

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 048**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/19** (2006.01)

**A61K 31/445** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61K 31/196** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2012 PCT/EP2012/071631**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13064579**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2012 E 12778762 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2773337**

54 Título: **Utilización de agentes anticonexina para aumentar el efecto terapéutico de los inhibidores de la acetilcolinesterasa**

30 Prioridad:

**31.10.2011 EP 11306407**

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

**20.02.2019**

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET  
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)  
Bâtiment le Ponant D, 25 rue Leblanc  
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**MOUTHON, FRANCK y  
CHARVERIAT, MATHIEU**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 701 048 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

Utilización de agentes anticonexina para aumentar el efecto terapéutico de los inhibidores de la acetilcolinesterasa.

La presente invención se refiere a mejoras en tratamientos neurológicos y neuropsíquicos terapéuticos utilizando inhibidores de la acetilcolinesterasa. Más específicamente, la invención permite que se potencien los efectos de los inhibidores de la acetilcolinesterasa mediante ciertas moléculas, a las que se hace referencia en la presente memoria como agentes de bloqueo de conexina.

Los trastornos cognitivos son una categoría de trastornos de la salud mental que afectan principalmente al aprendizaje, a la memoria, a la percepción, y a la resolución de problemas, e incluyen amnesia, demencia, y delirio. Las causas varían entre los diferentes tipos de trastornos, pero la mayoría incluye daño a las porciones de la memoria del cerebro. Los tratamientos dependen de cómo se provoque el trastorno. La medicación y las terapias son los tratamientos más habituales; sin embargo, para algunos tipos de trastornos, tales como ciertos tipos de amnesia, los tratamientos pueden suprimir los síntomas, pero actualmente no existe ninguna cura.

La mejora de la función cognitiva se produce cuando la acción de acetilcolina (ACh) se incrementa vía la inhibición de sus enzimas metabolizantes, principalmente la enzima acetilcolinesterasa (AChE). En consecuencia, la estrategia de incrementar la actividad colinérgica para restaurar la función cognitiva ha sido una táctica terapéutica primaria y duradera.

Actualmente, se ha mostrado que varios inhibidores de la acetilcolinesterasa (ChEIs, o AChEIs, o agentes anticolinesterasa) reducen la velocidad a la que se rompe la acetilcolina, y por tanto incrementan su concentración en el cerebro (combatiendo de ese modo la pérdida de ACh causada por la muerte de las neuronas colinérgicas). Los inhibidores de la acetilcolinesterasa mejoran la transmisión neuronal al incrementar la disponibilidad de ACh en receptores muscarínicos y nicotínicos. Según los hallazgos de algunos investigadores, estos ChEIs pueden tener efectos psicotrópicos, y pueden desempeñar un papel importante en el control de perturbaciones neuropsiquiátricas y de comportamiento en pacientes con trastornos cognitivos. Estos agentes también pueden contribuir al manejo de otros trastornos con anomalías del sistema colinérgico y síntomas neuropsiquiátricos tales como alucinaciones visuales.

El donepecilo es un AChEI bien conocido. Se ha propuesto para tratar numerosos trastornos cognitivos (demencia con cuerpos de Lewy, demencia vascular, apnea del sueño, alteración cognitiva leve, esquizofrenia, síndrome de CADASIL, trastorno de déficit de atención, alteración cognitiva por derivación post-coronaria, alteración cognitiva asociada con esclerosis múltiple, y síndrome de Down). Se ha aprobado para tratar enfermedad de Alzheimer leve a moderada. Mc Gleenon et al, British Journal of Clinical Pharmacology, 1999; 48, 471-480, indican que, entre todos los inhibidores de la acetilcolinesterasa que se pueden usar para tratar la enfermedad de Alzheimer, donepecilo está recomendado debido a que es selectivo para el sistema nervioso central, tiene una semivida prolongada (70 horas), y se puede administrar una vez al día.

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno progresivo irreversible en el que las células cerebrales (neuronas) se deterioran, dando como resultado la pérdida de funciones cognitivas, principalmente memoria, juicio y razonamiento, coordinación de movimientos, y reconocimiento de patrones. En etapas avanzadas de la enfermedad, se puede perder toda la memoria y el funcionamiento mental. La muerte de las células nerviosas se produce gradualmente a lo largo de un período de años. Está asociada con demencia senil, que es el deterioro mental (pérdida de la capacidad intelectual) que está asociada con la senilidad. Actualmente hay 5,3 millones de personas con AD en los Estados Unidos de América, y más de la mitad de estos individuos probablemente se categorizarán por tener enfermedad moderada o grave. Estas etapas avanzadas de AD se extienden a lo largo de un período de varios años, y son a menudo los más difíciles tanto para pacientes como para cuidadores. Un componente importante de la patofisiología de la AD, reconocido hace más de 30 años atrás, es la degeneración del sistema colinérgico. Estudios histológicos tempranos que muestran la pérdida de actividad colinérgica a medida que progresa la AD están apoyados por varias líneas modernas de investigación que usan técnicas avanzadas de formación de imágenes, incluyendo técnicas de formación de imágenes positrónicas (PET) y formación de imágenes mediante resonancia magnética (MRI). Las anomalías colinérgicas observadas en AD no son vistas como la causa del trastorno, pero la implicación colinérgica es significativa debido a que es universal, se correlaciona con defectos cognitivos, y es uno de los pocos fenómenos patofisiológicos que se pueden abordar con las opciones de tratamiento actualmente aprobadas.

Sin embargo, los inhibidores de la acetilcolinesterasa que se han aprobado hasta el momento (y en particular el donepecilo) han sido menos prometedores terapéuticamente ya que producen solo mejoras modestas en la función cognitiva, y la ganancia cognitiva inducida (si existe) solo dura unos pocos meses.

Por lo tanto, existe una urgente necesidad de nuevos tratamientos que permitan reducir y/o alterar la pérdida de síntomas cognitivos más eficientemente y de forma más duradera para todos los pacientes que sufren trastornos cognitivos, especialmente aquellos que sufren Alzheimer en etapas avanzadas. La presente invención satisface

esta necesidad al describir un nuevo producto terapéutico que muestra efectos mejorados sobre la pérdida de memoria con respecto a los tratamientos existentes.

### Descripción de las figuras

La figura 1 representa el análisis  $\theta$  del hipocampo de ratones adultos (ratones de 4-5 meses – 6 primeras columnas) y ratones de edad avanzada (ratones de 17-18 meses – 6 últimas columnas) tras la administración intraperitoneal de 0,1 mg/kg o 0,3 mg/kg de donepecilo (DZP) asociado o no con 1 mg/kg de ácido meclofenámico (MFA).

La figura 2 representa la alternancia total de ratones de edad avanzada (ratones de 17-18 meses) tras la administración intraperitoneal de NaCl (vehículo) o de 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg o 1 mg/kg de donepecilo solo (DZP), o de 1 mg/kg de ácido meclofenámico solo (MFA), o de la combinación de MFA y DZP (última columna). La alternancia se ha registrado en un dispositivo de laberinto en T.

La figura 3 representa la alternancia de ratones “de avanzada” por bloques de dos ensayos consecutivos, tras la administración intraperitoneal de NaCl (vehículo), donepecilo solo (0,1 mg/kg), MFA solo (1 mg/kg), y una combinación de donepecilo y MFA (último grupo de columnas).

### Descripción de la invención

Se ha demostrado en la presente memoria en adelante que la asociación de ácido meclofenámico (MFA) con un inhibidor de la acetilcolinesterasa, tal como donepecilo, da como resultado sorprendentemente ganancias preclínicas cualitativamente superiores en comparación con mayores dosis del inhibidor de la acetilcolinesterasa solo.

El ácido meclofenámico se ha descrito como un agente “de bloqueo de conexina”, que tiene una actividad antiinflamatoria no esteroidea (Gasparini L. et al, *Journal of Neurochemistry* 2004; 91, 521-536).

En el contexto de esta invención, un agente “de bloqueo de conexina” es una molécula química, una proteína, un fragmento proteico o un ácido nucleico (por ejemplo ARNi) capaz de inhibir la actividad funcional de conexinas, directa y/o indirectamente, y más generalmente cualquier tipo de uniones intercelulares, y/o capaz de inhibir funcionalmente, directa y/o indirectamente, cualquier actividad celular que implique una proteína de tipo conexina. Tal agente también se puede denominar como una “molécula anticonexina”.

Se conocen diversas moléculas para bloquear las uniones de espacios vacíos vía conexinas. Entre ellas, la familia de fenamatos incluye los siguientes compuestos: ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido flufenámico, ácido niflúmico y ácido tolfenámico. Estos compuestos tienen todos ellos una actividad antiinflamatoria no esteroidea, pero esta actividad no es responsable de su capacidad para bloquear las uniones de espacios vacíos. De hecho, se ha sugerido que los fenamatos establecen en su lugar una interacción directa con las conexinas o con las interfaces de las membranas de proteínas que pueden influir en la conformación de las conexinas, y por lo tanto en su papel funcional (Harks EG, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* septiembre de 2001, 298(3): 1033-41).

El ácido 2-[(2,6-di-cloro-3-fenil)amino]benzoico, más conocido habitualmente como ácido meclofenámico (MFA), es un agente antiinflamatorio no esteroideo y un agente periférico de la clase de fenamatos, un inhibidor de prostaglandina, descrito entre los bloqueantes solubles en agua como uno de los más eficaces para bloquear de forma reversible las uniones de espacios vacíos. Además, el ácido meclofenámico no es específico para un tipo de conexina, y por lo tanto es eficaz para bloquear un gran número de conexinas cerebrales (Pan F, *Vis Neurosciences*, julio-agosto de 2007; 24(4): 609-18).

Los derivados del ácido glicirretínico se refieren al ácido 18- $\beta$ -glicirretínico (BGA), también conocido como “enoxolona”, ácido 18- $\alpha$ -glicirretínico y ácido carbenoxolona, que son saponinas triterpenoideas para inhibir la enzima 11-hidroxiesteroide deshidrogenasa. Además, estos compuestos son capaces de inhibir de forma muy eficaz las uniones de espacio vacío (Pan F, *Vis Neurosciences*, julio-agosto de 2007; 24(4): 609-18).

Los miembros de la familia de las quininas, tales como mefloquina (LARIAM), quinina y quinidina, también tienen un fuerte poder antagonista sobre las uniones de espacio vacío (Srinivas M, *PNAS* 2001, 98: 10942-10947; Pan F, *Vis Neurosciences*, julio-agosto de 2007; 24(4):609-18).

Algunos agentes anestésicos, tales como halotano, enflurano e isoflurano, tienen un efecto bloqueante de las uniones de espacio vacío rápido y reversible (Burt JM, et al, *Circ Research*. 1989; 65: 829-37).

Además, la oleamida (cis-9-octadecenamida), la primera amida del ácido oleico, también tiene una acción inhibidora sobre las moléculas 43 y 32 de conexina (Guan X. et al, *J. Cell Biol* 1997; 139: 1785-92).

Además, las ciclodextrinas ( $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) y  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD)), que son oligosacáridos cíclicos naturales de  $\alpha$ -D-glucopiranos, han demostrado propiedades anticonexina (Locke D. et al, J. Biol Chem 2004; 279: 22883-92).

5 También se ha propuesto que los agentes lipófilos y ácidos grasos tales como ácido oleico, ácido palmitoleico, ácido decenoico y ácido miristoleico, el inhibidor de PKC estaurosporina, los glicósidos cardíacos tales como estrofantidina y ouabina, delta-9-tetrahidrocannabinol, la sal del ácido acético y del ácido propiónico del borato de 2-aminoetoxidifenilo, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), la monoxima de 2,3-butanodiona, carbacol, noradrenalina, FGF-2, angiotensina-II, el factor natriurético auricular ANF, VEGF, 1-oleil-2-acetil-*sn*-glicerol, ácido  
10 11,12-epoxieicosatrienoico, lidocaína, tonabersat, Nexagon y Peptagon (de CoDa Therapeutics) desacoplan fuertemente las uniones de espacio vacío cardiovasculares (Dhein S., Cardiovascular Research, 2004 (62) 287-298).

Finalmente, el borato de 2-aminoetildifenilo (2-APB) es un compuesto identificado recientemente como un agente que bloquea la unión de espacio vacío (Bai D, J Pharmacol Exp Ther, diciembre de 2006; 319(3): 1452-8). Sin embargo, este modulador del receptor de 1,4,5-trifosfato de inositol apenas selecciona específicamente como dianas ciertas conexinas, tales como conexinas 26, 30, 36, 40, 45 y 50 (Bai D, J Pharmacol Exp Ther, diciembre de 2006; 319(3): 1452-8).

20 De forma similar, recientemente se han propuesto otras moléculas para bloquear el dominio extracelular de conexinas – un dominio que es importante para el funcionamiento de las uniones de espacio vacío. Implica en particular anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular de conexinas (Hofer A et al, Glia 1998; 24: 141-54; Meyer RA, J. Cell Biol 1992; 119: 179-89), o pequeños péptidos que imitan secuencias específicas conservadas por los bucles extracelulares E1 y E2 de las conexinas (Dahl G. et al, Biophys J, 1994; 67: 1816-22); en particular, los péptidos que corresponden a las secuencias extracelulares incluyen los patrones conservados QPG y SHVR de E1 (Salto26) y el patrón conservado SRPTEK de E2 (Salto27) de las conexinas son más  
25 eficaces para bloquear las uniones de espacio vacío (Chaytor A T et al, J. Physiol 1997; 503: 99-110).

Además, la formación de uniones de espacio vacío funcionales se puede regular por medio de la fosforilación de conexinas. De hecho, la fosforilación de ciertos dominios proteicos de las subunidades hexaméricas conduce a una inhibición en la funcionalidad de las uniones de espacio vacío, según el sitio de fosforilación, al cerrar los canales o al reducir la presencia en la membrana (modificación del tráfico y de la semivida de las subunidades (Scemes E, Glia 15 de enero de 2008, 56(2): 145-53; Postma FR, J Cell Biol 1998 Mar 9, 140(5): 1199-209; Shaw RM, Cell, 9 de febrero de 2007, 128(3): 547-60; Fabrizi GM, Brain, febrero de 2007, 130 (Pt2): 394-403).

35 De este modo, las moléculas pueden tener un efecto bloqueante indirecto sobre la unión de espacio vacío, vía los niveles de fosforilación de las conexinas. Son en particular: ácido lisofosfatídico, trombina y neuropéptidos, tal como endotelina (Postma FR, J Cell Biol, 9 de marzo de 1998, 140(5): 1199-209). En una forma de realización preferida de la invención, el agente de bloqueo de conexinas tiene un efecto indirecto sobre las conexinas y las uniones de espacio vacío, y se escoge del grupo que consiste en: ácido lisofosfatídico, trombina y neuropéptidos, tal como endotelina.

En el contexto de esta invención, los agentes de bloqueo conexinas se seleccionan ventajosamente de:  
45 alcoholes de cadena larga (por ejemplo, heptanol y octanol), fenamatos (por ejemplo, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido flufenámico, ácido niflúmico, ácido tolfenámico), arilaminobenzoatos, aminosulfonatos (por ejemplo, taurina), derivados del ácido glicirretínico (por ejemplo, ácido 18- $\beta$ -glicirretínico, ácido 18- $\alpha$ -glicirretínico, y carbenoxolona), oleamidas (por ejemplo, cis-9-octadecenamida), o iones de tetraalquilamonio y poliaminas (tales como espermina y espermidina), derivados de quinina (tales como mefloquina, quinina, quinidina), 2-ABP, agentes anestésicos (halotano, enflurano o isoflurano), ciclodextrinas ( $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) y  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD)), anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular de las conexinas, o péptidos con patrones conservados que imitan este dominio particular (en particular Gap26 y Gap27), ácido oleico, ácido palmitoleico, ácido decenoico, ácido miristoleico, estaurosporina, estrofantidina, ouabina, delta-9-tetrahidrocannabinol, borato de 2-aminoetoxidifenilo ácido acético, ácido propiónico, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), monoxima de 2,3-butanodiona, carbacol, noradrenalina, FGF-2, angiotensina-II, factor natriurético auricular ANF, VEGF, 1-oleil-2-acetil-*sn*-glicerol, ácido 11,12-epoxieicosatrienoico, lidocaína, tonabersat (SB-220453, (cis-(-)-6-acetil-4S-(3-cloro-4-fluorobenzoilamino)-3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-1-benzopiran-3S-ol), Nexagon y Peptagon (de CoDa Therapeutics). Estas moléculas diferentes se describen específicamente en los siguientes artículos: Srinivas M, Connexins: A Guide, Humana Press 2009, Capítulo 8, páginas 207-224; Srinivas M, Molecular Pharmacology Jun 2003, 63(6): 1389-97; Harks EG, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics Sep 2001, 298(3): 1033-41; y Salameh A, Biochimica et Biophysica Acta 1719 (2005) 36-58; Dhein S., Cardiovascular Research, 2004 (62) 287-298.

Estos compuestos se proporcionan como ejemplos, y la invención se refiere a cualquier molécula que tiene la propiedad de bloquear funcionalmente, directa o indirectamente, las conexinas o uniones de espacio vacío.

65

Además, se debería apreciar que las moléculas antiinflamatorias pueden producir indirectamente, por su acción sobre la prostaglandina sintasa, una modificación estructural de las conexinas (la regulación de los niveles de expresión de conexinas o su fosforilación se produce en particular vía PI3K y PKA, ellas mismas dependientes de los niveles de actividad de Cox, NO y PG sintetasa, dianas de los antiinflamatorios). Esta modificación, en el sentido de una reducción en presencia de las conexinas en las uniones, provoca indirectamente una reducción en la actividad funcional de las conexinas similar a un bloqueo directo de las conexinas. En consecuencia, el uso de estas moléculas producirá el efecto deseado (bloqueo de las conexinas), y no es un obstáculo para el uso combinado a baja dosis con agentes psicotrópicos (Yao J, Morioka T y Oite T.: *Kidney Int.* 2000; 57: 1915-26. Yao J, Hiramatsu N, Zhu Y, et al.: *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16: 58-67; Figueroa XF, Alvina K, Martinez AD, et al.: *Microvasc Res.* 2004; 68: 247-57 Aldredge BT.: *J Clin Pathol.* 12 de mayo de 2008; Lai-Cheong JE, Arita K & McGrath JA.: *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 2713-25, y Giepmans BN.: *Cardiovasc Res.* 2004; 62: 233-45).

Sin embargo, a las dosis bajas implicadas en la presente invención, los agentes anticonexina, tales como ácido meclofenámico, no tienen ningún efecto sobre Cox, NO y PG sintetasa, y solamente exhiben una actividad anticonexina que es independiente de estas enzimas.

Todas las moléculas antiinflamatorias que tienen una actividad anticonexina directa o indirecta están comprendidas en la presente invención.

De este modo, la presente invención describe un nuevo producto de combinación que contiene por lo menos un agente de bloqueo de conexinas y un inhibidor de la acetilcolinesterasa, como productos de combinación para el uso simultáneo, separado o secuencial a lo largo del tiempo, en pacientes que sufren trastornos cognitivos.

El agente de bloqueo de conexinas puede mejorar ventajosamente el efecto terapéutico de los inhibidores de la acetilcolinesterasa prescritos por los médicos para tratar a un paciente que sufre trastornos cognitivos.

Dicho agente de bloqueo de conexinas se ha descrito anteriormente. En una forma de realización preferida, se selecciona de entre el grupo que incluye: ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido flufenámico, ácido niflúmico, ácido tolfenámico, ácido 18- $\beta$ -glicirretínico, también conocido como "enoxolona", ácido 18- $\alpha$ -glicirretínico, ácido carbenoxolona, mefloquina, quinina, quinidina, oleamida (cis-9-octadecenamida), ácido oleico, ácido palmitoleico, ácido decenoico, ácido miristoleico, estaurosporina, ciclodextrinas ( $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) y  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD)), tonabersat (SB-220453, (cis-(-)-6-acetil-4S-(3-cloro-4-fluorobenzoilamino)-3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-1-benzopirán-3S-ol), Nexagon y Peptagon (de CoDa Therapeutics).

En una forma de realización más preferida, se escoge del grupo que incluye: ácido meclofenámico, mefloquina, ácido 18- $\beta$ -glicirretínico, y carbenoxolona.

En una forma de realización más bien preferida, dicho agente de bloqueo de conexinas es mefloquina.

Un "inhibidor de la acetilcolinesterasa" (a menudo abreviado como "AChEI") o "anticolinesterasa" es un compuesto químico que inhibe la enzima colinesterasa de romper la acetilcolina, incrementando tanto el nivel como la duración de acción del neurotransmisor acetilcolina. Aparece de forma natural como ponzoñas y venenos, y se usan médicamente para tratar miastenia grave, glaucoma, enfermedad de Alzheimer, demencia por cuerpos de Lewy, o como un antídoto contra el envenenamiento anticolinérgico.

El producto de combinación de la invención difiere de la técnica anterior por cuanto contiene, como principios activos, un agente colinérgico (que no es un efector acetilcolinérgico sino un inhibidor de la acetilcolinesterasa), y un agente de bloqueo de conexinas. El producto de combinación de la invención puede contener, como únicos principios activos, dicho inhibidor de la acetilcolinesterasa y dicho agente de bloqueo de conexinas. En particular, el producto de combinación no contiene preferentemente una cantidad eficaz de un precursor de un cuerpo de cetona, tales como triglicéridos de cadena media que tienen cadenas de 5-12 carbonos. Preferentemente, no contiene una cantidad eficaz de inhibidor de la fosfodiesterasa 7 (PDE7). Preferentemente, no contiene una cantidad eficaz de axomadol. Preferentemente, no contiene una cantidad eficaz de bupropiona.

Sin embargo, la composición puede comprender, además de los dos principios activos, cualquier vehículo, estabilizante, adyuvante, y similar, farmacéutico, como se usan frecuentemente en la técnica. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen (pero no se limitan a): agua; vehículos acuosos tales como, pero sin limitarse a, disolución de cloruro de sodio, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, disolución de dextrosa y de cloruro de sodio, y disolución de Ringer lactada; vehículos miscibles con agua tales como, pero sin limitarse a, alcohol etílico, polietilenglicol, y polipropilenglicol; y vehículos no acuosos tales como, pero sin limitarse a, aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo, y benzoato de bencilo. El experto en la materia conoce qué vehículos se pueden usar.

Preferentemente, esta composición se formula para la administración oral (incluyendo cavidad bucal o sublingualmente). Otras formulaciones interesantes incluyen formulaciones para las administraciones

intraperitoneal (i.p), intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), transcutánea, transdérmica, intratecal e intracraneal. Todavía otras formulaciones incluyen las vías de administración epidural, submucosal, intranasal, fondo de saco ocular, y rectal, así como la administración vía inhalación pulmonar. El experto en la materia conoce bien qué vehículos se pueden usar en qué tipo de composición.

Para formular las composiciones descritas anteriormente, se puede usar una variedad de medios de administración, incluyendo, pero sin limitarse a, cápsulas, comprimidos, jarabes, cremas y ungüentos, supositorios, parches, o cualquier depósito capaz de contener y dispensar los dos principios activos. El experto en la materia conoce bien qué vehículos se pueden usar en cada caso.

Dicho inhibidor de la acetilcolinesterasa se puede seleccionar de entre Acefato, Azinfós-metilo, Bensulida, Cadusafós, Cloretoxifós, Clorfenvinfós, Clorpirifós, Clorpirifós-Metilo, Cumafós, Ciclosarina, Demetón, Demetón-S-Metilo, Diazinón, Diclorvós, Dicrotofós, Fluorofosfato de diisopropilo (Guthion), Fosfato de diisopropilo, Dimetoato, Dioxatión, Disulfotón, EA-3148, Ecotiofato, Etión, Etoprop, Fenamifós, Fenitrotión, Fentión, Fostiazato, Isofluorofato, Isoxatión, Malaoxón, Malatión, Metamidofós, Metidatión, Metrifonato, Mevinfós, Monocrotofós, Naled, agente Novichok, Ometoato, Oxidemetón-Metilo, Paraoxón, Paratión, Paratión-Metilo, Forato, Fosadona, Fosmet, Fostebupirim, Foxim, Pirimifós-Metilo, Sarín, Soman, Tabun, Temefós, Terbufós, Tetraclorvinfós, Tribufós, Triclorfón, Demecarium, Onchidal, inhibidor de la acetilcolinesterasa escogido entre: Aldicarb, Bendiocarb, Bufencarb, Carbarilo, Carbendazim, Carbetamida, Carbofurán, Clorbufam, Clorprofam, Etienocarb, Etiofencarb, Fenobucarb, Fenoxicarb, Formetanato, Furadán, Ladostigil, Metiocarb, Metomilo, Miotina, Oxamilo, Fenmedifam, Pinnicarb, Pirimicarb, Propamocarb, Profam, Propoxur, Ganstigmina, Neostigmina, Fenserina y su enantiómero Posifeno, Fisostigmina, Piridostigmina, Rivastigmina, eptastigmina (heptilfisostigmina), Acotiamida, Ambenonium, donepecilo, Edrofonium, Galantamina, sus derivados SPH 1371, SPH 1373, SPH 1375 y SPH 1286 ((-)-N-(3-piperidinopropil)-N-demetilgalantamina), Huperzina A, su profármaco ZT 1 ((5R,9R)-5-(r-cloro-2-hidroxi-3-metoxibenciliden-amino)-11-etiliden-7-metil-1,2,5,6,9,10-hexahidro-5,9-metanocicloocta[b]piridin-2-ona), Minaprina, Tacrina, tolserina (3,4,8b-trimetil-2,3a-dihidro-1H-pirrolo[2,3-b]indol-7-il)N-(2-metilfenil)carbamato), Zanapezilo, ER 127528 (hidrocloruro de 1-(3-fluorobencil)-4-[(2-fluoro-5,6-dimetoxi-1-indanon-2-il)metil]piperidina), tiatolserina, RS 1259 (hemifumarato del éster 4-[1(S)-(metilamino)-3-(4 nitrofenoxi)propil]fenílico del ácido N,N-dimetilcarbámico), ipidacrina (NIK-247), velnacrina (9-Amino-1,2,3,4-tetrahidro-1-acridinol), zifrosilona (2,2,2-trifluoro-1-[3-(trimetilsilil)fenil]etanona), T 82 (hemifumarato de la 2-[2-(1-bencilpiperidin-4-il)etil]-2,3-dihidro-9-metoxi-1H-pirrolo[3,4-b]quinolin-1-ona), CI 1002 (o PD 142676, 1,3-dicloro-6,7,8,9,10,12-hexahidrozepino[2,1-b]-quinazolina), CHF 2060 (L-tartrato del éster 2,4a,9-trimetil-2,3,4,4a,9,9a-hexahidro-1,2-oxazino[6,5-b]indol-6-ílico del ácido N-heptilcarbámico), MF 268 (hidrato del L-bitartrato del éster (3aS,8aR)-1,3a,8-trimetil-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrolo[2,3-b]indol-5-ílico del ácido N-[8-(cis-2,6-dimetilmorfolin-4-il)octil]carbámico), TV 3326 (carbamato de N-propargil-3R-aminoindan-5-il-etilo y metilo), Latrepirdina (Dimebolín), hidrocloruro de (-)-12-amino-3-cloro-9-etil-6,7,10,11-tetrahidro-7,11-metanocicloocta[b]quinolina (huperzina X), hidrocloruro de 3-(2-[1-(1,3-dioxolan-2-ilmetil)piperidin-4-il]etil)-3,4-dihidro-2H-1,3-benzoxazin-2,4-diona (E 2030), y sus sales farmacéuticamente.

Dicho inhibidor de la acetilcolinesterasa puede tener efectos reversibles o irreversibles.

Dicho inhibidor de la acetilcolinesterasa puede ser un inhibidor de la acetilcolinesterasa irreversible, seleccionado de entre: Acefato, Azinfós-metilo, Bensulida, Cadusafós, Cloretoxifós, Clorfenvinfós, Clorpirifós, Clorpirifós-Metilo, Cumafós, Ciclosarin, Demetón, Demetón-S-Metilo, Diazinón, Diclorvós, Dicrotofós, Fluorofosfato de diisopropilo (Guthion), Fosfato de diisopropilo, Dimetoato, Dioxatión, Disulfotón, EA-3148, Ecotiofato, Etión, Etoprop, Fenamifós, Fenitrotión, Fentión, Fostiazato, Isofluorofato, Isoxatión, Malaoxón, Malatión, Metamidofós, Metidatión, Metrifonato, Mevinfós, Monocrotofós, Naled, agente Novichok, Ometoato, Oxidemetón-Metilo, Paraoxón, Paratión, Paratión-Metilo, Forato, Fosadona, Fosmet, Fostebupirim, Foxim, Pirimifós-metilo, Sarín, Soman, Tabun, Temefós, Terbufós, Tetraclorvinfós, Tribufós, Triclorfón, Demecarium, Onchidal, y sus sales farmacéuticamente.

Dicho inhibidor de la acetilcolinesterasa puede ser un inhibidor de la acetilcolinesterasa reversible, seleccionado de entre: Aldicarb, Bendiocarb, Bufencarb, Carbarilo, Carbendazim, Carbetamida, Carbofurán, Clorbufam, Clorprofam, Etienocarb, Etiofencarb, Fenobucarb, Fenoxicarb, Formetanato, Furadan, Ladostigil, Metiocarb, Metomilo, Miotina, Oxamilo, Fenmedifam, Pinnicarb, Pirimicarb, Propamocarb, Profam, Propoxur, Ganstigmina, Neostigmina, Fenserina y su enantiómero Posifeno, Fisostigmina, Piridostigmina, Rivastigmina, eptastigmina (heptilfisostigmina), Acotiamida, Ambenonium, donepecilo, Edrofonium, Galantamina, sus derivados SPH 1371, SPH 1373, SPH 1375 y SPH 1286 ((-)-N-(3-piperidinopropil)-N-demetilgalantamina), Huperzina A, su profármaco ZT 1 ((5R,9R)-5-(r-cloro-2-hidroxi-3-metoxibenciliden-amino)-11-etiliden-7-metil-1,2,5,6,9,10-hexahidro-5,9-metanocicloocta[b]piridin-2-ona), Minaprina, Tacrina, tolserina (3,4,8b-trimetil-2,3a-dihidro-1H-pirrolo[2,3-b]indol-7-il)N-(2-metilfenil)carbamato), hidrocloruro de (-)-12-amino-3-cloro-9-etil-6,7,10,11-tetrahidro-7,11-metanocicloocta[b]quinolina (huperzina X), Zanapezilo, y sus sales farmacéuticamente.

Dicho inhibidor de la acetilcolinesterasa se puede seleccionar de entre: ER 127528 (hidrocloruro de 1-(3-fluorobencil)-4-[(2-fluoro-5,6-dimetoxi-1-indanon-2-il)metil]piperidina), tiatolserina, RS 1259 (hemifumarato del éster 4-[1(S)-(metilamino)-3-(4 nitrofenoxi)propil]fenílico del ácido N,N-dimetilcarbámico), ipidacrina (NIK-247),

velnacrina (9-Amino-1,2,3,4-tetrahydro-1-acridinol), eptastigmina (heptilfisostigmina), zifosilona (2,2,2-trifluoro-1-[3-(trimetilsilil)fenil]etanona), T 82 (hemifumarato de la 2-[2-(1-bencilpiperidin-4-il)etil]-2,3-dihidro-9-metoxi-1H-pirrolol[3,4-b]quinolin-1-ona), CI 1002 (o PD 142676, 1,3-dicloro-6,7,8,9,10,12-hexahidrozepino[2,1-b]-quinazolina), CHF 2060 (L-tartrato del éster 2,4a,9-trimetil-2,3,4,4a,9,9a-hexahidro-1,2-oxazino[6,5-b]indol-6-ílico del ácido N-heptilcarbámico), MF 268 (hidrato del L-bitartrato del éster (3aS,8aR)-1,3a,8-trimetil-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrolol[2,3-b]indol-5-ílico del ácido N-[8-(cis-2,6-dimetilmorfolin-4-il)octil]carbámico), TV 3326 (carbamato de N-propargil-3R-aminoindan-5-il-etilo y metilo), y Latrepirdina (Dimebolín), y sus sales farmacéuticamente.

En el producto de combinación de la invención, dicho inhibidor de la acetilcolinesterasa es donepecilo, un inhibidor de la acetilcolinesterasa reversible, o una sal farmacéuticamente del mismo.

Mediante "sal farmacéuticamente aceptable" quiere hacerse referencia, por ejemplo, a una sal obtenida mediante adición a ácidos minerales u orgánicos de restos básicos tales como aminas; adición alcalina u orgánica de restos ácidos, tales como ácidos carboxílicos, y combinaciones que comprenden una o más de las sales anteriores. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales no tóxicas, y las sales de amonio cuaternario del compuesto progenitor formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, las sales de ácidos no tóxicos incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico, y similar; otras sales inorgánicas aceptables incluyen sales metálicas tales como sal de sodio, sal de potasio, sal de cesio, y similar; y sales de metales alcalino-térreos, tales como sal de calcio, sal de magnesio, y similar, y combinaciones que comprenden una o más de las sales anteriores. Las sales orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, trifluoroacético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, mesílico, esílico, besílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico, HOOC-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH, en el que n es 0-4, y similares; sales de aminas orgánicas tales como sal de trietilamina, sal de piridina, sal de picolina, sal de etanolamina, sal de trietanolamina, sal de dicitohexilamina, sal de N,N'-dibenciletilendiamina, y similares; y sales de aminoácidos tales como arginato, asparinato, glutamato, y similares; y combinaciones que comprenden una o más de las sales anteriores. Las sales particulares para donepecilo se describen en el documento WO 2006/030249.

El donepecilo (2,3-dihidro-5,6-dimetoxi-2-[[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]metil]-1H-inden-1-ona) es un ChEI no competitivo reversible a base de piperidina, que está indicado en el manejo de pacientes con enfermedad de Alzheimer de gravedad leve a moderada. Las observaciones preliminares han sugerido el valor de donepecilo en la mejora de los síntomas psicóticos en pacientes con demencia del tipo Alzheimer (DAT), demencia con cuerpos de Lewy, y pacientes que sufren enfermedad de Parkinson (Bergman et al, Clin. Neuropharmacol. 2002; 25(2):107-110, Birks J., Cochrane Database Syst Rev. 2006, (1):CD001190, Johanssen P. et al, CNS drugs 2006; 20(4):311-25, Gauthier S. et al, Curr. Med. Res. Opinion 2002; 18(6):347-54). donepecilo se ha propuesto para tratar otros numerosos trastornos cognitivos (demencia vascular, apnea del sueño, alteración cognitiva leve, esquizofrenia, el síndrome de CADASIL, trastorno de déficit de atención, alteración cognitiva poscoronaria, alteración cognitiva asociada con esclerosis múltiple, y síndrome de Down).

Aunque algunos estudios clínicos han sido concluyentes, todavía se debate el efecto de donepecilo, debido a que los efectos terapéuticos son pequeños y no siempre manifiestos. El beneficio clínico de este fármaco de agente colinérgico es en particular incierto para pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad, para los cuales se reconoce que la amplitud de la mejora está limitada (Nieoullon A., Psychol. Neuropsychiatr. Vieil. 2010; 8(2):123-31). De forma más importante, algunos pacientes no reaccionan a estos tratamientos.

La presente invención se refiere a un producto de combinación de sustancias terapéuticas que contiene por lo menos un agente de bloqueo de conexinas y un inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChEI), en el que dicho inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChEI) es donepecilo o una sal farmacéutica del mismo.

De forma más precisa, la presente invención se refiere a un producto de combinación de sustancias terapéuticas que contiene por lo menos un agente de bloqueo de conexinas y un inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChEI), como productos de combinación para uso simultáneo, separado o secuencial, como un medicamento para tratar pacientes que sufren trastornos cognitivos, en el que dicho inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChEI) es donepecilo o una sal farmacéutica del mismo.

Este producto de combinación es por ejemplo un kit, que contiene, ya sea en el mismo recipiente o en dos recipientes distintos, MFA y donepecilo o una sal farmacéutica del mismo.

El producto de combinación de la invención contiene preferentemente 1 µg/kg/día a 1 mg/kg/día de donepecilo o una sal farmacéutica del mismo. En una forma de realización preferida, el producto de combinación de la invención contiene entre 100 µg/kg/día y 1 mg/kg/día, e incluso más preferentemente entre 250 µg/kg/día y 1 mg/kg/día de donepecilo o una sal farmacéutica del mismo. A estas dosis elevadas, la combinación con MFA permite prolongar el efecto de donepecilo a lo largo del tiempo, y evitar efectos secundarios que se producen a

menudo cuando se usan tales dosis elevadas.

En una forma de realización preferida, el producto de combinación de la invención contiene entre 1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ , más preferentemente entre 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ , e incluso más preferentemente entre 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  y 40  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  de donepecilo o una sal farmacéutica del mismo. A estas dosis bajas, la combinación con MFA permite obtener un efecto suficiente de donepecilo sin disparar efectos secundarios.

El efecto antiinflamatorio de MFA se observa *in vivo* a una dosis de aproximadamente 5  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$  (véase Wagner C. et al, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 293 2007; R1781-6). En particular, el documento US 2008/021085 propone tratar la enfermedad de Alzheimer con dosis elevadas de ácido meclofenámico (MFA) que actúa como un AINE.

Sin embargo, cuando se usa en el producto de combinación de la invención, la cantidad de MFA es mucho menor, y está comprendida típicamente entre 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  y 0,5  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ , más preferentemente entre 25  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  y 0,5  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ , e incluso más preferentemente entre 125  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  y 0,5  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ .

Este producto de combinación difiere de la técnica anterior por cuanto, debido a las dosis muy bajas de MFA que se usan, no afecta a la acumulación de las proteínas A $\beta$  (A $\beta_{38}$ , A $\beta_{40}$  o A $\beta_{42}$ ), y no implica la ruta de ciclooxigenasa (COX). Por lo tanto, el uso de MFA en la combinación de la invención no está relacionado en absoluto con su papel descrito como "fármaco antiinflamatorio no esteroideo" (AINE) que se observa a mayores dosis (típicamente por encima de 5  $\text{mg}/\text{kg}$ , véase Wagner C. et al, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 293 2007; R1781-6). De forma importante, se ha demostrado por los inventores que MFA, administrado especialmente a una dosis baja, potencia donepecilo y conduce a un efecto sinérgico inesperado: aunque no tiene ningún efecto por sí mismo a esta dosis baja, MFA sí mejora el efecto de donepecilo más allá de lo que se pensó que era su efecto máximo (Bontempi B., et al, Neuropsychopharmacology 28 2003; 1235-46). También, MFA acelera el efecto de donepecilo, que se observa tan pronto como 30 minutos después del tratamiento, aunque no se espera antes de tres días después del tratamiento cuando se administra solo (véase, por ejemplo, en Joo Y. et al, Molecular Pharmacology 2006; 69:76-84).

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "trastorno cognitivo" significa cualquier afección caracterizada por un déficit en actividades mentales asociadas con el pensamiento, el aprendizaje, o la memoria. Los ejemplos de tales trastornos incluyen agnosias, amnesias, afasias, apraxias, delirios, demencias, y trastornos de aprendizaje. En algunos casos, la causa de un trastorno cognitivo puede ser desconocida o incierta. En otros casos, el trastorno cognitivo puede estar asociado con (es decir, puede estar causado por o producirse en presencia de) otras afecciones caracterizadas por daño a o pérdida de neuronas u otras estructuras implicadas en la transmisión de señales entre neuronas. Por tanto, los trastornos cognitivos pueden estar asociados con enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, hidrocefalia de presión normal, síndrome orgánico cerebral crónico, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, o demencia senil (tipo Alzheimer); pueden estar asociados con trauma al cerebro, tal como el provocado por hematoma subdural crónico, conmoción, hemorragia intracerebral, o con otra lesión al cerebro, tal como la provocada por infección (por ejemplo, encefalitis, meningitis, septicemia) o intoxicación o abuso de fármacos; y pueden estar asociados con síndrome de Down y síndrome del X frágil.

Los trastornos cognitivos también pueden estar asociados con otras afecciones que alteran el funcionamiento normal del sistema nervioso central, incluyendo trastornos psiquiátricos tales como trastorno cognitivo leve, alteración cognitiva por derivación postcoronaria, síndrome de CADASIL, trastornos de ansiedad, trastornos disociativos, trastornos del humor, esquizofrenia, y trastornos somatomorfos y artificiales; también pueden estar asociados con afecciones del sistema nervioso periférico, tales como dolor crónico y dolor neuropático.

Los ejemplos de demencia son: complejo de demencia por SIDA, enfermedad de Binswanger, demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, demencia por múltiples infartos, enfermedad de Pick, demencia semántica, demencia senil, apnea del sueño en demencia, y demencia vascular. Los ejemplos de trastorno del aprendizaje son: síndrome de Asperger, trastorno de déficit de atención, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, autismo, trastorno desintegrativo de la infancia, y síndrome de Rett. Finalmente, los ejemplos de afasia son afasia no fluente progresiva.

En una forma de realización preferida, el producto de combinación de la invención permite tratar los trastornos cognitivos particulares escogidos de: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia vascular y demencia senil.

Según otro aspecto, esta invención también se refiere al uso de este producto de combinación, simultánea, separada o secuencialmente, en pacientes que sufren trastornos cognitivos.

5 En el caso de uso simultáneo, los dos componentes del tratamiento se administran simultáneamente al paciente. Según esta forma de realización de la presente invención, los dos componentes se pueden envasar juntos, en forma de una mezcla, o separadamente, y después se pueden mezclar espontáneamente antes de administrarlos juntos al paciente. Más habitualmente, los dos componentes se administran simultáneamente, pero de forma separada. Por ejemplo, se pueden administrar con un intervalo de tiempo que está comprendido típicamente entre unos pocos minutos y varias horas, preferentemente entre 1 minuto y cinco horas, más preferentemente entre 1 minuto y dos horas.

10 En particular, las vías de administración de los dos componentes pueden ser diferentes. La administración también se puede llevar a cabo en sitios diferentes. En otra forma de realización, los dos componentes se administran secuencialmente o espaciados a lo largo del tiempo, por ejemplo en el mismo día o en un intervalo que oscila desde varias horas hasta varias semanas, o incluso varios meses.

15 La presente invención también describe el uso de por lo menos un agente de bloqueo de conexinas, tal como MFA, para preparar un fármaco destinado a ser administrado antes, al mismo tiempo, o después de un inhibidor de la acetilcolinesterasa, tal como donepecilo, a fin de tratar un paciente que sufre trastornos cognitivos.

20 La invención describe la utilización de por lo menos un agente de bloqueo de conexinas, tal como MFA, para potenciar el efecto de donepecilo en pacientes que sufren trastornos cognitivos.

La presente invención también describe la utilización de por lo menos un agente de bloqueo de conexinas, tal como MFA, para potenciar el efecto de un inhibidor de la acetilcolinesterasa, tal como donepecilo, en pacientes que sufren trastornos cognitivos.

25 Según otro aspecto, la invención se refiere a un agente de bloqueo de conexinas, tal como MFA, para uso para potenciar el efecto de donepecilo en pacientes que sufren trastornos cognitivos. Todas las formas de realización referidas al agente de bloqueo de conexinas y los trastornos cognitivos están comprendidas en la presente memoria.

30 La presente invención también describe un método para potenciar el efecto de un inhibidor de la acetilcolinesterasa, tal como donepecilo, en pacientes que sufren trastornos cognitivos, usando dicho método por lo menos un agente de bloqueo de conexinas, por ejemplo MFA.

35 El término "potenciar" significa en este caso incrementar significativamente los efectos del agente colinérgico administrado antes, simultáneamente o después del agente anticonexinas. En particular, la combinación del agente colinérgico con el agente anticonexinas hace posible mejorar el efecto terapéutico de dicho agente colinérgico, hasta un grado que es mayor que el obtenido por el agente colinérgico solo, cualquiera que sea su concentración considerada. Un "incremento significativo" de los efectos del agente colinérgico se obtiene, por ejemplo, cuando este efecto es mejorado en por lo menos alrededor de 25%, preferentemente por lo menos alrededor de 40%, y más preferentemente en por lo menos alrededor de 50%, en comparación con el efecto del agente colinérgico solo. Dicho efecto se puede medir, por ejemplo, analizando el perfil de EEG o el porcentaje de alternancia con respecto a vehículos en animales de laboratorio, como se describe en la parte experimental más abajo.

45 Este efecto mejorado ("potenciación") también permite reducir las dosis a las que se usa dicho agente colinérgico, y por lo tanto limitar los efectos adversos potenciales de dicho agente colinérgico, y/o reducir los efectos de fracaso y retirada.

50 Por lo tanto, la invención también describe el uso de por lo menos un agente de bloqueo de conexinas, para reducir las dosis de dicho agente colinérgico y/o limitar los efectos adversos de dicho agente colinérgico, y/o reducir los efectos de fracaso y retirada.

55 El donepecilo se usa típicamente a una dosis comprendida entre 5 mg y 10 mg por día para un individuo adulto, lo que significa aproximadamente entre 100 µg/kg/día y 200 µg/kg/día. Como se describió anteriormente, la combinación de la invención permite reducir las mencionadas dosis, típicamente a menos de 100 µg/kg/día y preferentemente a menos de 50 µg/kg/día (por ejemplo, la dosis de donepecilo puede estar comprendida entre 1 µg/kg/día y 100 µg/kg/día, preferentemente entre 10 µg/kg/día y 100 µg/kg/día, y más preferentemente entre 10 µg/kg/día y 40 µg/kg/día), o maximizar el efecto de donepecilo a lo largo del tiempo sin inducir efectos secundarios (cuando donepecilo se usa a mayores dosis, esto es, entre 100 µg/kg/día y 1 mg/kg/día, preferentemente entre 100 µg/kg/día y 200 µg/kg/día, o entre 250 µg/kg/día y 1 mg/kg/día).

60 La invención describe finalmente un método para tratar un paciente que sufre trastornos cognitivos, que incluye la administración a dicho paciente de:

65 a) por lo menos un inhibidor de la acetilcolinesterasa, y

b) por lo menos un agente de bloqueo de conexinas,

y en el que dichos productos a) y b) se administran simultáneamente, separadamente, o se distribuyen a lo largo del tiempo.

Todas las formas de realización de este método son como se describen anteriormente.

## Ejemplos

### 1. Materiales y métodos

#### 1.1. Registro electroencefalográfico en ratones.

Los efectos electrofisiológicos de donepecilo se evaluaron mediante análisis de la actividad electroencefalográfica hipocámpica (EEG) como se describió previamente en el documento WO2010/029131.

De forma breve, el ensayo es como se expone a continuación:

Implantación previa de los electrodos: A dos grupos de ratones C57bl/6 machos (siete ratones de 4 a 5 meses, y siete ratones de 17 a 18 meses) se les implantaron previamente electrodos bipolares hipocámpicos bilaterales bajo anestesia de isoflurano. Antes de los registros se realizó un período de recuperación de dos semanas.

Inyecciones: Se llevaron a cabo diferentes tratamientos intraperitoneales mediante combinación circular de 7 ratones por tratamiento (donepecilo 0,1 y 0,3 mg/kg, meclofenámico 1 mg/kg, donepecilo 0,1 mg/kg + MFA 1 mg/kg). Se ha descrito previamente que la dosis de 1 mg/kg de MFA no afecta a la señal electroencefalográfica en roedores.

Medidas de EEG: Se llevaron a cabo medidas de EEG sobre diferentes lotes de ratones despiertos (previamente implantados y domesticados) mediante los registros dos horas después de la inyección. El análisis espectral se llevó a cabo mediante transformada de Fourier (FFT), y permite el cálculo de las potencias relativas para cada Hertzio y para cada segundo. Los datos de FFT se promediaron entonces minuto a minuto, y se dieron a conocer para controlar el registro del disolvente realizado en el día anterior en condiciones experimentales estrictamente idénticas. Las potencias espectrales de los dos electrodos hipocámpicos se promediaron entonces entre 3 y 12 Hertzios, y se representaron de forma horaria.

En el día 1, se administró intraperitonealmente disolución salina a ratones “adultos” o “de edad avanzada” (n = 7), y se midió la actividad  $\theta$  del hipocampo durante dos horas consecutivas. En el día 2, se inyectó donepecilo solo o en combinación con MFA, y la actividad  $\theta$  del hipocampo se relacionó con la medida en el día 1. Los resultados se muestran en la figura 1 (\*:  $p < 0,05$  (ANOVA de una vía).

#### 1.2. Ensayo de comportamiento de la memoria de trabajo – protocolo de laberinto en T en ratones

Para evaluar la memoria de trabajo espacial en ratones, se usa ampliamente el ensayo secuencial alternante (Beracochea D.J. y Jaffard R., Behav. Neurosci. 101 (1987) 187-97). La alternancia espontánea es la tendencia innata de los roedores para alternar sus elecciones para entrar en los compartimentos de llegada de un dispositivo de mazmorra en T, a lo largo de ensayos sucesivos. Para alternar durante un ensayo dado N, el animal debe recordar la elección hecha selectivamente en el ensayo N-1, de manera que el deterioro en la alternancia reflejará el fenómeno de olvido. La respuesta en la alternancia es una medida del comportamiento. La alternancia secuencial evalúa más específicamente la sensibilidad a la interferencia, un factor importante en el olvido.

El experimento tuvo lugar en una mazmorra en T (50 cm x 10 cm x 25 cm). A todos los sujetos (ratones machos C57bl/6, 17-18 meses, n = 9) se les sometió a 7 ensayos sucesivos, separados mediante un intervalo entre ensayos de 90 s. Para comenzar un ensayo, el ratón se colocó en la caja de salida durante 90 s antes de que se abriera la puerta al vástago. Cuando el sujeto entró en uno de los brazos de destino, la puerta de ese brazo se cerró. Se registró el brazo escogido y el tiempo que transcurrió entre la apertura de la puerta y la llegada hasta el extremo del brazo escogido (tiempo de logro de la tarea). Tras un período de confinamiento de 30 s en el brazo escogido, el animal se retiró y se colocó en la caja de salida para un nuevo ensayo. Entre cada ensayo, la unidad se limpió con agua y alcohol para evitar una detección olfativa. Una respuesta de alternancia se consideró cada vez que el sujeto entró en el brazo opuesto al visitado en el ensayo inmediatamente previo. La tasa de alternancia se calculó teniendo en cuenta los 6 ensayos sucesivos, y se expresó en porcentaje con respecto a la tasa de alternancia máxima de 100% (obtenida cuando el sujeto nunca volvió al mismo brazo durante dos ensayos consecutivos).

A ratones C57BL/6 de 17 a 18 meses (ratones “de edad avanzada”) se les inyectó intraperitonealmente una disolución de NaCl (vehículo), donepecilo (DZP), ácido meclofenámico (MFA), o una combinación de estos dos últimos compuestos, 30 minutos antes del experimento de la mazmorra en T.

5 Treinta minutos después del tratamiento (NaCl, donepecilo, MFA), los ratones “de edad avanzada” se colocan en el dispositivo de la mazmorra en T. Se midió el porcentaje de alternancia durante 7 ensayos consecutivos, correspondiendo el 50% a una alternancia aleatoria. Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3 (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$  (ANOVA)).

### 10 1.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se estableció mediante software SigmaPlot (Systat Software Inc).

## 15 **2. Resultados experimentales**

### 15 2.1. Estudio de la potenciación de donepecilo mediante electroencefalografía

20 Puesto que se sabe que la actividad eléctrica incrementada en el SNC, medida en un electroencefalograma (EEG), refleja en algunas circunstancias los beneficios terapéuticos de un fármaco psicoactivo (Galderisi S. et al, Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 24 Supl D (2002) 79), se evaluó el efecto de la combinación donepecilo/MFA sobre la actividad  $\theta$  del hipocampo y en dos grupos de ratones (“adultos” y “de edad avanzada”), como se muestra en la figura 1.

Se ha observado que:

- 25 • Los ratones de 4-5 meses no responden significativamente a la administración de donepecilo 0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg, mientras que los registros de ratones de 17-18 meses muestran, durante la segunda hora de registro, un efecto de donepecilo a 0,3 mg/kg. Esto es consistente con las diferentes respuestas a donepecilo descritas entre ratones “adultos” y “de edad avanzada” (Tronche C. et al, Behav. Brain. Res. 2010; 215:255-260).
- 30 • El ácido meclofenámico potencia significativamente, durante la primera y la segunda hora, el efecto farmacológico de donepecilo.

35 En consecuencia, EEG mostró que, mientras que MFA no tuvo ningún efecto por sí mismo, el tratamiento combinado con donepecilo fue más potente que donepecilo solo. Como se reveló mediante los ANOVA, MFA + donepecilo incrementaron la frecuencia theta en más de 50% en comparación con ratones tratados con vehículo y con donepecilo (0,1 y 0,3 mg/kg) ( $n = 7$  por grupo;  $p = 0,034$ ).

### 40 2.2. Estudio de la potenciación de donepecilo mediante análisis de comportamiento

La donepecilo es una molécula proamnesiante descrita por mejorar el comportamiento de ratones en dispositivos de mazmorra en T (Spowart-Manning L., Behav. Brain. Res. 151 (2004) 37-46).

45 A partir de la figura 2, se puede inferir que:

- 50 • El donepecilo tiene un efecto proamnesiante significativo a 0,3 y 1 mg/kg, identificado por un incremento de la alternancia debido a una memoria de recuerdo de la elección hecha en el ensayo previo. Esta molécula no tiene ningún efecto proamnesiante significativo a 0,1 mg/kg.
- El ácido meclofenámico no tiene ningún efecto proamnesiante significativo a 1 mg/kg.
- El donepecilo a 0,1 mg/kg es potenciado por el ácido meclofenámico.

55 La alternancia de los ratones también se analizó con bloques de dos ensayos (Bloque 1: ensayos 2 y 3/Bloque 2: ensayos 4 y 5/Bloque 3: ensayos 6 y 7). Los resultados se muestran en la figura 3:

- 60 • El ácido meclofenámico no muestra ningún efecto significativo en los tres bloques de ensayos.
- El comportamiento de los ratones del control (“vehículo”) se degrada en el tercer bloque, reflejando el efecto de la interferencia de la memoria.
- El donepecilo a 0,1 mg/kg contrarresta parcialmente el fenómeno de la interferencia en el tercer bloque de ensayos.

65

- El ácido meclofenámico potencia principalmente el efecto de donepecilo en el tercer bloque, y mejora el recuerdo de la memoria reduciendo el fenómeno de interferencia.

5 De forma más precisa, la combinación con ácido meclofenámico permite alcanzar un mayor efecto (casi 85%) que el efecto máximo observado para el donepecilo solo, y para una dosis menor de donepecilo (0,1 mg/kg, véase la figura 2, última columna). En otras palabras, el tratamiento combinado de MFA + donepecilo a 0,1 mg/kg reveló ser más eficiente que las dosis más elevadas de donepecilo solo (es decir, 0,3 y 1 mg/kg) a la hora de invertir la alteración inducida por la edad (n = 9 por grupo; p < 0,01).

10 También, la combinación con ácido meclofenámico permite obtener una resistencia a la interferencia amnésica mayor que la inducida por donepecilo. Esta mejora del efecto de donepecilo nunca se ha observado hasta el momento.

15 Estos resultados son sorprendentes. De hecho, como se puede observar en la bibliografía (véase, por ejemplo, Bontempi B. et al (Neuropsychopharmacology 2003; 28; 1235-12460) para la dosis de 0,2 mg/kg s.c.) o en los experimentos mostrados anteriormente (0,3 mg/kg i.p.), donepecilo muestra su eficacia máxima a 0,2-0,3 mg/kg (véase la figura 2: aproximadamente 75% obtenido para 0,3 mg/kg y 1 mg/kg de donepecilo solo). La mayor eficacia no se pudo lograr con donepecilo solo, incluso a mayores dosis.

20 Conclusiones globales:

La Tabla 1 a continuación resume los resultados electroencefalográficos (EEG) y de comportamiento (tarea de SA) (Atención Selectiva)).

	donepecilo 0,1 mg/kg	donepecilo 0,3 mg/kg	donepecilo 0,1 mg/kg + MFA 1 mg/kg	Estadística (ANOVAs)
Potencia relativa de EEG con respecto a vehículos	1	1	1,6 *	p=0,034
Tarea de SA con respecto a vehículos	35%	48%**	68%**	p=0,0013

25 Los resultados de EEG se expresan como la potencia relativa del ritmo theta del hipocampo de cada grupo en comparación con ratones inyectados con el vehículo. Los resultados de la tarea de SA se expresan como el porcentaje medio de alternancia con respecto a vehículos a lo largo de los siete ensayos. \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01.

30 Se ha mostrado por primera vez que la actividad electrofisiológica y la actividad proamnesiante de donepecilo está enormemente potenciada por el ácido meclofenámico, lo que permite sorprendentemente un efecto farmacológico máximo de donepecilo.

35 Además, el ácido meclofenámico modifica el perfil farmacológico de donepecilo, modificando la evolución temporal y la intensidad de sus efectos sobre la memoria.

Es importante señalar que MFA, durante el tratamiento agudo, no tiene efecto propio sobre el modelo preclínico usado en la presente memoria, de manera que se piensa que la actividad de MFA es independiente de la acumulación de A $\beta$ :

- Independencia entre A $\beta$  y la actividad de AINE.

45 El modelo preclínico usado en la presente memoria (ratones de 17-18 meses de tipo salvaje de edad media) es un modelo patológico de alteración cognitiva que no se caracteriza por una acumulación de A $\beta$ . De hecho, no hay ninguna acumulación de A $\beta$  en ratones de tipo salvaje, incluso más allá de 24 meses (véase la figura 2 en Walther T. et al, PLoS One 2009; e4590), aunque se describe un deterioro cognitivo a los 17-18 meses (véase en Beracochea D. et al, Psychopharmacology (Berl) 193 2007; 63-73). Además, no se observa ningún efecto cognitivo significativo de MFA a 1 mg/kg solo (figura 2 y 3 de esta solicitud), aunque tal dosis potencia donepecilo.

50 Para determinar su actividad anti-Cox, MFA se administra a una dosis por encima de 5 mg/kg (véase en Wagner C. et al, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 293 2007; R1781-6). Sin embargo, MFA se usó en la presente invención a una dosis menor que la publicada para su actividad de AINE.

55 Este punto constituye una diferencia importante con los documentos de la técnica anterior, tales como Mc Gleenon et al, British Journal of Clinical Pharmacology, 1999; 48, 471-480, y Gasparini L. et al, Journal of Neurochemistry 2004; 91, 521-536, puesto que este último documento señala claramente que las dosis de A $\beta$  son similares a las dosis anti-Cox. De este modo, el efecto potenciador de MFA sobre donepecilo es

independiente de sus efectos anti-A $\beta$ <sub>1-40</sub> o anti-A $\beta$ <sub>1-42</sub> potenciales.

- La presente invención no selecciona específicamente a la enfermedad de Alzheimer como diana, sino a todas las alteraciones cognitivas.

5

La presente invención apunta ampliamente a todos los trastornos cognitivos. Tales trastornos se clasifican por la alteración de funciones cognitivas específicas tales como atención, memoria, lenguaje, observada en numerosas demencias (enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, demencia asociada con enfermedad de Parkinson, demencia senil, demencia vascular, hidrocefalia, síndrome de Korsakoff, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, etc.). De este modo, la presente invención no se dirige específicamente a una enfermedad con acumulación de A $\beta$ , sino más bien a todos los tipos de alteración cognitiva, independientemente de su etiología (de hecho, también se describe que donepecilo se dirige contra mecanismos independientes de A $\beta$ , tales como el sistema colinérgico).

10

15

- MFA – administrado a una dosis baja y en el modelo preclínico ejemplificado anteriormente – potencia donepecilo, lo que es un efecto inesperado:

20

Este efecto no es un efecto aditivo, sino uno sinérgico inesperado. De hecho, MFA no tiene ningún efecto propio a la dosis ensayada, y donepecilo se potencia más allá de su efecto máximo (Bontempi B., et al, *Neuropsychopharmacology* 28 2003; 1235-46) (en particular con respecto a la resistencia a la interferencia de la memoria, que está alterada en la demencia humana (Hanseeuw B.J., et al, *Brain Cogn.* 72 325-31).

25

La cinética de la actividad de la combinación de la invención es nueva e inesperada. De hecho, la potenciación de la eficiencia de donepecilo se observa tan pronto como 30 minutos después del tratamiento, mientras que los efectos descritos en los documentos de la técnica anterior (tal como Joo Y. et al, *Molecular Pharmacology* 2006; 69:76-84) solamente se observan después de un tratamiento de tres días.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Producto de combinación de sustancias terapéuticas que contiene por lo menos un agente de bloqueo de conexinas y un inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChEI), en el que dicho inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChEI) es el donepecilo o una sal farmacéutica del mismo.
- 10 2. Producto de combinación según la reivindicación 1, en el que dicho agente de bloqueo de conexinas se selecciona de entre el grupo que consiste en: ácido meclofenámico, ácido 18-β-glicirretínico, mefloquina y tonabersat.
- 15 3. Producto de combinación según la reivindicación 1 o 2, que contiene entre 1 μg/kg/día y 1 mg/kg/día de donepecilo o una sal farmacéutica del mismo.
- 20 4. Producto de combinación según la reivindicación 1 a 3, en el que dicho agente de bloqueo de conexinas es la mefloquina.
- 25 5. Producto de combinación de sustancias terapéuticas que contiene por lo menos un agente de bloqueo de conexinas y un inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChEI), como productos de combinación para la utilización simultánea, separada o secuencial, para tratar los trastornos cognitivos, en el que dicho inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChEI) es el donepecilo o una sal farmacéutica del mismo.
- 30 6. Producto de combinación para una utilización según la reivindicación 5, en el que dicho trastorno cognitivo es un déficit en actividades mentales asociado con el pensamiento, aprendizaje, o memoria, preferentemente agnosias, amnesias, afasias, apraxias, delirios, demencias, y trastornos del aprendizaje, más preferentemente asociado con enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, hidrocefalia de presión normal, síndrome orgánico cerebral crónico, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, o demencia senil (tipo Alzheimer); o asociado con traumatismo en el cerebro o con otra lesión en el cerebro; o asociado con el síndrome de Down y síndrome de X frágil; o asociado con trastornos psiquiátricos tales como trastorno cognitivo leve, alteración cognitiva por derivación postcoronaria, síndrome de CADASIL, trastornos de ansiedad, trastornos disociativos, trastornos del estado de ánimo, esquizofrenia, y trastornos somatomorfos y facticios; o asociado con dolor crónico y dolor neuropático.
- 35 7. Producto de combinación para una utilización según la reivindicación 5, en el que dicho trastorno cognitivo es:
- 40 - una demencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: complejo de demencia por SIDA, enfermedad de Binswanger, demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, demencia por múltiples infartos, enfermedad de Pick, demencia semántica, demencia senil, apnea del sueño en demencia, y demencia vascular, o
- 45 - un trastorno del aprendizaje seleccionado de entre el grupo que consiste en: síndrome de Asperger, trastorno de déficit de atención, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, autismo, trastorno desintegrativo infantil, y síndrome de Rett.
- 50 8. Producto de combinación para una utilización según la reivindicación 5 o 7, en el que dicho agente de bloqueo de conexinas se selecciona de entre el grupo que consiste en: ácido meclofenámico, ácido 18-β-glicirretínico, mefloquina y tonabersat.
- 55 9. Producto de combinación para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, que contiene entre 1 μg/kg/día y 1 mg/kg/día de donepecilo o una sal farmacéutica del mismo.
- 60 10. Producto de combinación para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que dicho agente de bloqueo de conexinas es la mefloquina.
- 65 11. Agente de bloqueo de conexinas para una utilización para tratar enfermedades cognitivas potenciando el efecto del donepecilo o una sal farmacéutica del mismo.
12. Agente de bloqueo de conexinas para una utilización según la reivindicación 11, en el que dicho trastorno cognitivo es un déficit en actividades mentales asociadas con el pensamiento, el aprendizaje, o la memoria, preferentemente una agnosia, una amnesia, una afasia, una apraxia, un delirio, una demencia, o un trastorno del aprendizaje, más preferentemente asociadas con enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia vascular y demencia senil.
13. Agente de bloqueo de conexinas para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en el que dicho agente de bloqueo de conexinas se selecciona de entre el grupo que consiste en: ácido

meclofenámico, ácido 18- $\beta$ -glicirretínico, mefloquina y tonabersat.

14. Agente de bloqueo de conexinas para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el donepecilo o una sal del mismo se utiliza a una dosis comprendida entre 1  $\mu$ g/kg/día y 1 mg/kg/día.

5

15. Agente de bloqueo de conexinas para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que dicho agente de bloqueo de conexinas es la mefloquina.

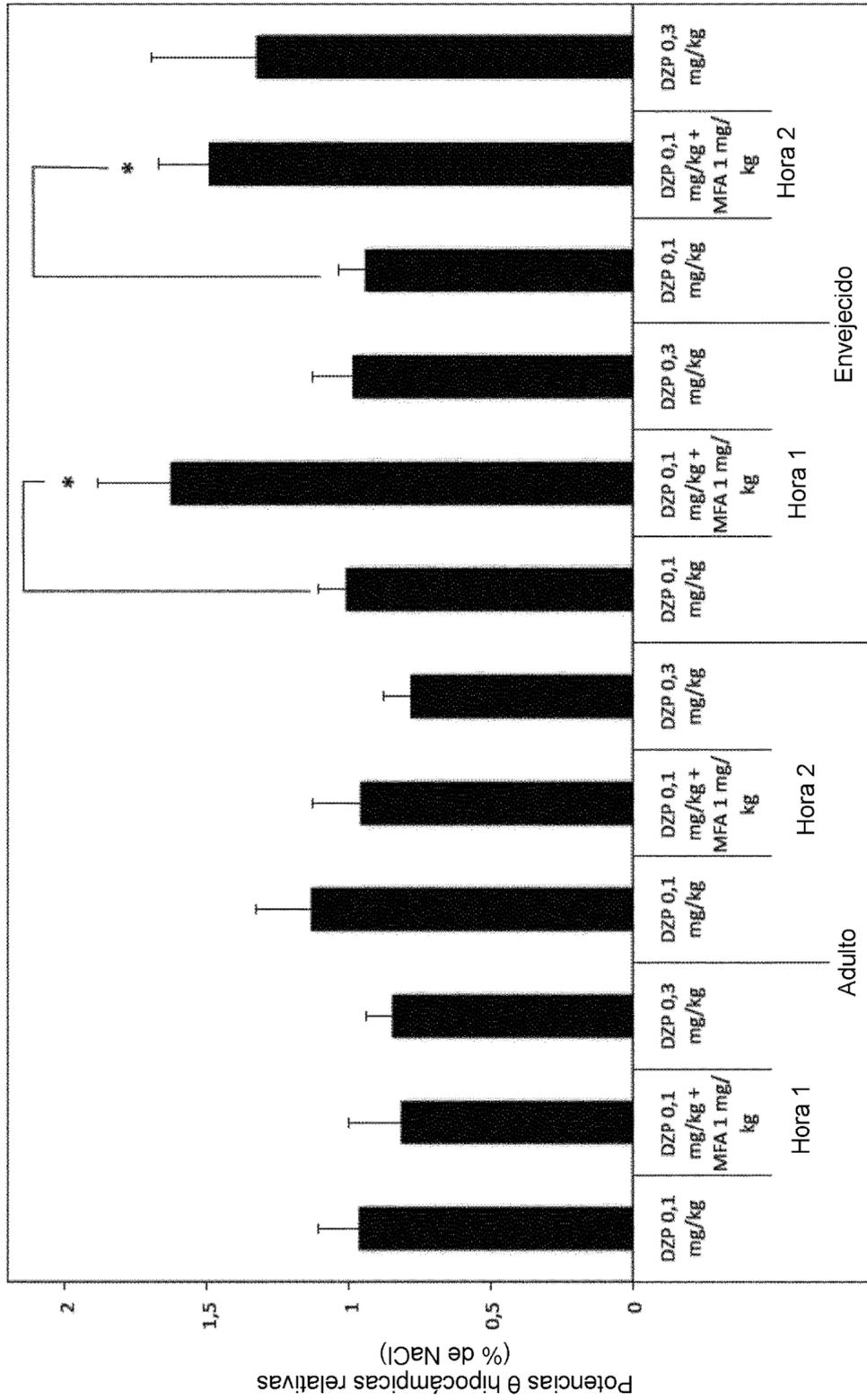


Figura 1

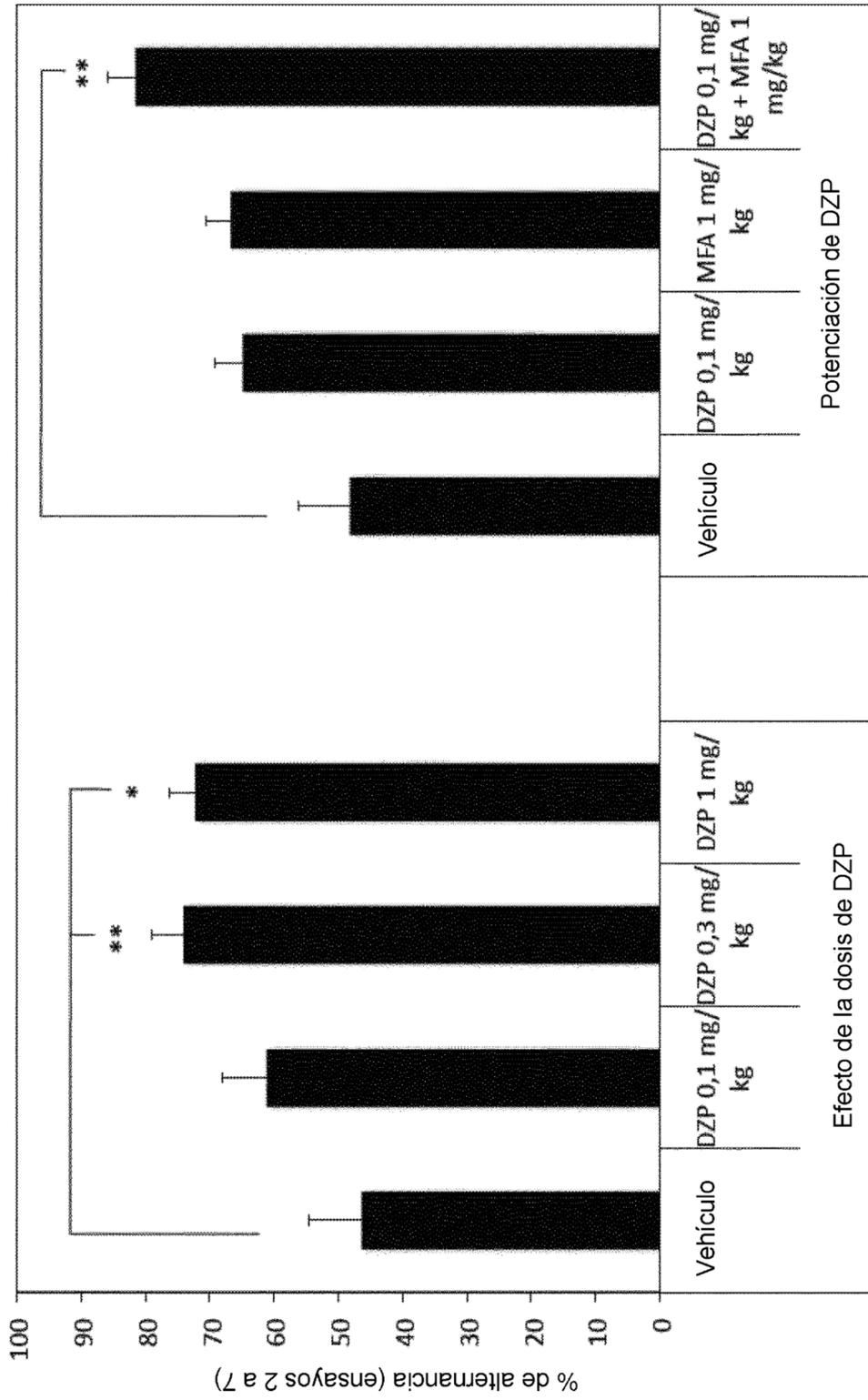


Figura 2

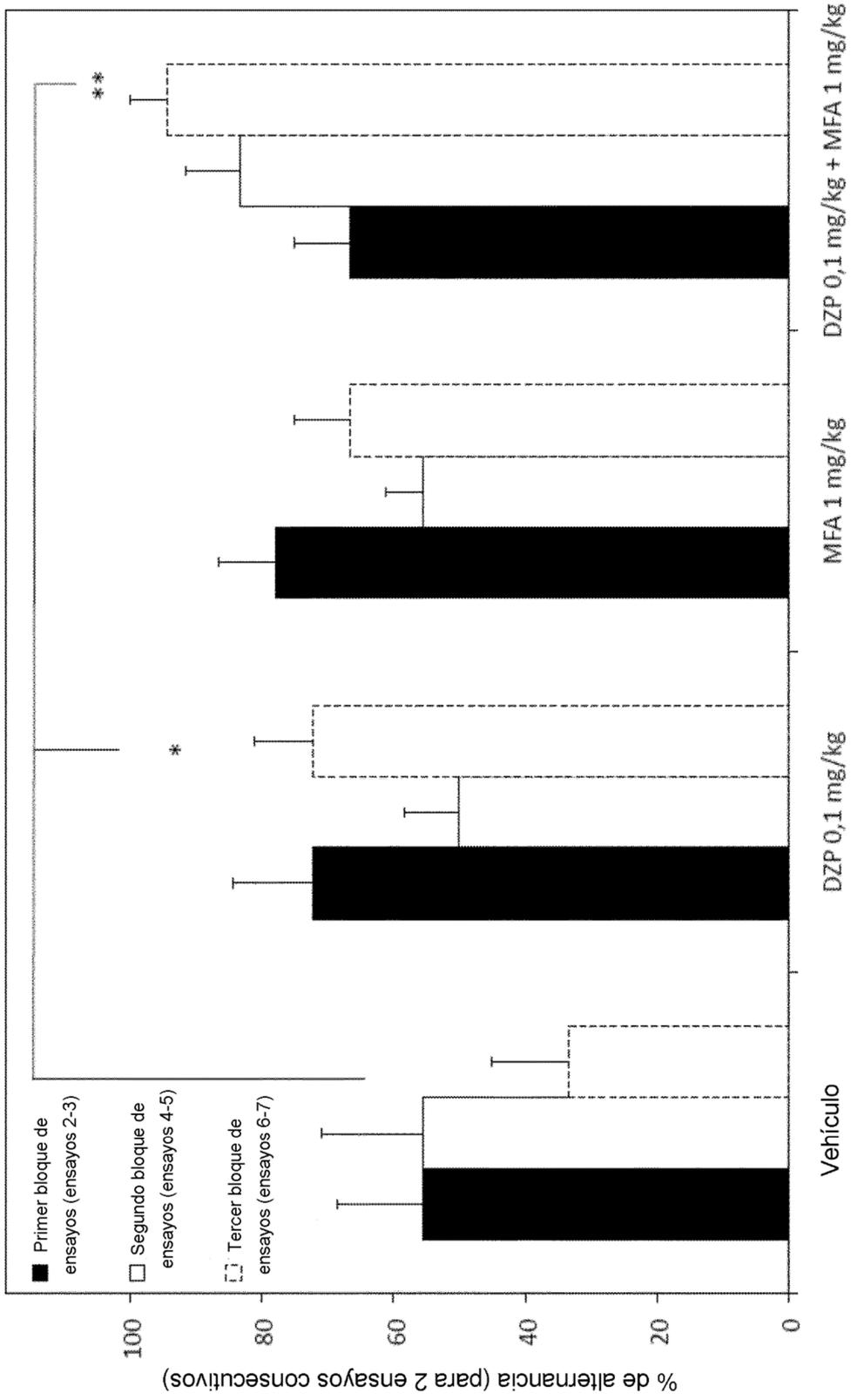


Figura 3