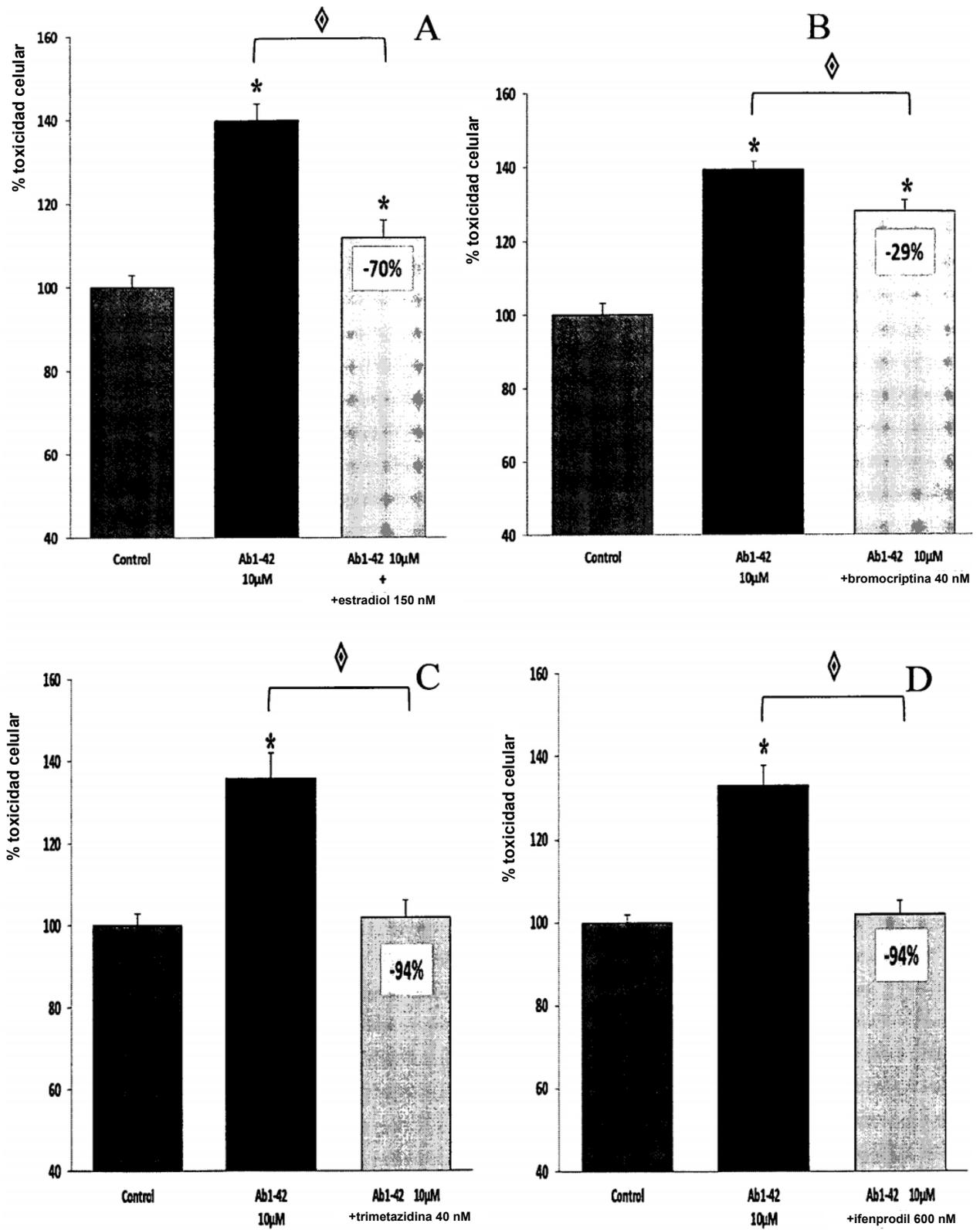


FIGURA 2

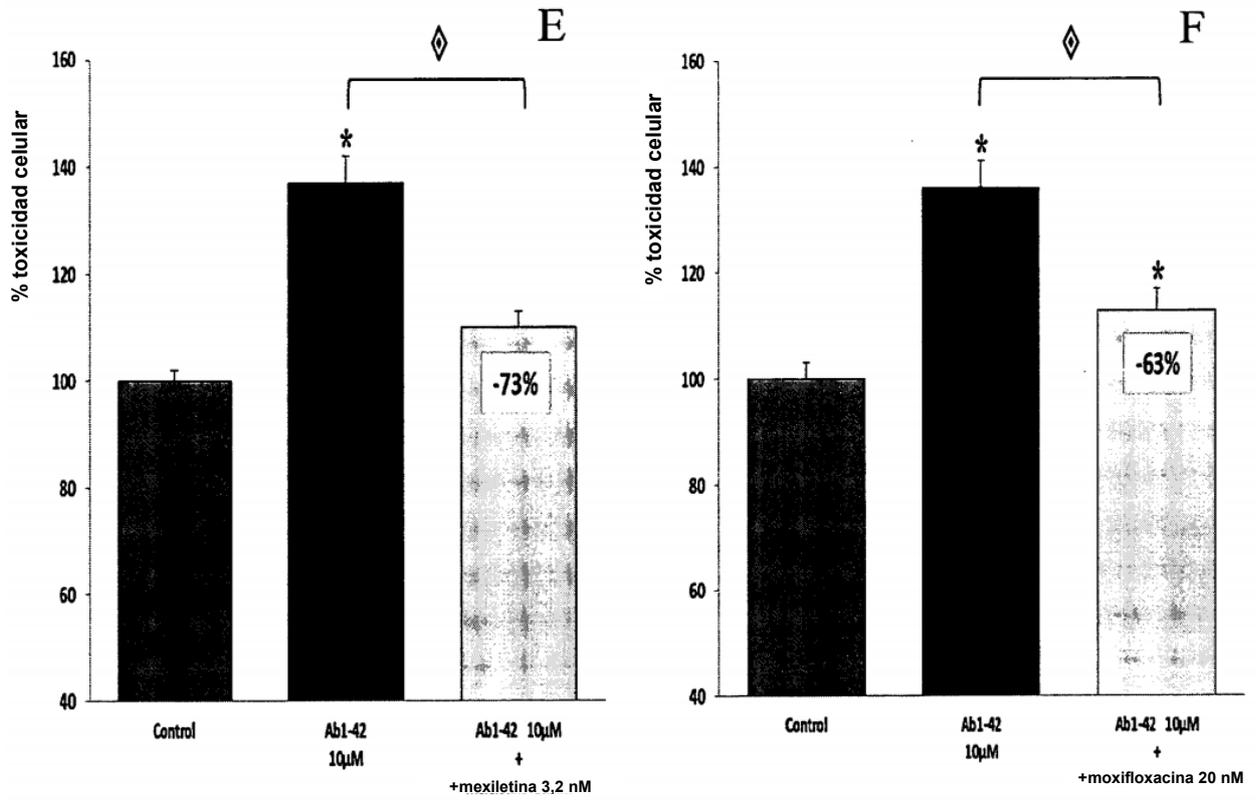


FIGURA 2

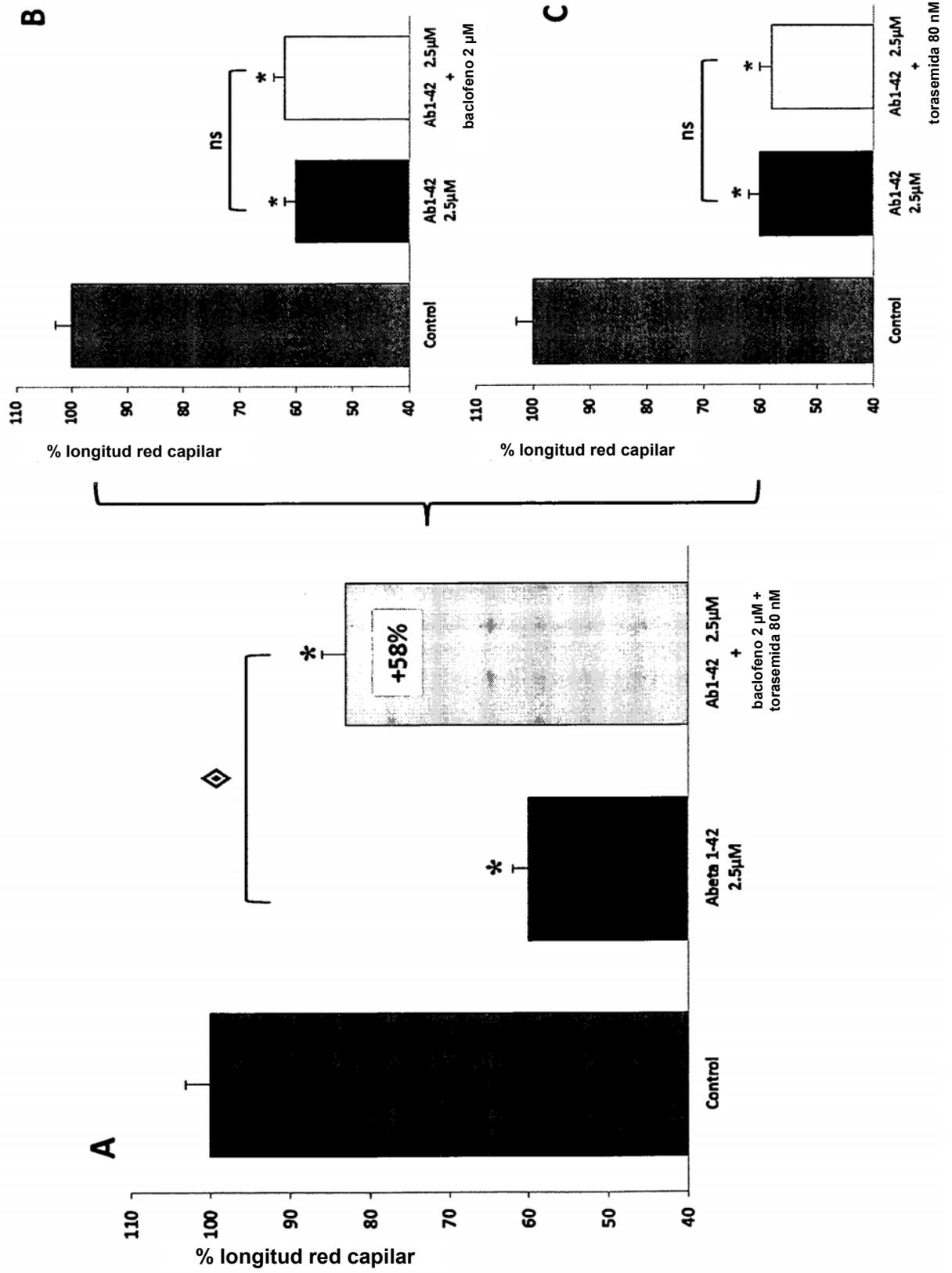


FIGURA 3

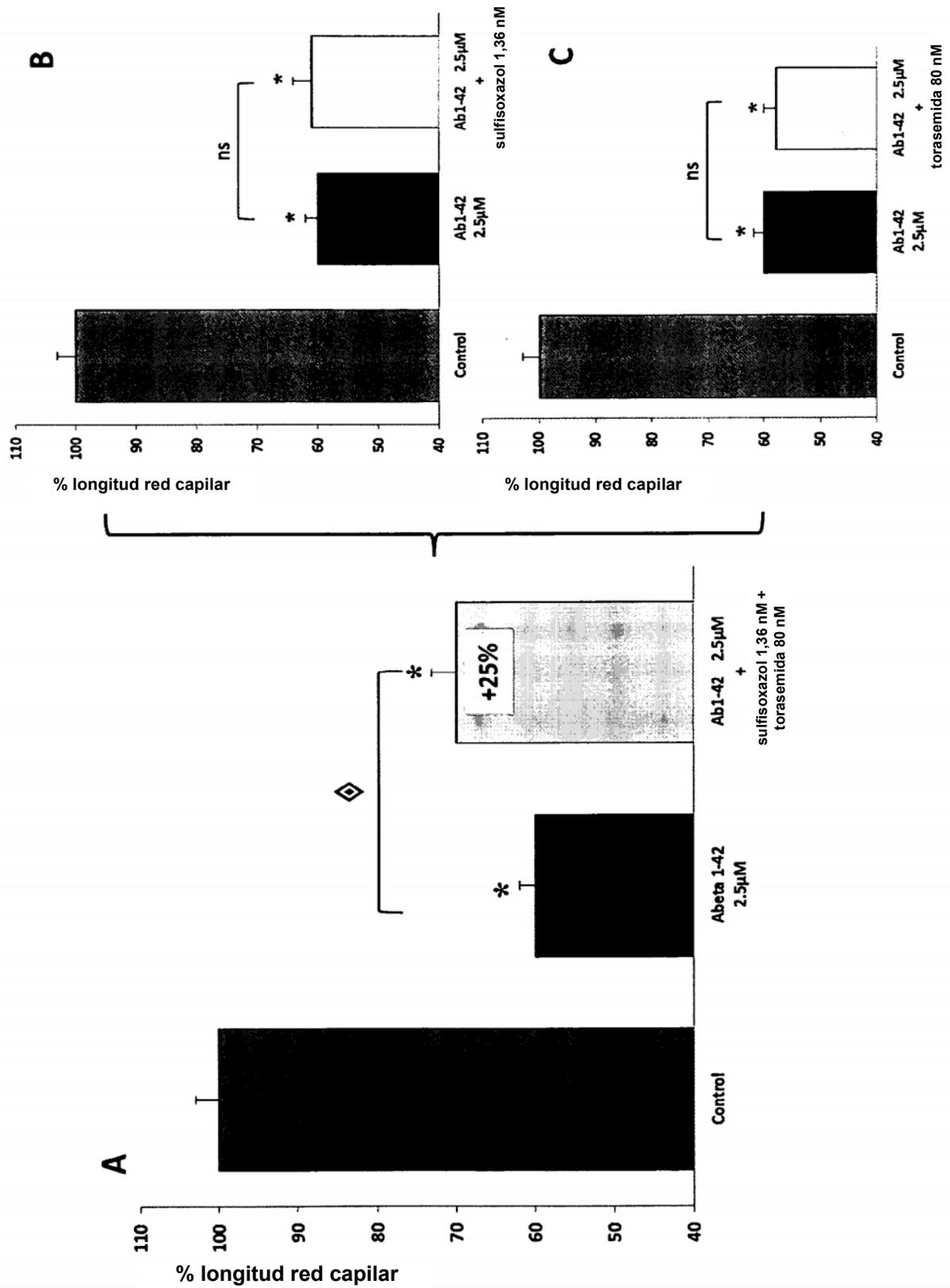


FIGURA 4

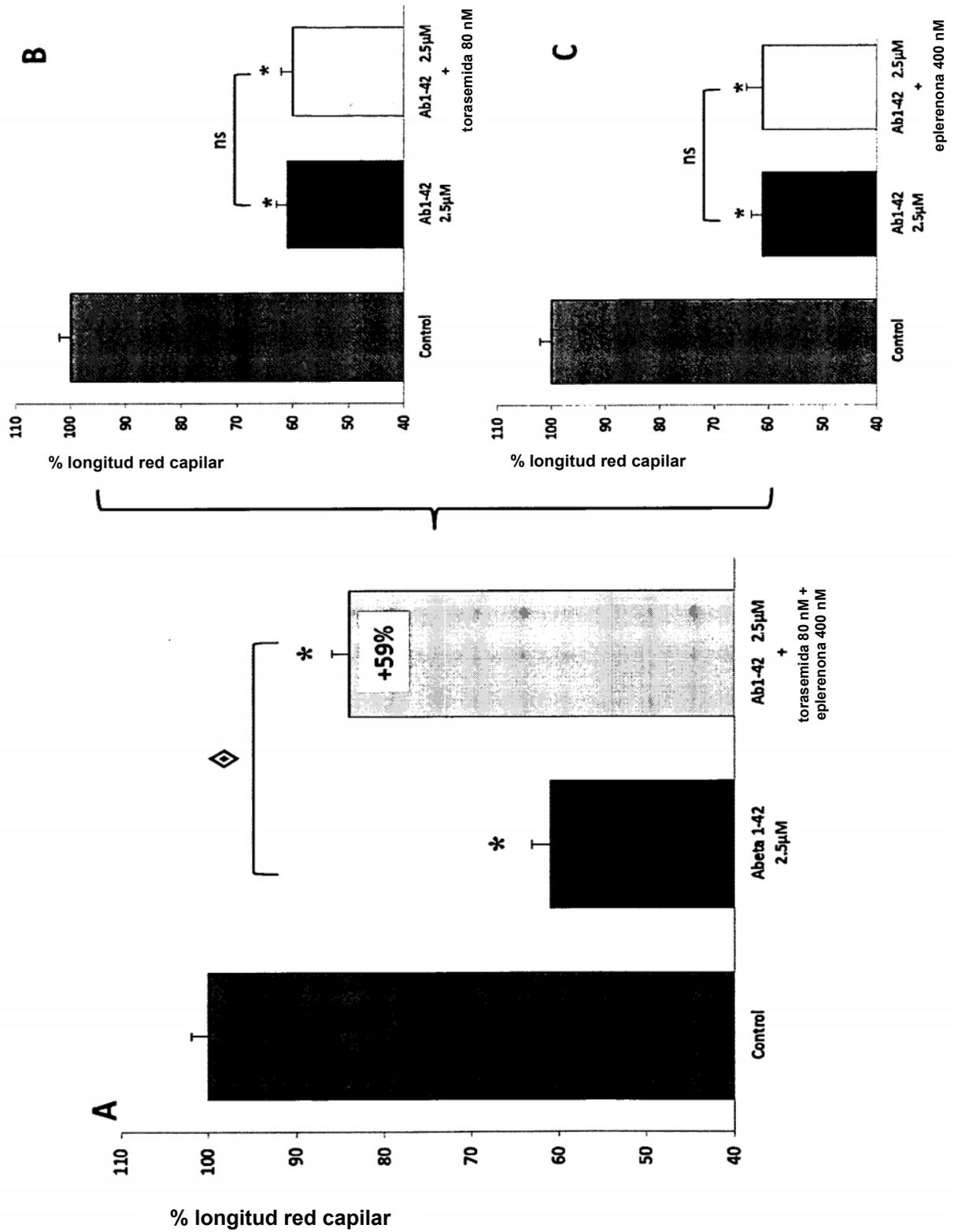


FIGURA 5

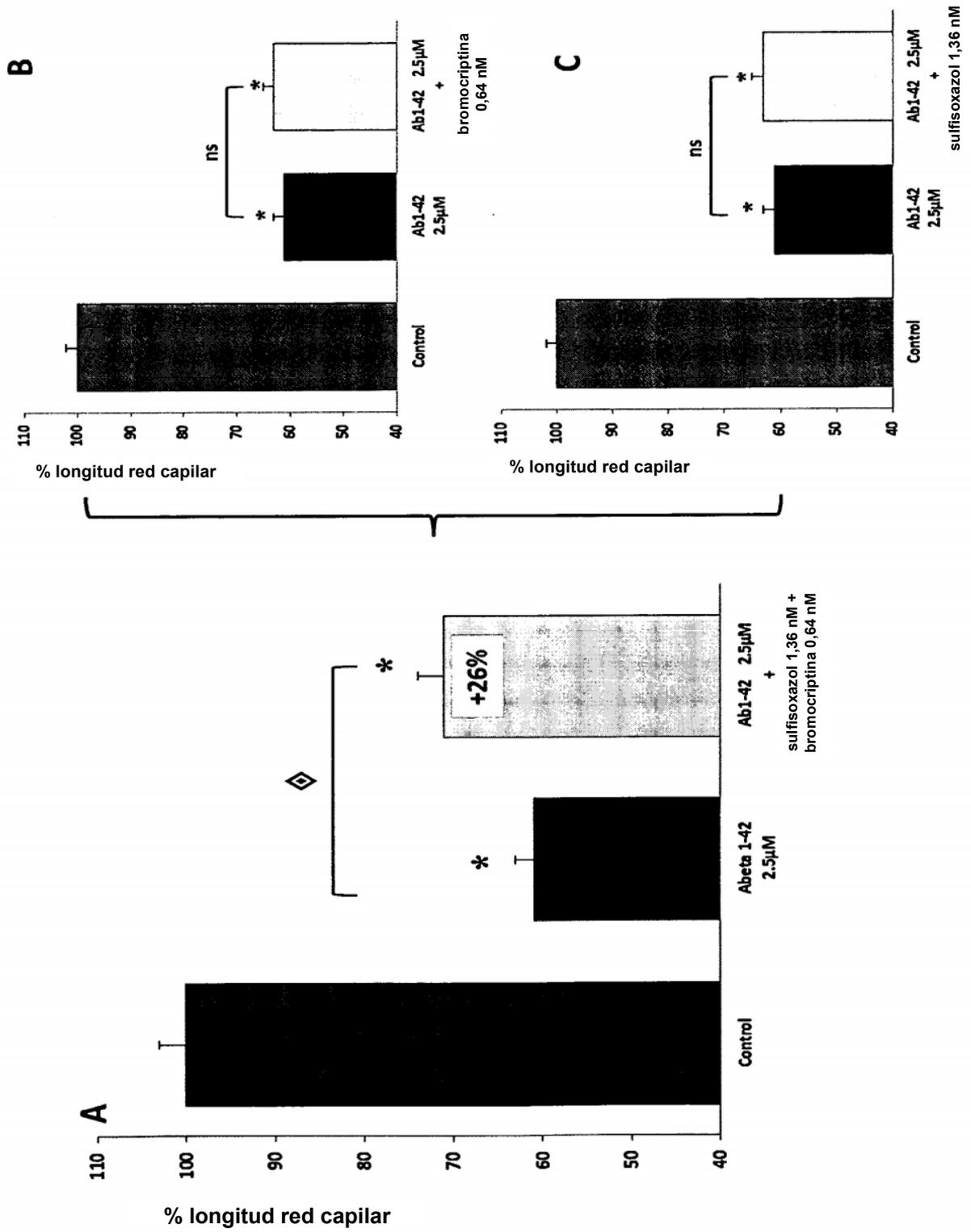


FIGURA 6

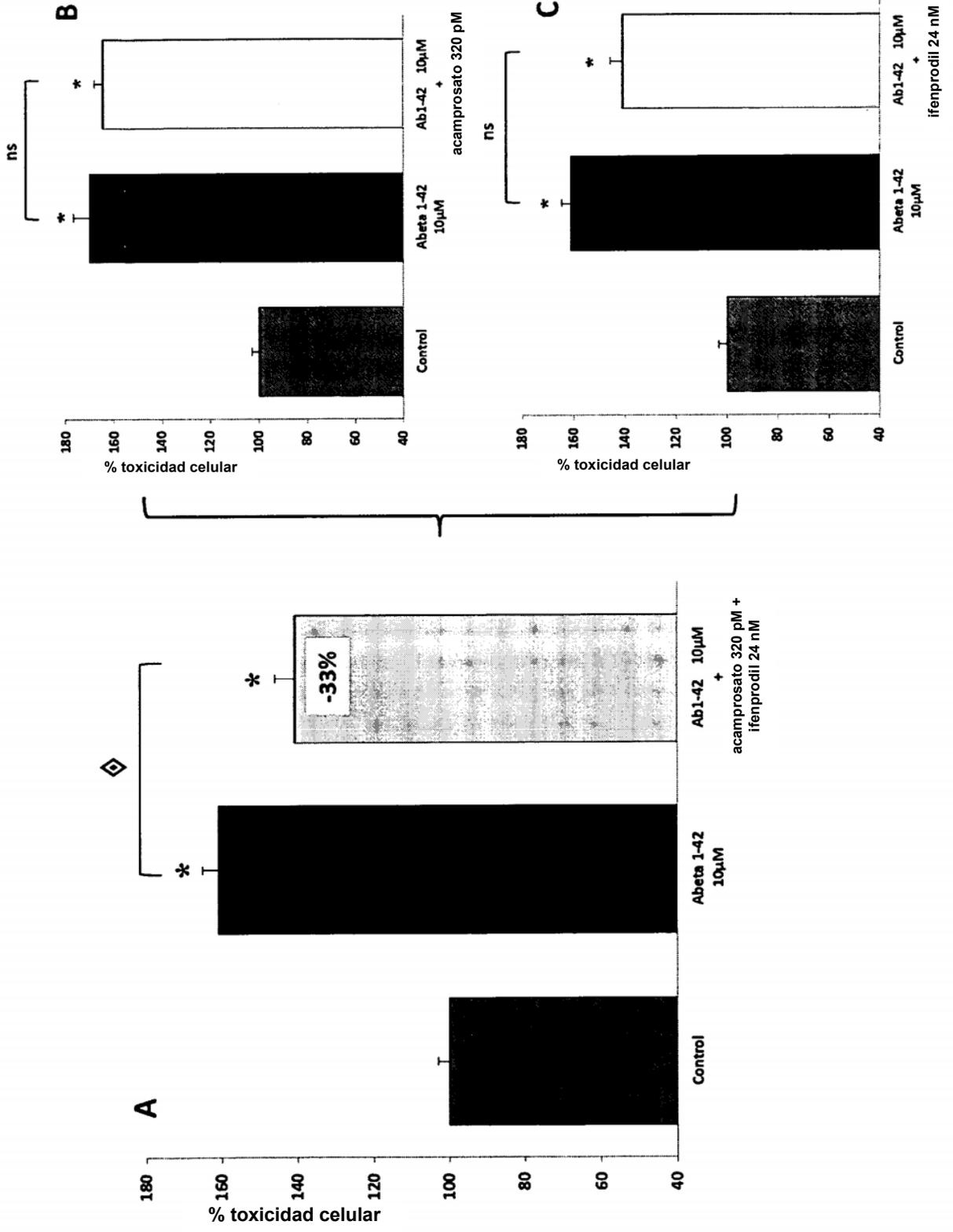


FIGURA 7

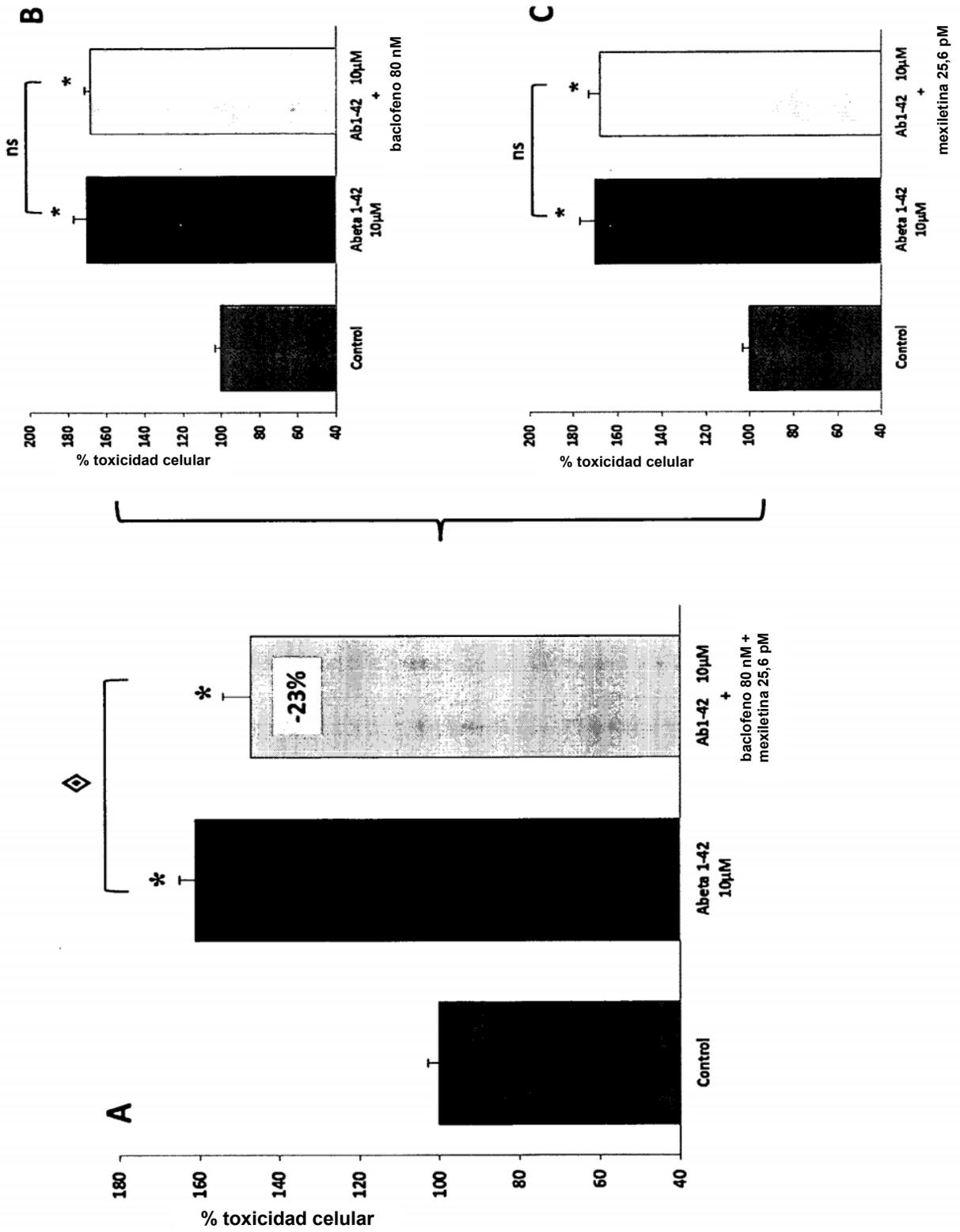


FIGURA 8

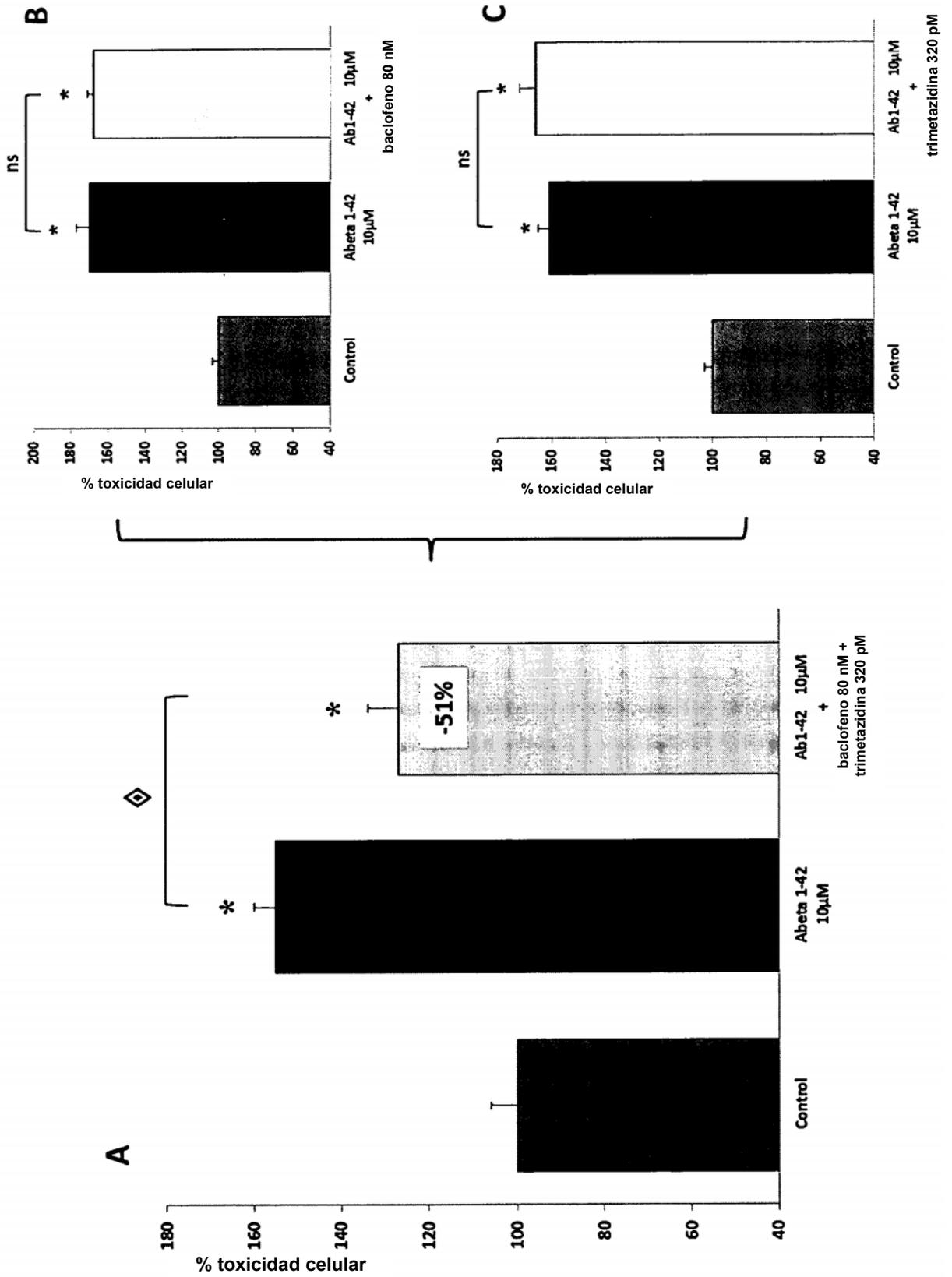


FIGURA 9

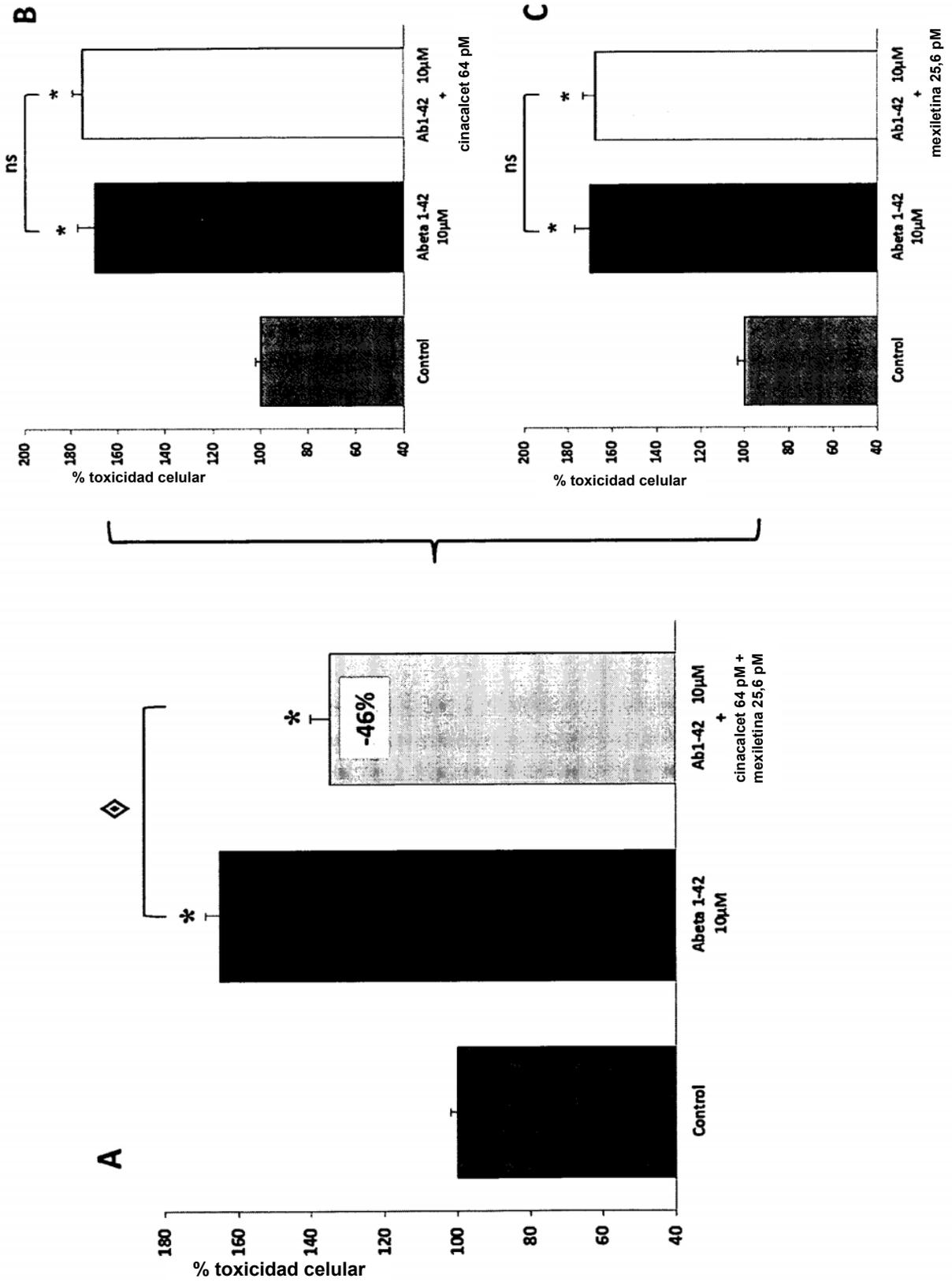


FIGURA 10

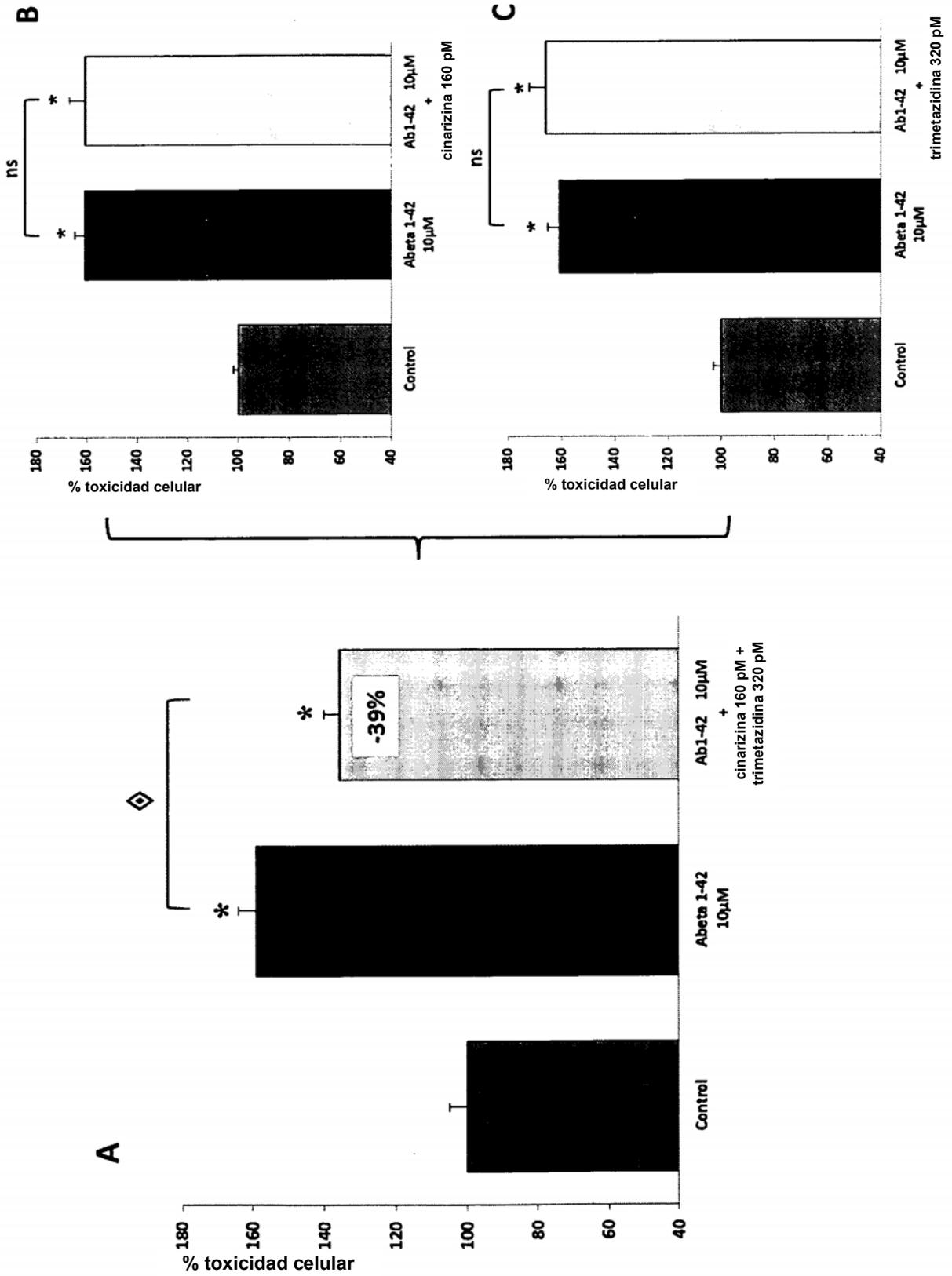


FIGURA 11

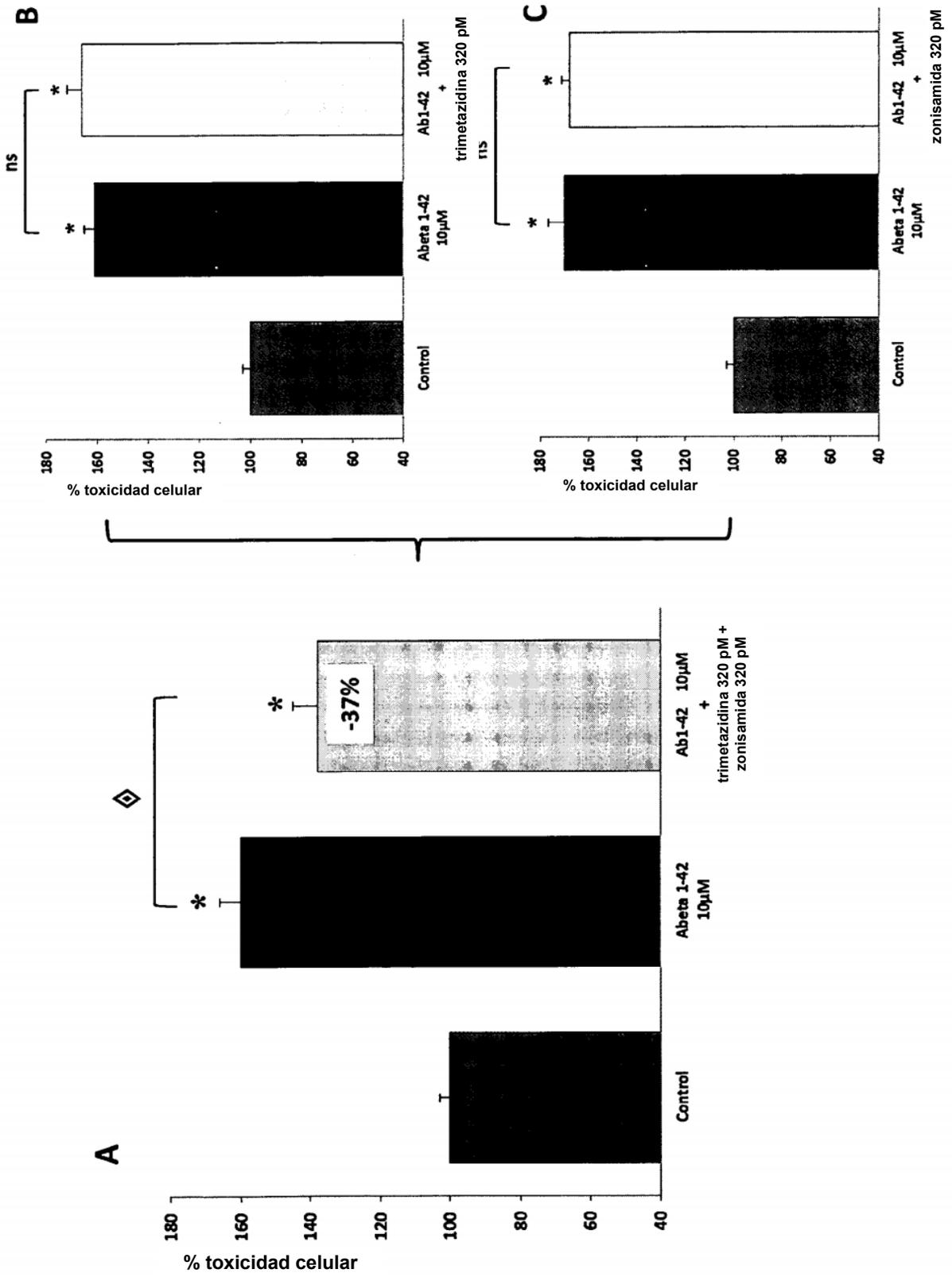


FIGURA 12

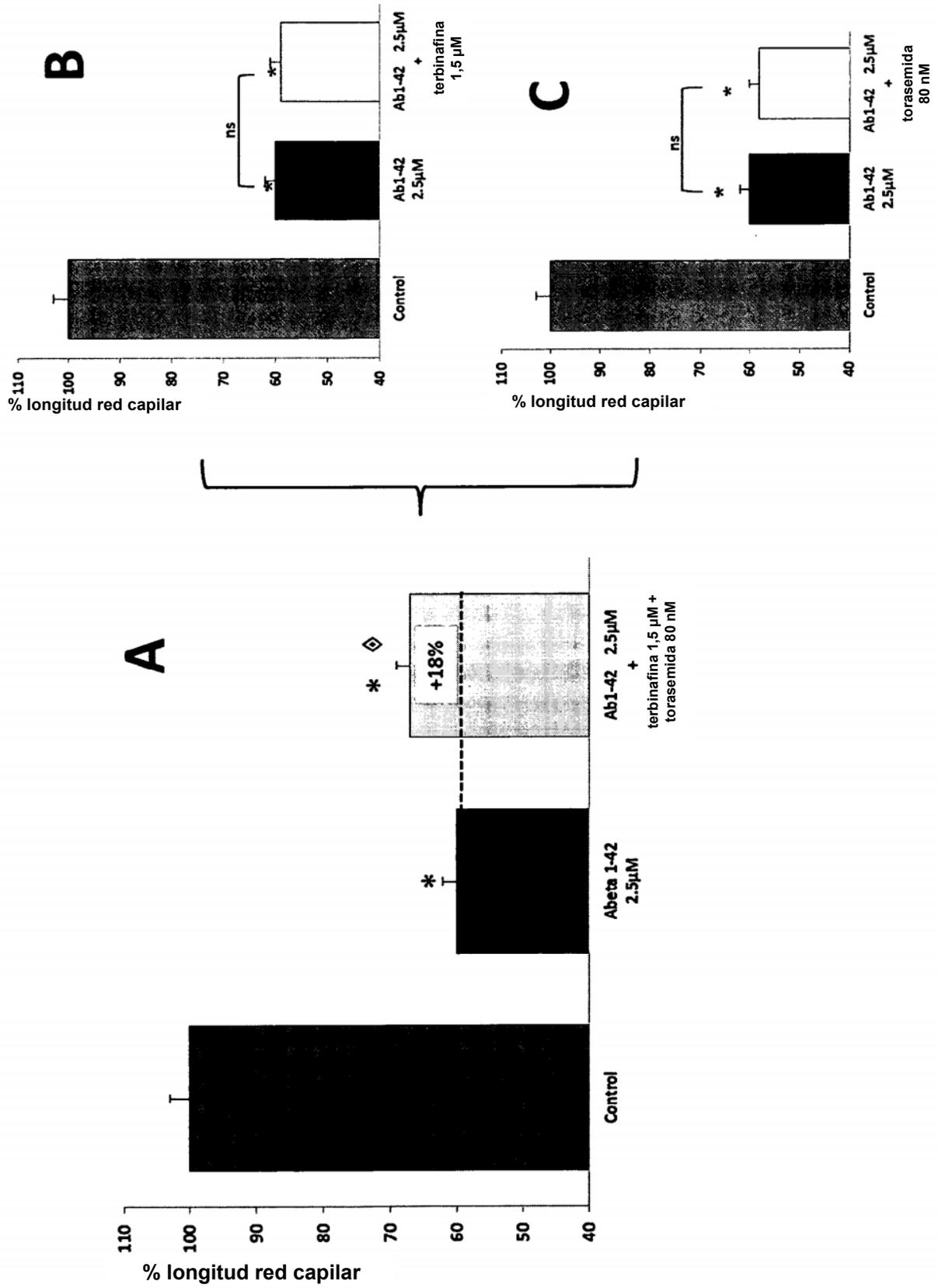


FIGURA 13

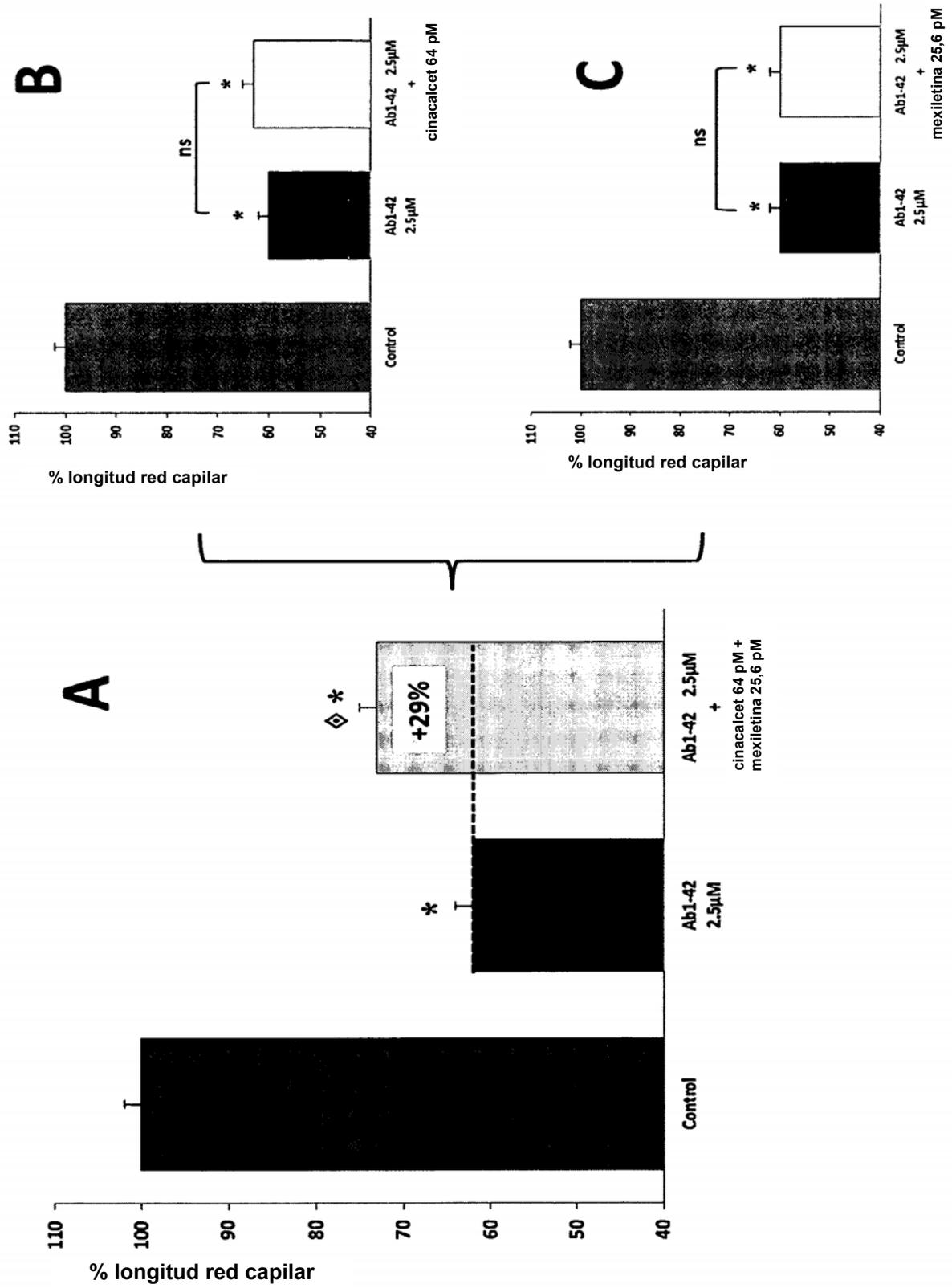


FIGURA 14

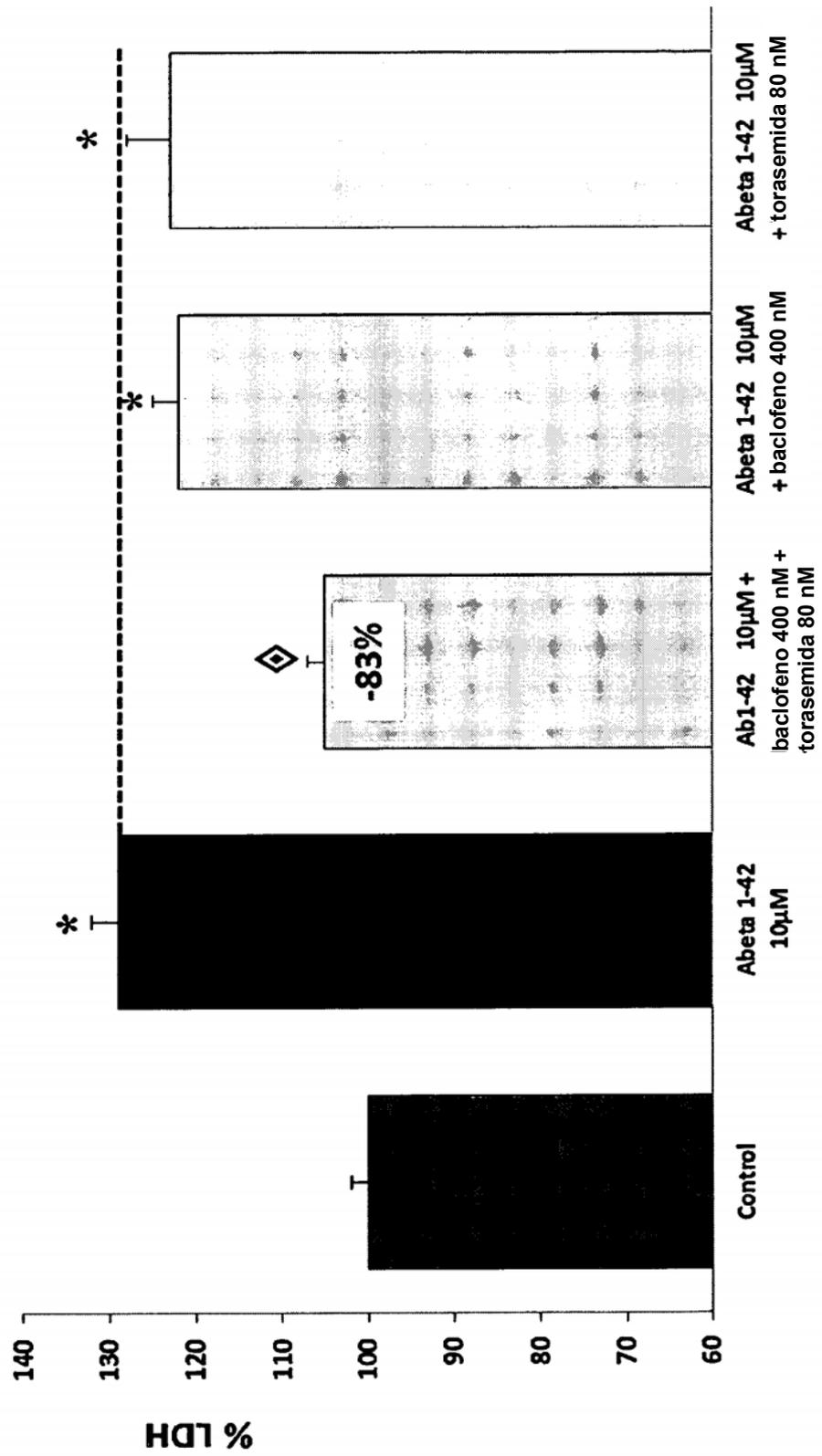


FIGURA 15

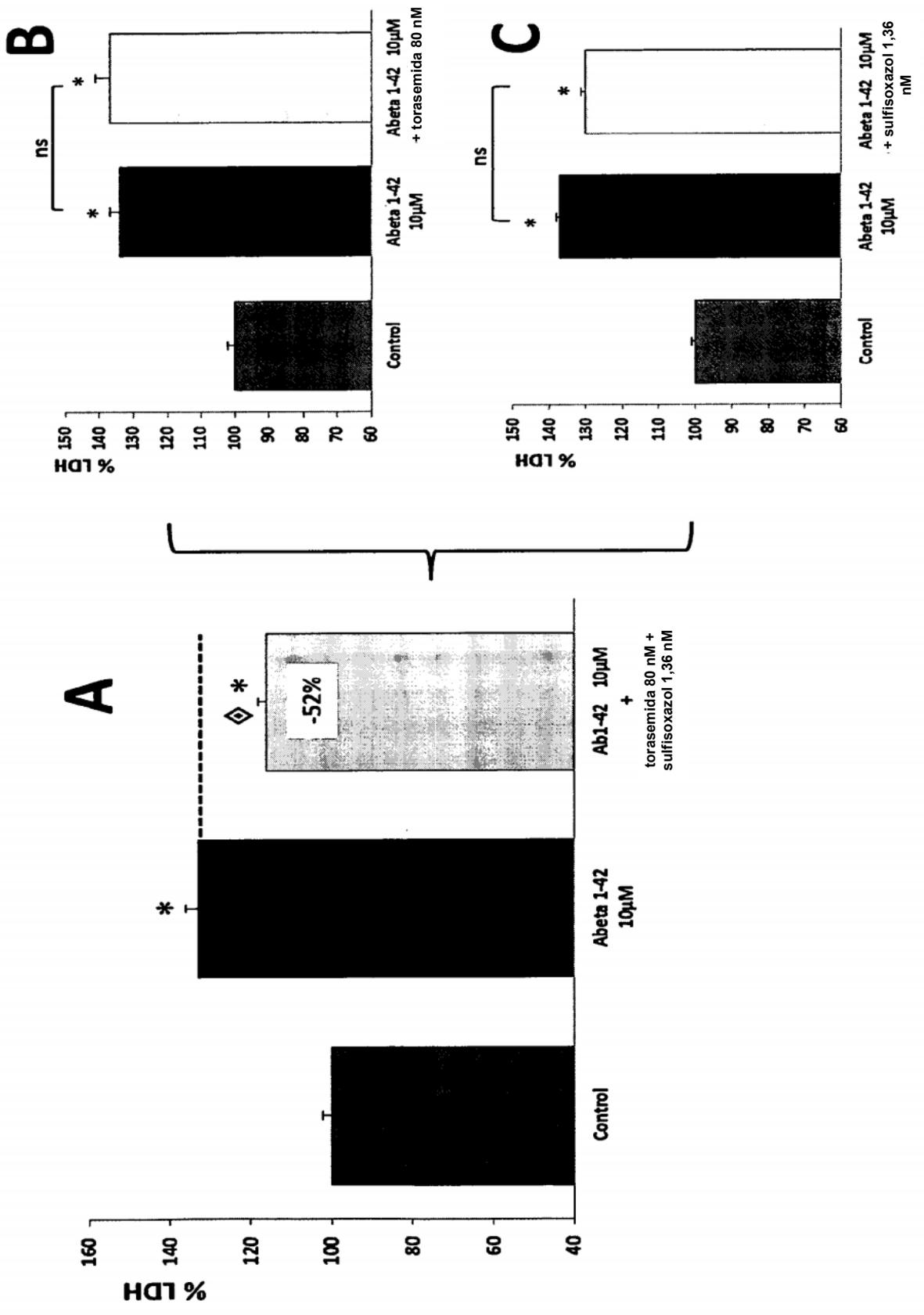


FIGURA 16

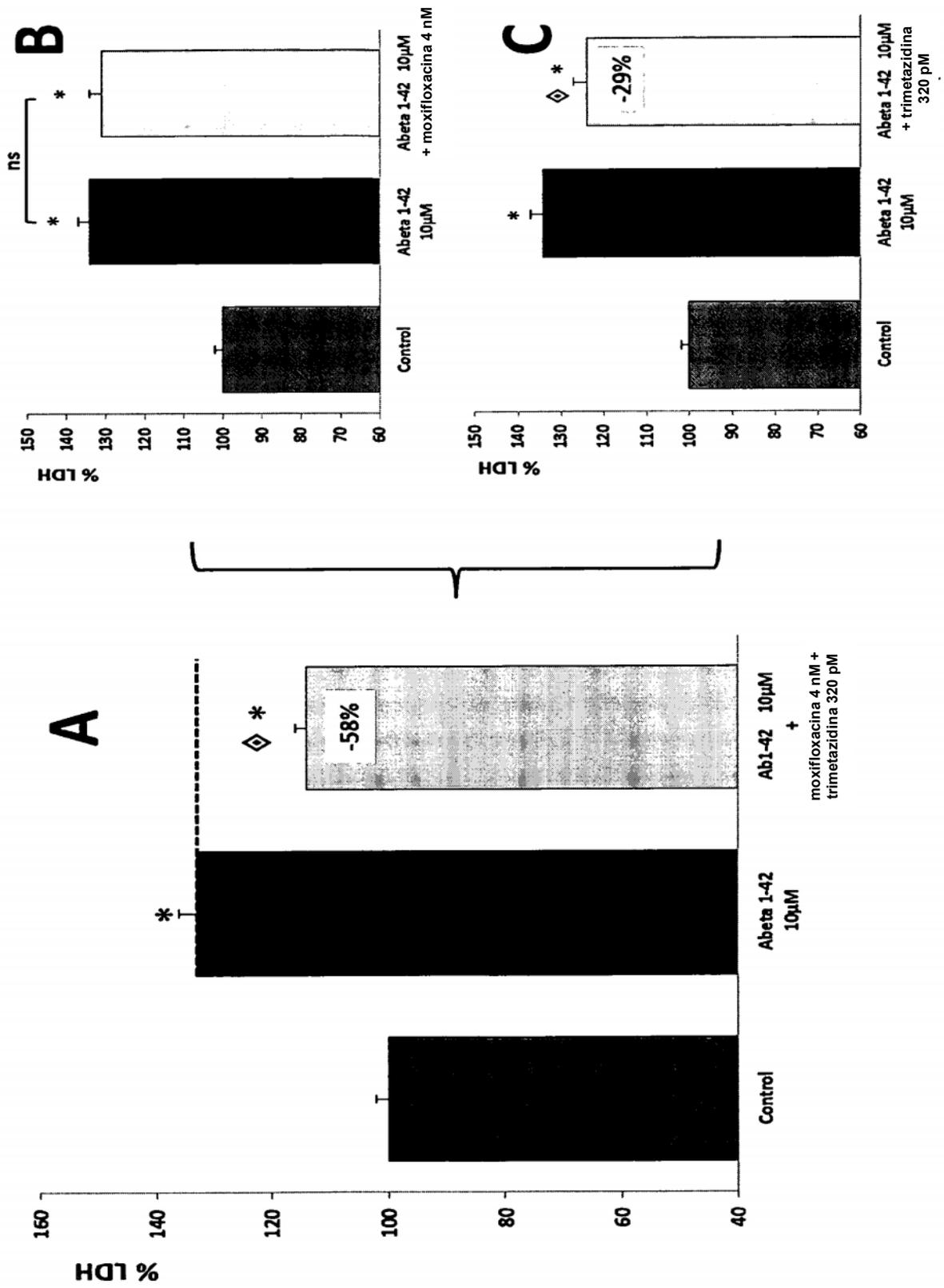


FIGURA 17

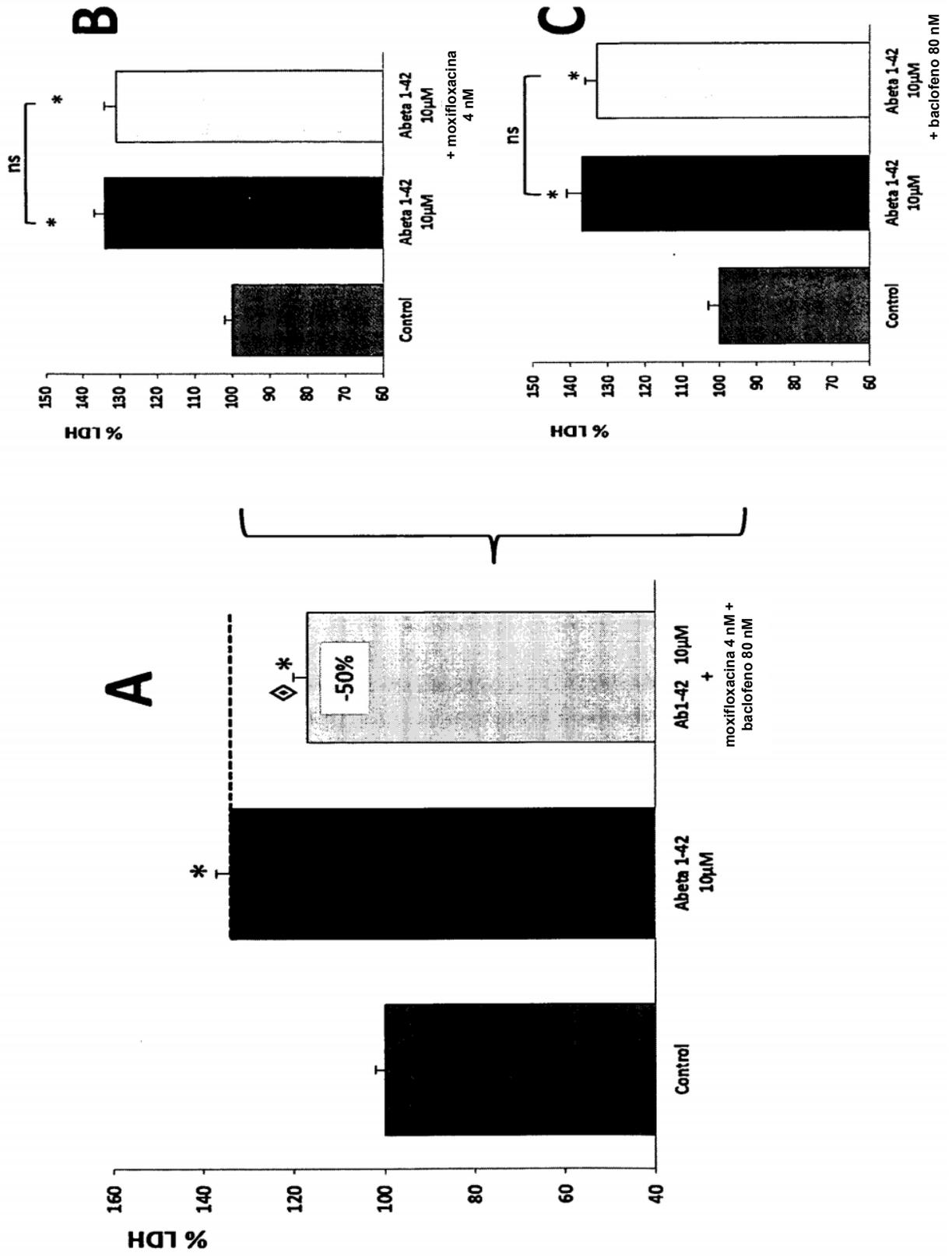


FIGURA 18

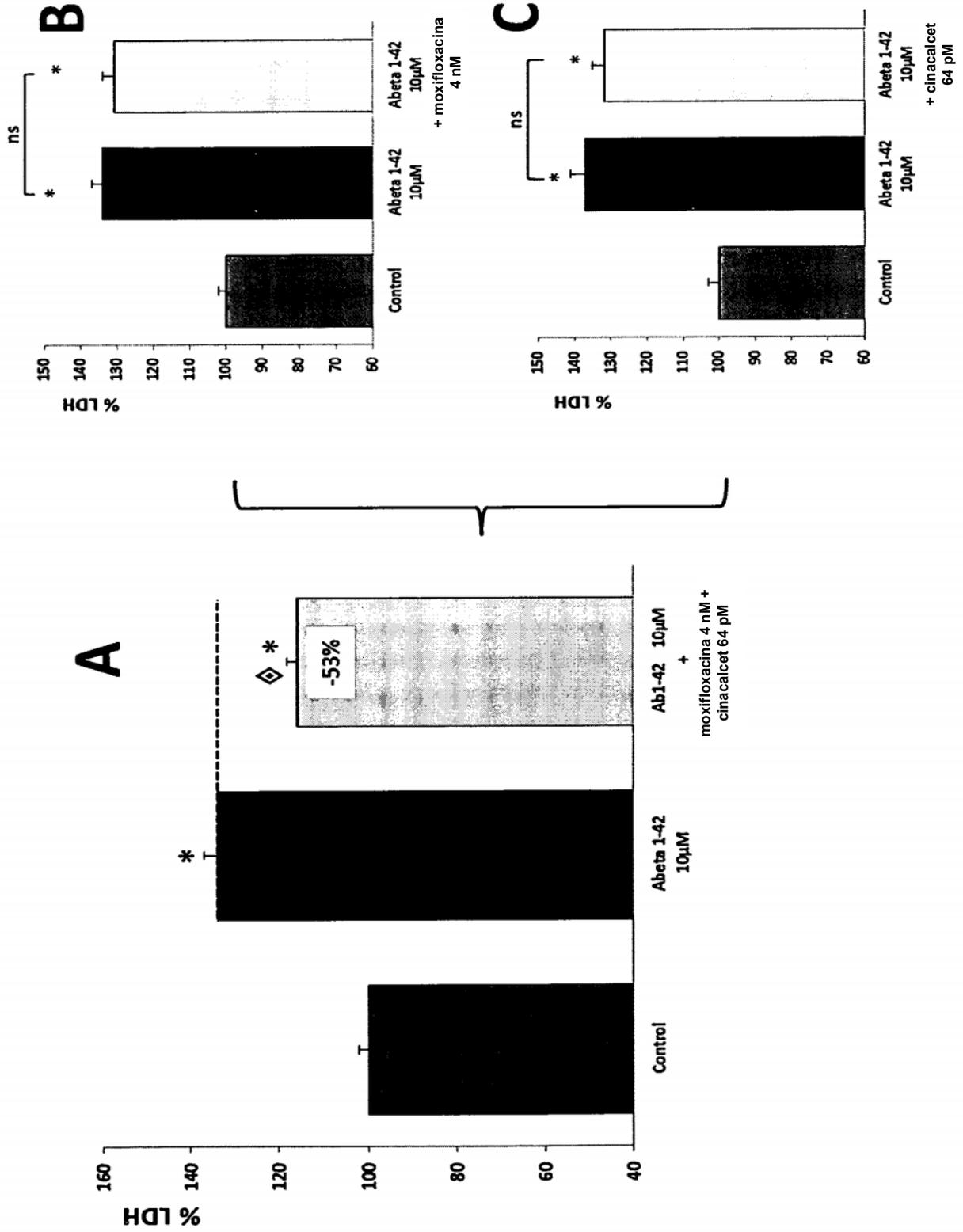


FIGURA 19

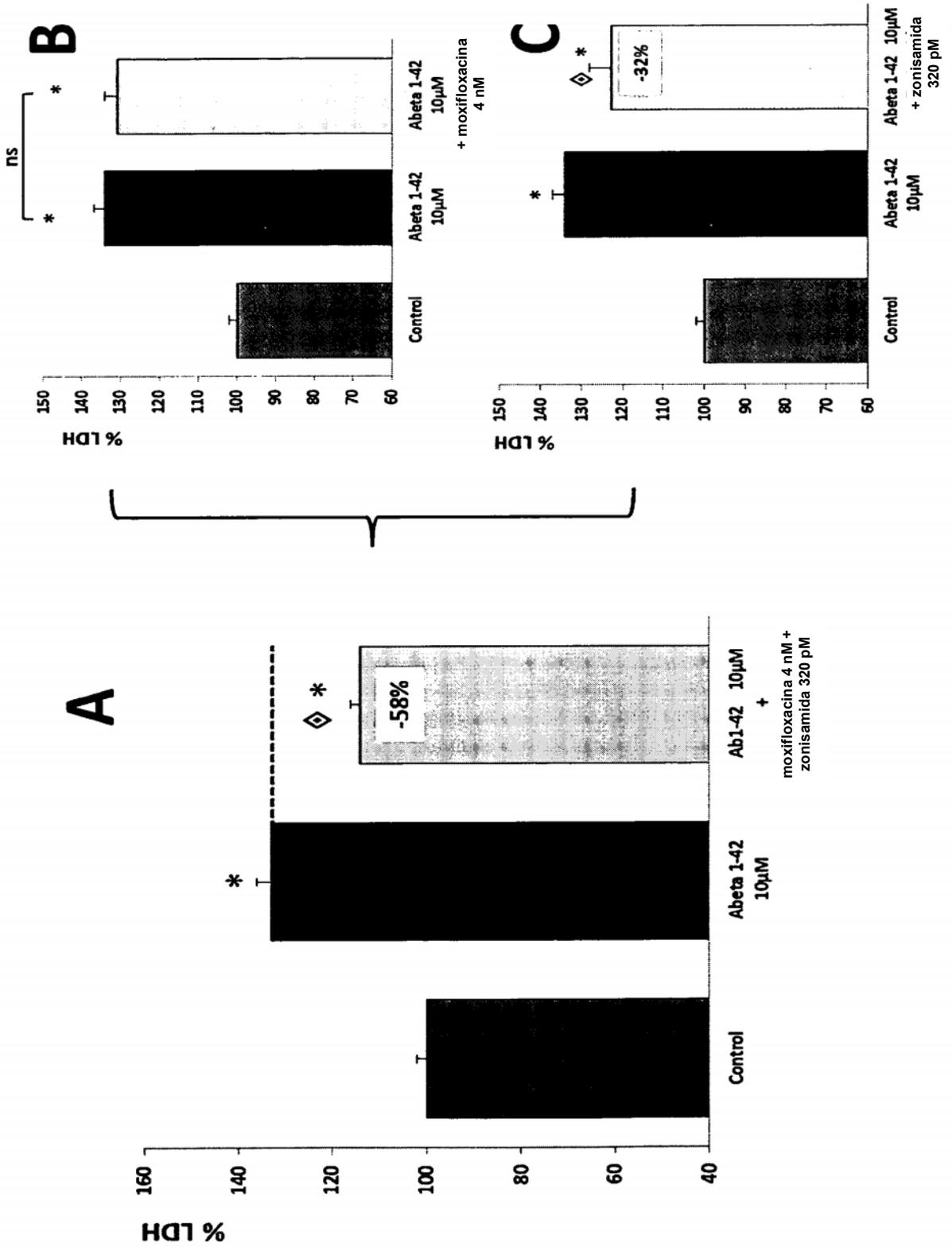


FIGURA 20

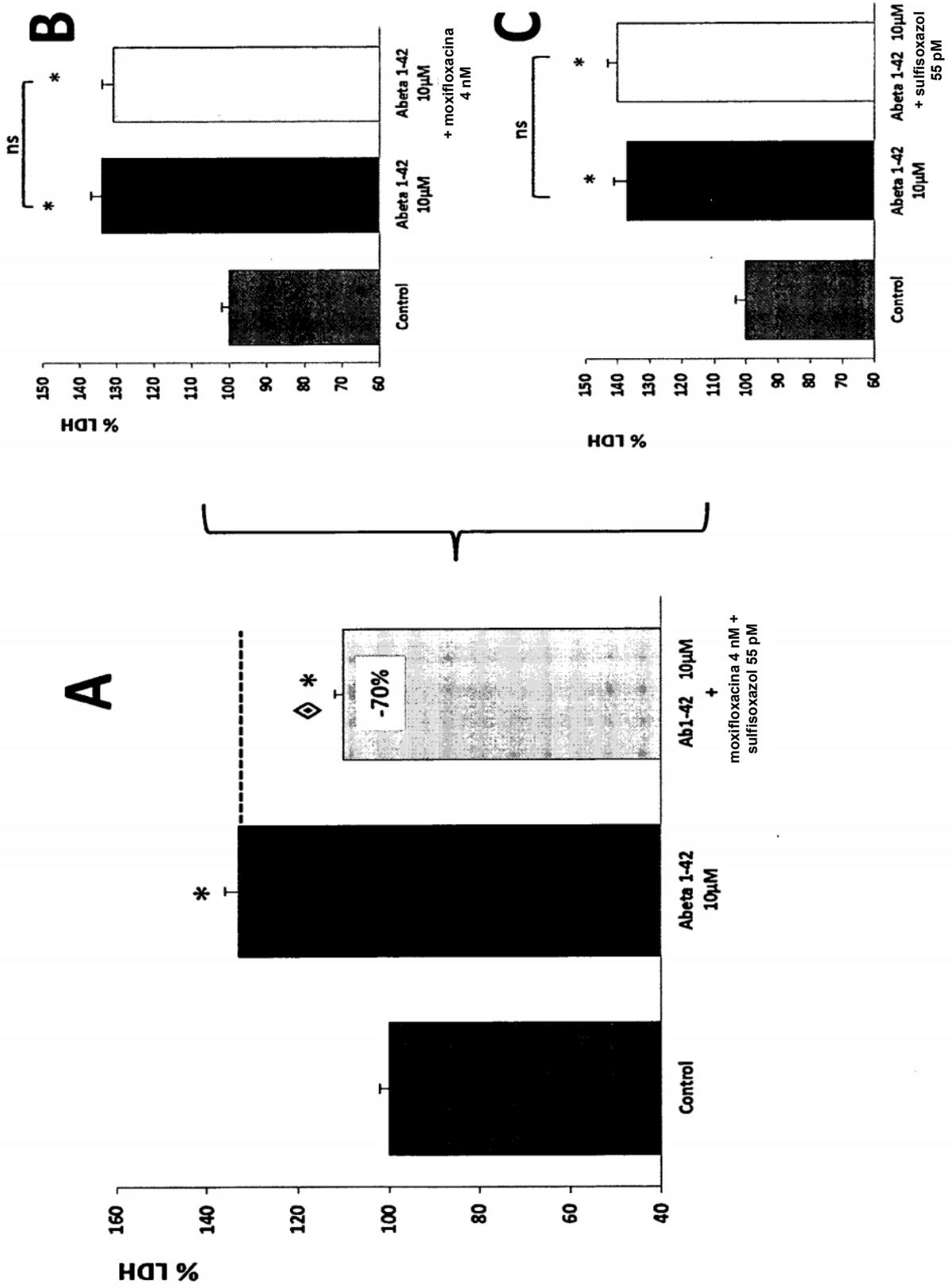


FIGURA 21

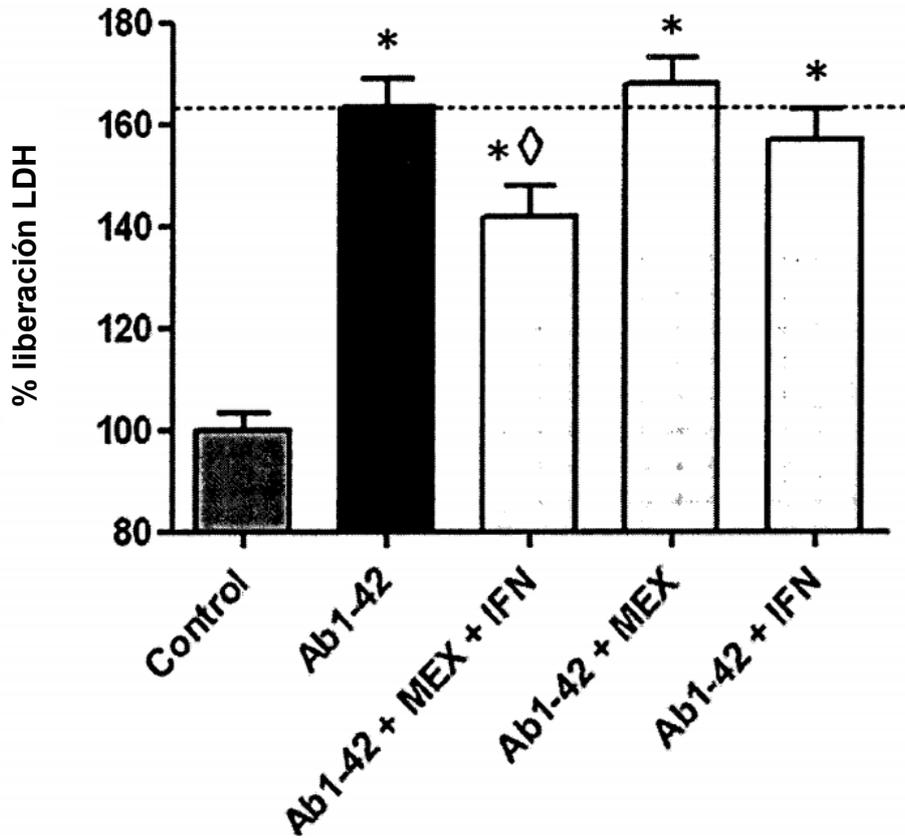


FIGURA 22

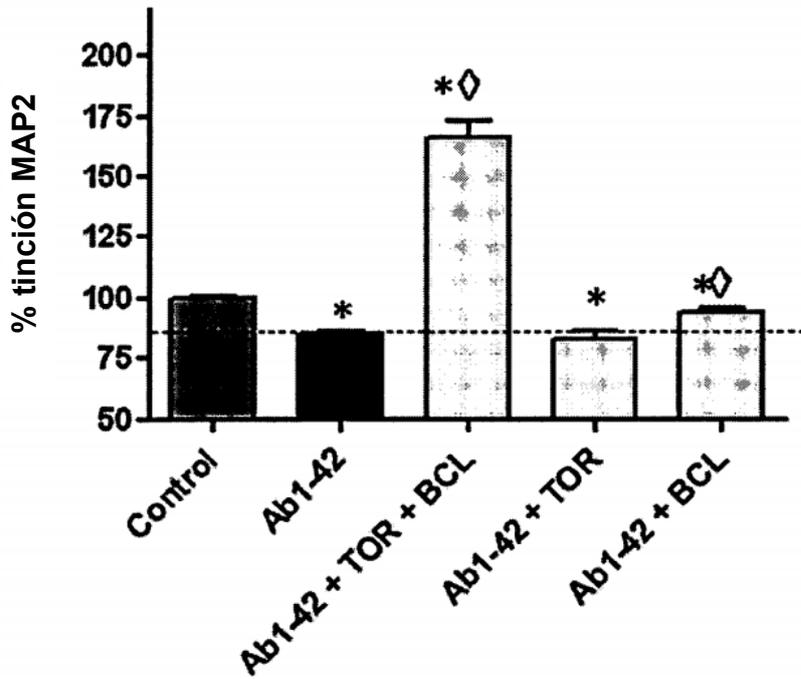


FIGURA 23

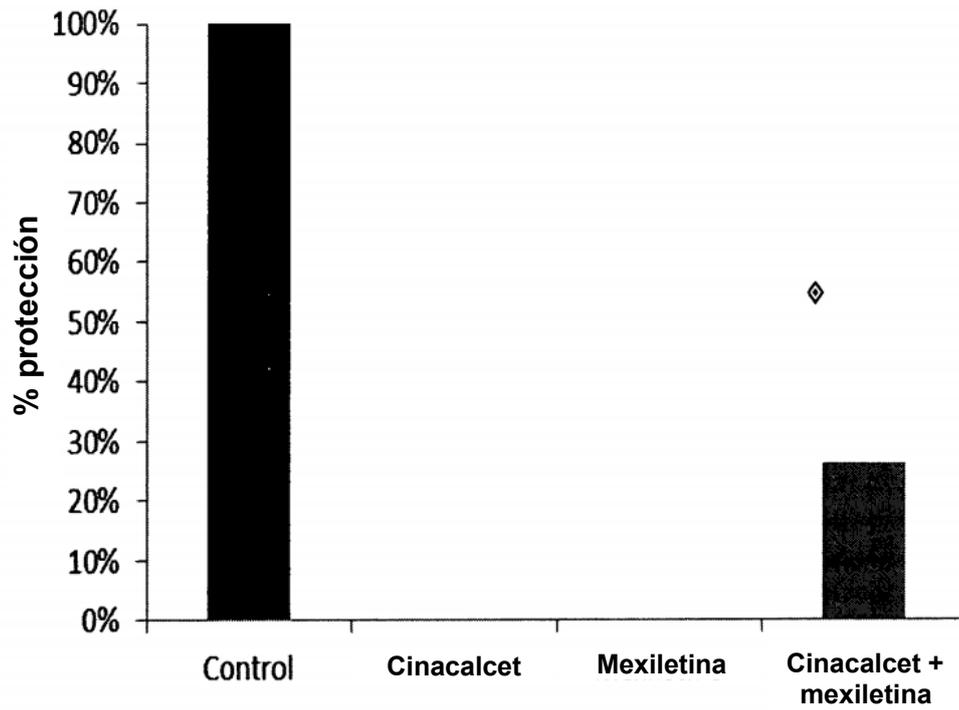


FIGURA 24

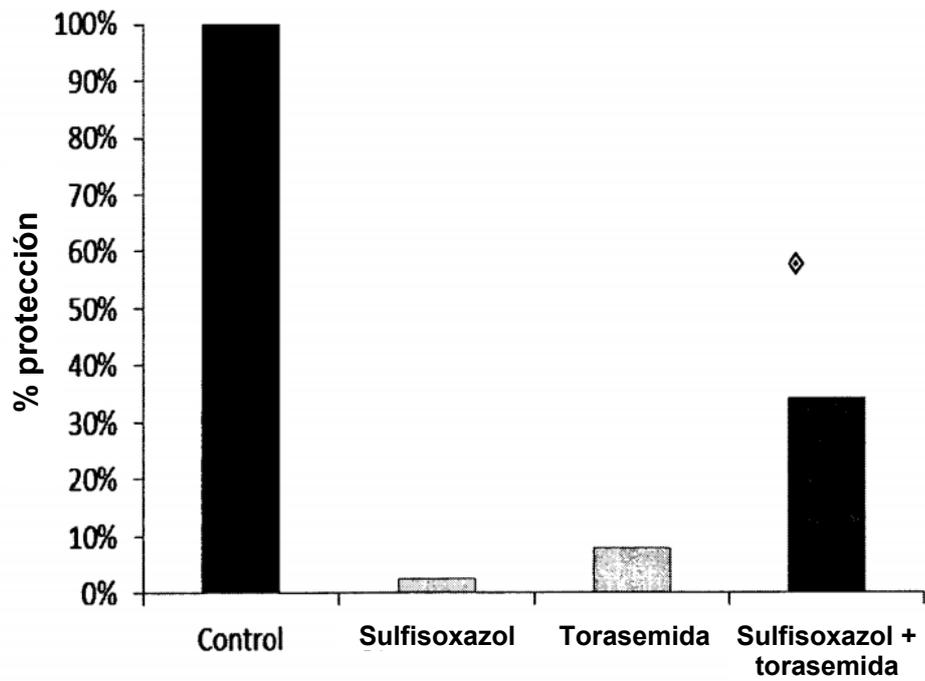


FIGURA 25

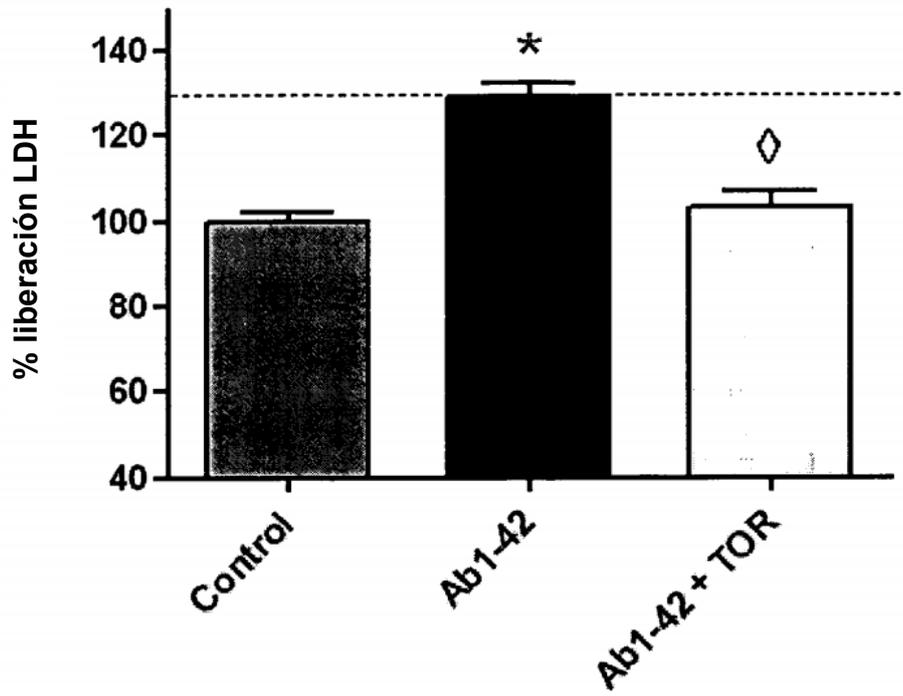


FIGURA 26

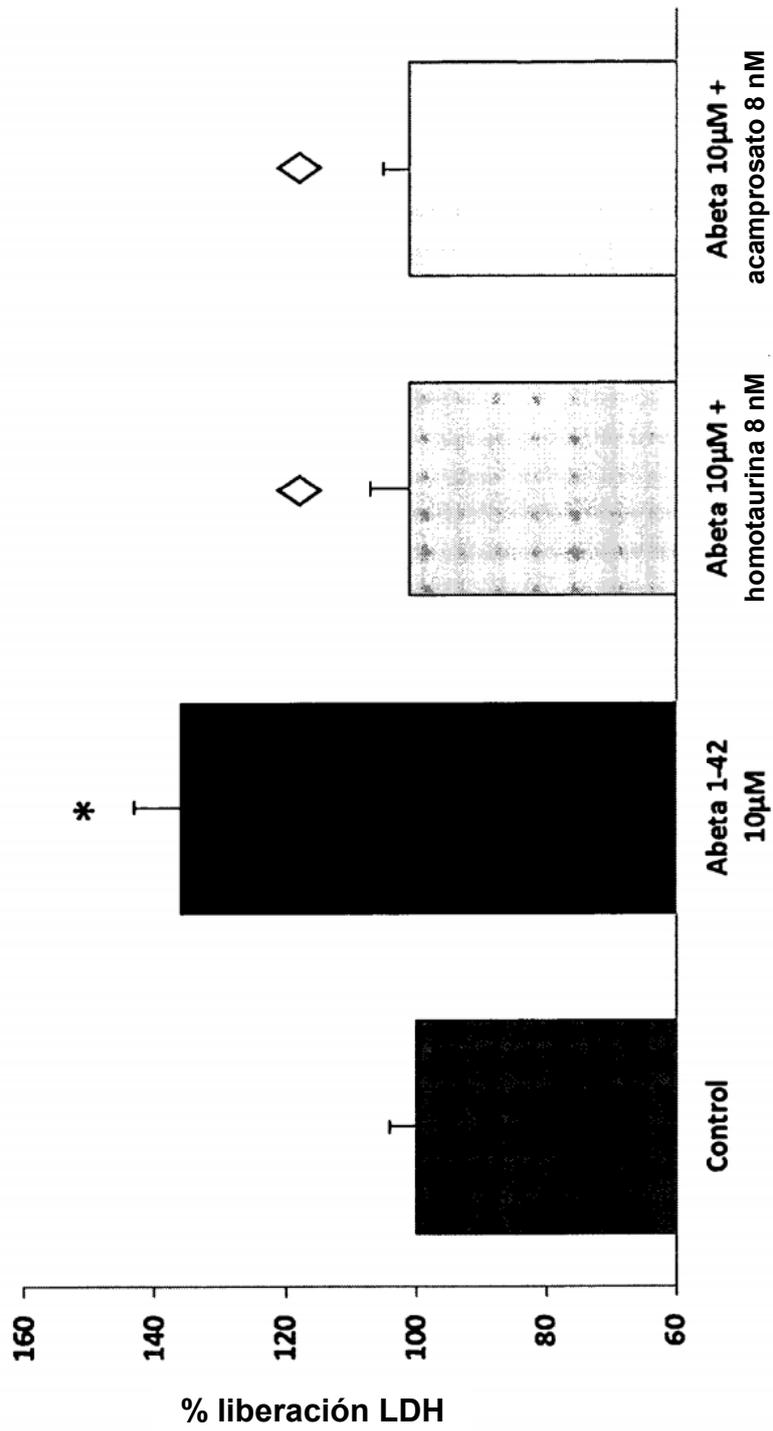


FIGURA 27